



(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)



1-0032031

(51)^{2013.01} A61K 39/12; C07K 14/30; A61K 39/295 (13) B

(21) 1-2014-03672

(22) 03/04/2013

(86) PCT/US2013/035083 03/04/2013

(87) WO 2013/152081 10/10/2013

(30) 61/620,165 04/04/2012 US

(45) 25/05/2022 410

(43) 25/09/2015 330A

(73) ZOETIS SERVICES LLC (US)

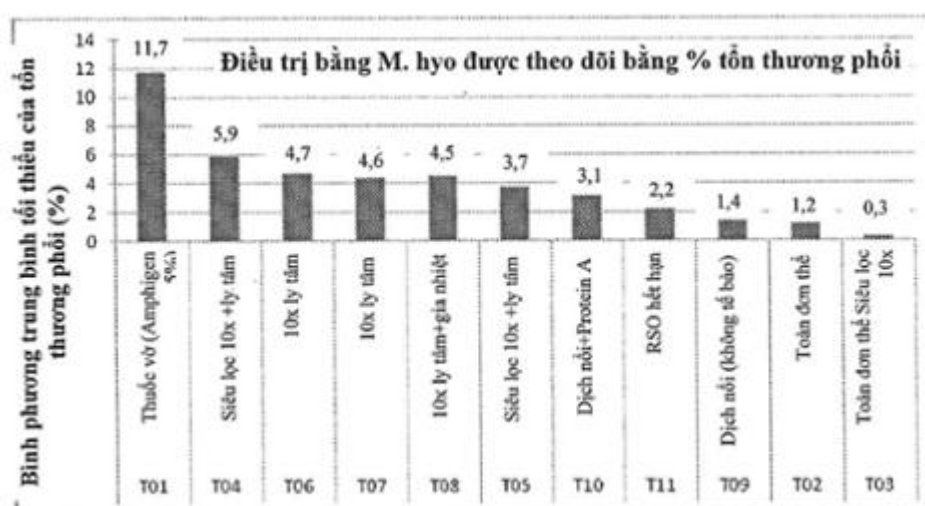
10 Sylvan Way, Parsippany, NJ 07054, United States of America

(72) Jeffrey E. GALVIN (US); Gregory P. NITZEL (US); John Keith GARRETT (US); James R. KULAWIK II (US); Tracy L. RICKER (US); Megan Marie SMUTZER (IN).

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

(54) CHẾ PHẨM GÂY MIỄN DỊCH CHỨA PHẦN HÒA TAN CỦA CHẾ PHẨM TOÀN TẾ BÀO MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE VÀ PHƯƠNG PHÁP BÀO CHẾ CHẾ PHẨM NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm gây miễn dịch chứa phần hòa tan của chế phẩm toàn tế bào *Mycoplasma hyopneumoniae* (M.hyo), trong đó phần hòa tan này của chế phẩm M.hyo gần như không chứa cả phức chất miễn dịch (i) IgG lẫn phức chất miễn dịch (ii) được cấu thành từ kháng nguyên liên kết với globulin miễn dịch. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến kit và phương pháp bào chế chế phẩm gây miễn dịch này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyopneumoniae* hoặc *M. hyo*). Cụ thể, sáng chế đề cập đến phần hòa tan của chế phẩm toàn tế bào *M. hyo* và sử dụng nó trong vacxin phòng ngừa bệnh viêm phổi địa phương cho lợn.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh viêm phổi địa phương, còn gọi là bệnh viêm phổi *Mycoplasma*, do *M. hyo* gây ra. Bệnh này là bệnh mạn tính không gây chết, ảnh hưởng đến lợn ở tất cả các độ tuổi. Lợn bị nhiễm chỉ biểu hiện các triệu chứng nhẹ gồm ho và sốt, song bệnh tác động đáng kể đến kinh tế do hiệu quả thức ăn giảm và mức tăng trọng giảm. Bệnh viêm phổi địa phương lây truyền từ lợn sang lợn qua đường mũi bởi các sinh vật sống trong không khí bật ra từ phổi của lợn bị nhiễm. Bệnh nhiễm tiên phát bởi *M. hyo* có thể kèm theo bệnh nhiễm thứ phát bởi các loài *Mycoplasma* khác (*Mycoplasma hyorhinis* và *Mycoplasma flocculare*) cũng như các tác nhân gây bệnh vi khuẩn khác.

M. hyo là vi sinh vật nhỏ không có nhân điển hình, có khả năng sống tự do, mặc dù nó thường được phát hiện liên quan đến các tế bào có nhân điển hình do nó có các nhu cầu tuyệt đối về các sterol và axit béo ngoại sinh. Các nhu cầu này thường đòi hỏi phải sinh trưởng trong môi trường chứa huyết thanh. *M. hyo* được bao bọc bởi màng tế bào, song không có thành tế bào.

Sự kết hợp cơ học của *Mycoplasmas* với bề mặt tế bào chủ là cơ sở cho sự phát triển và tồn tại dai dẳng của bệnh viêm phổi địa phương. *M. hyo* nhiễm vào đường hô hấp của lợn, khu trú ở khí quản, phế quản và tiểu phế quản. *Mycoplasma* tạo ra yếu tố dính lông mao khiến cho các lông mao lót đường hô hấp dính rung. Cuối cùng, các lông mao này thoái hóa, khiến cho lợn dễ bị nhiễm các tác nhân gây bệnh thứ cấp. Các tổn thương đặc trưng ở các vùng cổ kết từ tím đến xám được quan sát ở động vật bị nhiễm. Các nghiên cứu ở lợn sát sinh chỉ ra mức độ tổn thương từ 30 đến 80% số lợn. Kết quả từ 37 đàn ở 13 trạng thái chỉ ra rằng 99% số đàn có lợn bị tổn thương viêm phổi điển hình của bệnh viêm phổi địa phương. Do đó, rất cần có các phương pháp phòng và điều trị hữu hiệu.

Các chất kháng sinh như tiamulin, trimethoprim, tetracyclin và lincomycin có lợi

nhất định, song lại đắt tiền và cần phải dùng kéo dài. Ngoài ra, chất kháng sinh chưa được chứng minh là loại bỏ một cách hữu hiệu sự lây lan và tái nhiễm của M. hyo. Đôi khi, việc ngăn ngừa bằng cách duy trì đàn lợn không có tác nhân gây bệnh là khả thi song sự tái nhiễm M. hyo thường xảy ra. Do hậu quả kinh tế nghiêm trọng của bệnh viêm phổi lợn, vacxin phòng ngừa M. hyo đã được tìm kiếm. Các vacxin chứa chế phẩm sinh vật *Mycoplasma* sinh trưởng trong môi trường chứa huyết thanh đã được bán trên thị trường, song phát sinh các vấn đề liên quan đến phản ứng phụ do các thành phần huyết thanh gây ra (như phức chất miễn dịch hoặc protein đặc hiệu không gây miễn dịch) có mặt trong chất gây miễn dịch. Các nỗ lực khác tạo ra vacxin M. hyo đã thành công, song bệnh vẫn lan rộng.

M. hyo và circovirut typ 2 ở lợn (porcine circovirus type 2: PCV2) là hai tác nhân gây bệnh phổ biến nhất gặp phải trong ngành công nghiệp lợn. Lợn bị nhiễm PCV2 có triệu chứng thường được gọi là hội chứng còi cọc ở lợn sau cai sữa (Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome: PMWS). PMWS được đặc trưng về mặt lâm sàng là hốc hác, da nhợt nhạt, lông thô ráp, khó thở, tiêu chảy và vàng da. Ngoài PMWS, PCV2 liên quan đến một số bệnh nhiễm khác bao gồm bệnh giả dại, hội chứng hô hấp và sinh sản ở lợn (porcine reproductive and respiratory syndrome: PRRS), 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. M. hyo liên quan đến bệnh viêm phổi địa phương và cũng đã được chỉ ra là một trong số các đồng nhân tố chính trong quá trình phát triển bệnh liên quan đến circovirut lợn (Porcine Circovirus Associated Disease: PCVAD).

Hội chứng hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRS) là do arterivirut gây ra, virut này có ái lực đặc biệt với các đại thực bào, cụ thể là các đại thực bào được tìm thấy trong phổi (đại thực bào phế nang). Các đại thực bào này tiêu hóa và loại bỏ các vi khuẩn và virut xâm nhập, song không phải là trường hợp của virut PRRS. Trong trường hợp của virut PRRS, nó nhân lên bên trong đại thực bào tạo nhiều virut hơn và tiêu diệt đại thực bào. Khi PRRSV đã đi vào đàn lợn, nó vẫn hiện diện và hoạt động không xác định. Có tới 40% số đại thực bào bị phá hủy, điều này cho phép vi khuẩn và các virut khác sinh sản và gây hại. Một ví dụ về trường hợp này là mức độ nghiêm trọng của bệnh viêm phổi địa phương gia tăng đáng kể ở các bộ phận đang lớn/kết thúc khi chúng trở nên bị nhiễm virut PRRS. Hơn một nửa số lợn âm tính với virut PRRS ở độ tuổi cai sữa bị nhiễm trước khi đưa ra thị

trường.

Cần có vaccin được cải thiện phòng ngừa bệnh nhiễm *Mycoplasma* ở lợn. Tốt hơn, nếu vaccin M. hyo là tương thích với các kháng nguyên khác của lợn, như PCV2 và virus PRRS, bất kể chúng được dùng dưới dạng các vaccin đơn lẻ riêng biệt hay kết hợp thành vaccin dùng ngay. Rất cần có vaccin kết hợp M. hyo/PCV2 đơn liều dùng ngay.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất chế phẩm gây miễn dịch chứa phần hòa tan của chế phẩm toàn tế bào *Mycoplasma hyopneumoniae* (M. hyo), trong đó phần hòa tan của chế phẩm M. hyo là hầu như không chứa cả (i) IgG lẫn (ii) phức chất miễn dịch gồm kháng nguyên liên kết với globulin miễn dịch. Theo một khía cạnh, phần hòa tan của chế phẩm toàn tế bào M. hyo đã được xử lý bằng protein-A hoặc protein-G trước khi được thêm vào chế phẩm gây miễn dịch.

Theo một phương án, phần hòa tan của chế phẩm M. hyo bao gồm ít nhất một kháng nguyên protein M. hyo. Theo phương án khác, phần hòa tan của chế phẩm M. hyo bao gồm hai hoặc nhiều kháng nguyên protein M. hyo.

Theo một số phương án, chế phẩm gây miễn dịch theo sáng chế còn bao gồm ít nhất một kháng nguyên bổ sung. Theo một phương án, ít nhất một kháng nguyên bổ sung phòng ngừa vi sinh vật mà có thể gây bệnh ở lợn.

Theo một phương án, vi sinh vật bao gồm vi khuẩn, virus hoặc động vật nguyên sinh. Theo phương án khác, vi sinh vật được chọn từ, nhưng không chỉ giới hạn ở, nhóm bao gồm: circovirus typ 2 ở lợn (porcine circovirus type 2: PCV2), 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 cúm ở lợn (swine influenza virus: SIV), kháng nguyên *Escherichia coli*, *Brachyspira hyodysenteriae*, coronavirus hô hấp ở lợn, virus gây dịch tiêu chảy ở lợn (Porcine Epidemic Diarrhea: PED), rotavirus, virus Torque teno (TTV), virus cực bào ở lợn, virus đường ruột ở lợn, vectơ gây bệnh viêm não-cơ tim, tác nhân gây bệnh Aujeszky, dịch tả lợn (Classical Swine fever: CSF) và tác nhân gây bệnh viêm dạ dày-ruột truyền nhiễm ở lợn, hoặc tổ hợp của

chúng.

Theo một số phương án, ít nhất một kháng nguyên bổ sung là kháng nguyên circovirut typ 2 (PCV2), kháng nguyên virut PRRS hoặc tổ hợp của chúng. Theo một phương án, chế phẩm gây miễn dịch này tạo ra đáp ứng miễn dịch phòng ngừa ở lợn kháng cả M. hyo lẫn PCV2. Theo phương án khác, chế phẩm gây miễn dịch này tạo ra đáp ứng miễn dịch phòng ngừa ở lợn kháng M. hyo, PCV2 và virut PRRS.

Theo một phương án, kháng nguyên PCV2 là ở dạng circovirut typ 1-typ 2 dạng khảm, virut dạng khảm này bao gồm circovirut typ 1 tái tổ hợp bất hoạt ở lợn biểu hiện protein ORF2 của circovirut typ 2 ở lợn. Theo phương án khác, kháng nguyên PCV2 là ở dạng protein ORF2 tái tổ hợp. Theo phương án khác nữa, protein ORF2 tái tổ hợp được biểu hiện từ vectơ baculovirut.

Theo một số phương án, chế phẩm gây miễn dịch theo sáng chế còn chứa tá dược. Theo một phương án, tá dược được chọn từ, nhưng không chỉ giới hạn ở, các tá dược sau: tá dược dầu trong nước, tá dược polyme và nước, tá dược nước trong dầu, tá dược nhôm hydroxit, tá dược vitamin E và tổ hợp của chúng. Theo phương án khác, chế phẩm gây miễn dịch theo sáng chế còn chứa chất mang được dụng.

Theo một số phương án, chế phẩm gây miễn dịch theo sáng chế còn chứa tá dược tạo ra đáp ứng miễn dịch phòng ngừa M. hyo khi được dùng dưới dạng liều duy nhất. Theo các phương án khác, chế phẩm gây miễn dịch này tạo ra đáp ứng miễn dịch phòng ngừa M. hyo và ít nhất một vi sinh vật bổ sung mà có thể gây bệnh ở lợn khi được dùng dưới dạng liều duy nhất. Theo phương án khác nữa, chế phẩm gây miễn dịch theo sáng chế tạo ra đáp ứng miễn dịch phòng ngừa cả M. hyo lẫn ít nhất một vi sinh vật bổ sung mà có thể gây bệnh ở lợn khi được dùng dưới dạng hai liều.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp gây miễn dịch cho lợn kháng M. hyo. Phương pháp này bao gồm việc cho lợn sử dụng chế phẩm gây miễn dịch chứa phần hòa tan của chế phẩm toàn tế bào M. hyo, trong đó phần hòa tan của chế phẩm M. hyo là hầu như không chứa cả (i) IgG lẫn (ii) phức chất miễn dịch gồm kháng nguyên liên kết với globulin miễn dịch. Theo một phương án, phần hòa tan của chế phẩm M. hyo của chế phẩm gây miễn dịch được dùng chứa ít nhất một kháng nguyên protein M. hyo.

Theo một phương án của sáng chế, chế phẩm gây miễn dịch được dùng qua đường trong bắp, qua đường trong da, qua đường da hoặc qua đường dưới da. Theo phương án khác của sáng chế, chế phẩm gây miễn dịch được dùng trong một liều duy nhất. Theo

phương án khác nữa của sáng chế, chế phẩm gây miễn dịch được dùng dưới dạng hai liều.

Theo phương án khác của sáng chế, chế phẩm gây miễn dịch được dùng kết hợp với ít nhất một kháng nguyên bổ sung phòng ngừa vi sinh vật mà có thể gây bệnh ở lợn, như một hoặc nhiều vi sinh vật được mô tả trên đây. Các kháng nguyên khác này có thể được dùng đồng thời với chế phẩm M. hyo (tức là dưới dạng các chế phẩm gây miễn dịch đơn lẻ riêng biệt) hoặc kết hợp thành chế phẩm gây miễn dịch dùng ngay.

Theo phương án khác, chế phẩm gây miễn dịch được dùng cho lợn có kháng thể được tạo ra từ mẹ kháng M. hyo. Theo phương án khác nữa, chế phẩm gây miễn dịch được dùng cho lợn có kháng thể được tạo ra từ mẹ kháng cả M. hyo lẫn ít nhất một vi sinh vật khác mà có thể gây bệnh ở lợn.

Theo một phương án, chế phẩm gây miễn dịch được dùng cho lợn 3 tuần tuổi hoặc lớn hơn.

Sáng chế còn đề xuất kit. Kit này chứa lọ chứa chế phẩm gây miễn dịch. Chế phẩm gây miễn dịch này chứa phần hòa tan của chế phẩm toàn tế bào *Mycoplasma hyopneumoniae* (M. hyo), trong đó phần hòa tan của chế phẩm M. hyo là hầu như không chứa cả (i) IgG lẫn (ii) phức chất kháng nguyên/globulin miễn dịch. Theo một phương án, kit này còn chứa cảm nang hướng dẫn chứa thông tin về cách dùng chế phẩm gây miễn dịch.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất phương pháp bào chế chế phẩm gây miễn dịch. Phương pháp này bao gồm các bước: i) nuôi cấy M. hyo trong môi trường thích hợp trong khoảng thời gian 18-144 giờ; ii) tiếp theo làm bất hoạt giống M. hyo; iii) thu hoạch dịch nuôi cấy đã được làm bất hoạt, trong đó dịch nuôi cấy đã được làm bất hoạt chứa chế phẩm toàn tế bào M. hyo chứa cả phân đoạn chất lỏng hòa tan lẫn thành phần tế bào không hòa tan; iv) tách phân đoạn chất lỏng hòa tan ra khỏi thành phần tế bào không hòa tan; và v) loại bỏ hầu hết cả IgG lẫn phức chất kháng nguyên/globulin miễn dịch ra khỏi phân đoạn chất lỏng hòa tan.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là đồ thị thể hiện hiệu quả của chế phẩm gây miễn dịch đơn trị M. hyo được bào chế bằng kháng nguyên M. hyo từ các nhóm điều trị khác nhau (T02-T10 được mô tả trong Ví dụ 3) so với thuốc vờ (T01). Kết quả được thể hiện dưới dạng % trị số trung bình bình phương tối thiểu tổn thương phổi.

Fig.2 là đồ thị thể hiện kết quả về hoạt lực của kháng nguyên PCV2 (ELISA đối với

kháng nguyên PCV2) của chế phẩm gây miễn dịch M. hyo kết hợp với virus dạng khảm PCV Typ1-Typ2 chết. Virus dạng khảm này được đưa vào chế phẩm gây miễn dịch ở mức ban đầu khoảng $1,6 < RP$. Vị trí của mỗi mẫu được thể hiện dưới dạng hoạt lực tương đối (relative potency: RP).

Fig.3 là đồ thị thể hiện kết quả về virus huyết PCV2 (PCR định lượng đối với PCV2) quan sát được với các chế phẩm vaccin PCV/M. hyo bằng cách sử dụng các nền tá được khác nhau.

Fig.4 là đồ thị thể hiện kết quả huyết thanh học ELISA (S/P) đối với kháng thể PCV2 quan sát được với các chế phẩm vaccin PCV/M. hyo bằng cách sử dụng các nền tá được khác nhau vào các ngày 1, 20 và 42 dùng liều quyết định.

Fig.5 là đồ thị thể hiện mức thải PCV2 qua phân thu được với các nhóm điều trị T02-T04 được mô tả trong Ví dụ 7 so với thuốc vờ (T01). Kết quả được thể hiện dưới dạng số bản sao ADN của PCV2/ml.

Fig.6 là đồ thị thể hiện mức thải PCV2 qua mũi thu được với các nhóm điều trị T02-T04 được mô tả trong Ví dụ 7 so với thuốc vờ (T01). Kết quả được thể hiện dưới dạng số bản sao ADN của PCV2/ml.

Fig.7 (A & B) là các đồ thị thể hiện kết quả của thử nghiệm interferon-gama (IFN- γ) đo đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào (cellular mediated immune: CMI) đặc hiệu với PCV2. Kết quả sau chủng ngừa/trước khi dùng liều quyết định được thể hiện trên Fig.7A, và các kết quả sau khi chủng vaccin/sau khi thử thách được thể hiện trên Fig.7B. Sự kích thích 5×10^6 tế bào được coi là đáng kể (có ý nghĩa).

Fig.8 thể hiện hiệu quả của M. hyo của các chế phẩm vaccin thực nghiệm PCV2/M. hyo trong SP-dầu. Điểm số phối đối với các chế phẩm sử dụng các nhóm điều trị T02-T08 bằng M. hyo so với thuốc vờ (T01) được vẽ thành đồ thị trên Fig.8A. Bảng X trên Fig.8B thể hiện sự trái ngược của nhóm điều trị T02-T08 với thuốc vờ.

Fig.9 là biểu đồ tiến trình thể hiện một phương án về quy trình sản xuất được dùng để bào chế kháng nguyên M. hyo đã được xử lý bằng Protein-A tương thích với PCV2.

Fig.10 là bảng thể hiện việc đánh giá tá dược về hoạt tính diệt virus PRRS.
Mô tả vắn tắt các trình tự

SEQ ID NO: 1 là một phương án về trình tự nucleotit mã hóa p46 từ chủng P-5722 của M. hyo;

SEQ ID NO: 2 là một phương án về trình tự axit amin tương ứng với p46 từ chủng

P-5722 của M. hyo;

SEQ ID NO: 3 là một phương án về trình tự nucleotit mã hóa p97 từ chủng P-5722 của M. hyo;

SEQ ID NO: 4 là một phương án về trình tự axit amin tương ứng với p97 từ chủng P-5722 của M. hyo;

SEQ ID NO: 5 là một phương án về trình tự hệ gen mã hóa virus dạng khảm PCV1-2;

SEQ ID NO: 6 là một phương án về trình tự nucleotit tương ứng với ORF2 của circovirus lợn;

SEQ ID NO: 7 là một phương án về trình tự axit amin tương ứng với polypeptit ORF2 của circovirus lợn;

SEQ ID NO: 8 là một phương án về trình tự hệ gen mã hóa virus dạng khảm PCV1-2;

SEQ ID NO: 9 là một phương án về trình tự nucleotit tương ứng với ORF2 của circovirus lợn;

SEQ ID NO: 10 là một phương án về trình tự axit amin tương ứng với polypeptit ORF2 của circovirus lợn;

SEQ ID NO: 11 là một phương án về trình tự axit amin tương ứng với polypeptit ORF2 của circovirus lợn;

SEQ ID NO: 12 là một phương án về trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin SEQ ID NO: 11;

SEQ ID NO: 13 là một phương án về trình tự axit amin tương ứng với polypeptit ORF2 của circovirus lợn;

SEQ ID NO: 14 là một phương án về trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin SEQ ID NO: 13;

SEQ ID NO: 15 là một phương án về trình tự axit amin tương ứng với polypeptit ORF2 của circovirus lợn;

SEQ ID NO: 16 là một phương án về trình tự hệ gen của dạng không độc của thể phân lập virus PRRS Bắc Mỹ có ký hiệu P129;

SEQ ID NO: 17 là một phương án về trình tự nucleotit tương ứng với ORF2 đến ORF5 của thể phân lập virus PRRS có ký hiệu ISU-55.

SEQ ID NO: 18 là một phương án về trình tự nucleotit tương ứng với ORF6 và ORF7 của thể phân lập virus PRRS có ký hiệu ISU-55.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất chế phẩm gây miễn dịch chứa phần hòa tan của chế phẩm toàn tế bào M. hyo, trong đó phần hòa tan của chế phẩm M. hyo là hầu như không chứa cả (i) IgG lẫn (ii) phức chất miễn dịch liên kết với kháng nguyên. Các tác giả sáng chế ngạc nhiên phát hiện ra rằng phân đoạn không hòa tan của chế phẩm toàn tế bào M. hyo là không gây miễn dịch. Ngược lại, chế phẩm hòa tan M. hyo không chứa IgG là gây miễn dịch và có thể được kết hợp hữu hiệu với kháng nguyên từ các tác nhân gây bệnh khác, như PCV2, mà không cần can thiệp bằng phân tích hoặc miễn dịch học giữa các kháng nguyên. Điều này khiến cho chế phẩm hòa tan M. hyo theo sáng chế trở thành cơ sở hữu hiệu cho các vaccin đa trị, bao gồm cả các chế phẩm một lọ dùng ngay. Các tác giả sáng chế cũng ngạc nhiên phát hiện ra rằng việc loại bỏ globulin miễn dịch và cận tế bào không hòa tan giúp tăng cường độ an toàn của vaccin.

Như được sử dụng trong bản mô tả này và yêu cầu bảo hộ, dạng số ít bao gồm số nhiều trừ khi được chỉ rõ. Ví dụ, thuật ngữ “kháng nguyên protein” bao gồm các kháng nguyên protein, bao gồm cả hỗn hợp của chúng.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “chứa” có nghĩa là vaccin và phương pháp bao gồm các thành phần được viện dẫn, song không loại trừ các thành phần khác.

Như được xác định trong bản mô tả này, phần hòa tan của chế phẩm toàn tế bào M. hyo chỉ phân đoạn lỏng hòa tan của chế phẩm toàn tế bào M. hyo sau khi tách thành phần không hòa tan và loại bỏ hầu hết IgG và phức chất miễn dịch liên kết với kháng nguyên. Phần hòa tan M. hyo có thể còn được chỉ ra trong bản mô tả này là phân đoạn dịch nổi, dịch nổi nuôi cấy hoặc thuật ngữ tương tự. Nó bao gồm các protein hòa tan do M. hyo-biểu hiện (kháng nguyên protein M. hyo) đã được tách hoặc phân lập ra khỏi protein không hòa tan, toàn vi khuẩn, và thành phần tế bào M. hyo không hòa tan khác bằng các phương pháp thông thường, như ly tâm, lọc hoặc kết tủa. Ngoài các protein hòa tan đặc hiệu M. hyo, phần hòa tan của chế phẩm toàn tế bào M. hyo còn bao gồm các protein khác loại, như các protein dùng trong môi trường nuôi cấy để lên men M. hyo.

Thuật ngữ “kháng nguyên” chỉ hợp chất, thành phần hoặc chất gây miễn dịch mà

có thể kích thích sự tạo ra kháng thể hoặc đáp ứng tế bào T, hoặc cả hai, ở động vật, bao gồm cả các thành phần được tiêm hoặc hấp thụ vào động vật. Đáp ứng miễn dịch có thể đề tạo ra đối với toàn phân tử hoặc một phần của phân tử (ví dụ, epitop hoặc hapten).

Như được xác định trong bản mô tả này, “chế phẩm gây miễn dịch hoặc chế phẩm miễn dịch hoặc vacxin” chỉ thành phần vật chất chứa ít nhất một kháng nguyên mà tạo ra đáp ứng miễn dịch ở vật chủ thuộc đáp ứng miễn dịch tế bào hoặc đáp ứng miễn dịch có trung gian kháng thể chống lại chế phẩm hoặc vacxin.

Thuật ngữ “đáp ứng miễn dịch” như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ đáp ứng để tạo ra ở động vật. Đáp ứng miễn dịch có thể chỉ tính miễn dịch tế bào (cellular immunity: CMI); tính miễn dịch thể dịch hoặc có thể liên quan đến cả hai. Sáng chế cũng bao hàm đáp ứng được 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: tạo ra hoặc hoạt hóa kháng thể, tế bào B, tế bào T giúp, tế bào T ức chế, tế bào T gây độc tế bào và/hoặc tế bào T yd, kháng đặc hiệu kháng nguyên hoặc các kháng nguyên chứa trong chế phẩm hoặc vacxin nghiên cứu. Tốt hơn, nếu vật chủ sẽ biểu hiện đáp ứng miễn dịch điều trị hoặc phòng ngừa sao cho tính chống chịu đợt nhiễm mới được tăng cường và/hoặc mức độ trầm trọng lâm sàng của bệnh là giảm. Sự phòng ngừa như vậy sẽ được chứng minh bởi sự giảm hoặc thiếu các triệu chứng mà thường biểu hiện ở vật chủ bị nhiễm, thời gian phục hồi nhanh hơn và/hoặc hiệu giá virus giảm ở vật chủ bị nhiễm.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “tính gây miễn dịch” nghĩa là 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 tạo cơ sở cho tính miễn dịch phòng ngừa được kích thích bởi vacxin đối với sinh vật bị nhiễm cụ thể.

“Tá dược” như được sử dụng trong bản mô tả này nghĩa là chế phẩm chứa một hoặc nhiều chất tăng cường đáp ứng miễn dịch với (các) kháng nguyên. Cơ chế tác động của tá dược chưa được hiểu một cách đầy đủ. Một số tá dược được tin là tăng cường đáp ứng miễn dịch bằng cách giải phóng từ từ kháng nguyên, trong khi các tá dược khác gây miễn dịch mạnh theo cách riêng của chúng và được tin là có tác dụng hiệp đồng.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “đa trị” có nghĩa là vacxin chứa nhiều hơn một kháng nguyên bất kể từ cùng loài (tức là các thể phân lập khác của *Mycoplasma hyopneumoniae*), từ loài khác (tức là các thể phân lập từ cả *Pasteurella*

hemolytica lẫn *Pasteurella multocida*), hoặc vaccin chứa kết hợp các kháng nguyên từ các chủng khác nhau (ví dụ, vaccin chứa các kháng nguyên từ *Pasteurella multocida*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Haemophilus somnus* và *Clostridium*).

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

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "độc" có nghĩa là thể phân lập giữ lại được khả năng lây nhiễm trong vật chủ.

"Vaccin bất hoạt" có nghĩa là vaccin chứa sinh vật gây nhiễm hoặc tác nhân gây bệnh không còn khả năng sao chép hoặc sinh trưởng, tác nhân 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 thimerosal hoặc formalin), sóng âm, chiếu xạ, nhiệt hoặc phương pháp thông thường khác bất kỳ đủ để ngăn ngừa sự sao chép hoặc sinh trưởng của sinh vật này trong khi vẫn giữ được tính gây miễn dịch của nó.

Thuật ngữ "biến thể" như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ polypeptit hoặc trình tự axit nucleic mã hóa polypeptit, mà có một hoặc nhiều biến đổi axit amin bảo toàn hoặc các cải biến nhỏ khác sao cho polypeptit tương ứng có chức năng hầu như tương đương so với polypeptit kiểu dại.

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

Như được sử dụng trong bản mô tả này, các thuật ngữ "chất mang được dụng" và "chất dẫn được dụng" có thể thay thế cho nhau và chỉ chất dẫn lỏng để chứa các kháng nguyên của vaccin có thể được tiêm vào vật chủ mà không gây tác dụng phụ. Các 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 làm ẩm, chất nhũ hóa, chất đệm pH, chất phụ gia tăng cường độ nhớt, chất màu và chất tương tự.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "vacxin" chứa ít nhất một kháng nguyên hoặc chất gây miễn dịch trong chất dẫn được dụng hữu ích để tạo ra đáp ứng miễn dịch ở vật chủ. Vacxin có thể được dùng theo liều và bằng các kỹ thuật được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực y học hoặc thú y biết rõ, có xét đến các yếu tố như độ tuổi, giới tính, thể trọng, loài và tình trạng của động vật tiếp nhận và đường dùng. Đường dùng có thể là qua da, qua màng nhầy (ví dụ, qua đường miệng, qua đường mũi, qua đường hậu môn, qua đường âm đạo) hoặc ngoài đường tiêu hóa (nội bì, qua da, trong bắp, dưới da, trong tĩnh mạch hoặc trong màng bụng). Vacxin có thể được sử dụng một mình, hoặc có thể được sử dụng đồng thời hoặc theo thứ tự với các điều trị hoặc liệu pháp khác. Dạng sử dụng có thể bao gồm huyền phù, sirô hoặc cốm, và các chế phẩm để dùng ngoài đường tiêu hóa, dưới da, nội bì, trong bắp hoặc trong tĩnh mạch (ví dụ, thuốc tiêm) như huyền phù hoặc nhũ tương vô trùng. Vacxin có thể được dùng dưới dạng thuốc xịt hoặc trộn vào thức ăn và/hoặc nước hoặc phân phối được dạng hỗn hợp với chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược thích hợp như nước vô trùng, nước muối sinh lý, glucoza, hoặc chất tương tự. Vacxin có thể chứa các chất phụ trợ như chất làm ẩm hoặc nhũ hóa, chất đệm pH, tá dược, chất tạo gel hoặc chất phụ gia tăng cường độ nhớt, chất bảo quản, chất điều vị, chất màu, và chất tương tự, tùy theo đường dùng và chế phẩm mong muốn. Sách được chuẩn, như "Remington's Pharmaceutical Sciences," 1990 có thể được tham khảo để bào chế các chế phẩm thích hợp, mà không cần thực nghiệm nhiều.

"Virus PRRS Bắc Mỹ" có nghĩa là virus PRRS có các đặc tính di truyền liên quan đến thể phân lập virus PRRS Bắc Mỹ, như, nhưng không chỉ giới hạn ở, virus PRRS phân lập được lần đầu tiên ở Mỹ khoảng trước những năm 1990 (ví dụ, xem Collins, J. E., et al., 1992, J. Vet. Diagn. Invest. 4:117-126); thể phân lập virus PRRS Bắc Mỹ MN-lb (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 virus PRRS Bắc Mỹ VR 2385 (Meng, X.-J et al., 1994, J. Gen. Virol. 75:1795-1801). Các ví dụ

khác về chủng virus PRRS Bắc Mỹ sẽ được mô tả trong bản mô tả này. Các đặc tính di truyền chỉ tính tương đồng về trình tự nucleotit hệ gen và tính tương đồng về axit amin giữa các chủng virus PRRS Bắc Mỹ. Các chủng virus PRRS Trung Quốc thường có khoảng 80-93% tương đồng về trình tự nucleotit với các chủng Bắc Mỹ.

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

Virus được cải biến di truyền là "giảm độc lực" nếu nó ít độc hơn so với chủng gốc không được cải biến. Một chủng là "ít độc hơn" nếu nó biểu hiện mức giảm có ý nghĩa thống kê ở một hoặc nhiều thông số xác định mức độ nghiêm trọng của bệnh. Các thông số này có thể bao gồm mức virus huyết, sốt, mức độ nghiêm trọng của chứng khó thở, mức độ nghiêm trọng của các triệu chứng sinh sản, số lượng hoặc mức độ nghiêm trọng của các tổn thương phổi, v.v..

"Dòng gây nhiễm" là hệ gen được phân lập hoặc được nhân dòng của tác nhân gây bệnh (ví dụ, virus) mà có thể được cải biến một cách đặc hiệu và có chủ đích trong phòng thí nghiệm và tiếp theo dùng để tái tạo sinh vật được cải biến di truyền sống. Virus được cải biến di truyền sống được tạo ra từ dòng gây nhiễm có thể được sử dụng trong vaccine virus sống. Theo cách khác, vaccine virus bất hoạt có thể được bào chế bằng cách xử lý virus sống được tạo ra từ dòng gây nhiễm bằng các tác nhân làm bất hoạt như formalin hoặc dung môi kỵ nước, axit, v.v., bằng cách chiếu ánh sáng cực tím hoặc tia X, bằng cách gia nhiệt, v.v...

Tất cả các vaccine M. hyo hiện có đều được bào chế từ các chế phẩm *Mycoplasma* toàn tế bào chết (bacterin). Ngược lại, sáng chế sử dụng phần hòa tan của chế phẩm toàn tế bào *Mycoplasma hyopneumoniae* (M. hyo), trong đó phần hòa tan của chế phẩm M. hyo là hầu như không chứa cả (i) IgG lẫn (ii) phức chất miễn dịch gồm kháng nguyên liên kết với globulin miễn dịch.

M. hyo có các nhu cầu tuyệt đối về các sterol và axit béo ngoại sinh. Các nhu cầu này thường đòi hỏi M. hyo phải sinh trưởng trong môi trường chứa huyết thanh, như huyết thanh lợn. Việc tách chất không hòa tan ra khỏi phần hòa tan của chế phẩm toàn tế

bào M. hyo (ví dụ, bằng cách ly tâm, lọc hoặc kết tủa) không loại bỏ IgG hoặc phức chất miễn dịch của lợn. Theo một phương án của sáng chế, phần hòa tan của M. hyo được xử lý bằng protein-A hoặc protein-G để hầu như loại bỏ IgG và phức chất miễn dịch chứa trong dịch nổi nuôi cấy. Theo phương án này, cần hiểu rằng bước xử lý bằng protein A diễn ra sau bước lên men M. hyo. Bước này còn được đề cập trong bản mô tả này là xử lý bằng protein A xuôi dòng. Theo phương án khác, việc xử lý môi trường sinh trưởng bằng protein A ngược dòng (tức là trước khi lên men M. hyo) có thể được sử dụng. Protein A liên kết với phần Fc của IgG. Protein G liên kết chủ yếu với phần Fc của IgG, song cũng có thể liên kết với vùng Fab. Phương pháp tinh chế/loại bỏ IgG tổng số ra khỏi hỗn hợp protein, như dịch nổi nuôi cấy mô, huyết thanh và dịch cổ trướng là được biết rõ trong lĩnh vực này.

Theo một số phương án, phần hòa tan của chế phẩm M. hyo bao gồm ít nhất một kháng nguyên protein M. hyo. Theo các phương án khác, phần hòa tan của chế phẩm M. hyo chứa hai hoặc nhiều kháng nguyên protein M. hyo.

Theo một phương án, phân đoạn dịch nổi M. hyo chứa một hoặc nhiều kháng nguyên protein đặc hiệu với M. hyo sau: Các protein M. hyo có trọng lượng phân tử khoảng 46kD (p46), 64kD (p64) và 97kD (p97). Theo phương án khác, phân đoạn dịch nổi ít nhất là chứa các protein M. hyo p46, p64 và p97. Protein M. hyo có trọng lượng phân tử 64kD (p64) có thể còn được đề cập trong bản mô tả này là kháng nguyên bề mặt p65 từ M. hyo được mô tả bởi Kim và các đồng tác giả [Infect. Immun. 58(8):2637-2643 (1990)], cũng như trong bằng sáng chế Mỹ số 5,788,962.

Futo và các đồng tác giả mô tả việc nhân dòng và xác định đặc điểm của protein bề mặt 46kD từ M. hyo, protein này có thể được sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế [J. Bact 177: 1915-1917 (1995)]. Theo một phương án, dịch nổi nuôi cấy M. hyo chứa p46 mà các trình tự nucleotit và axit amin tương ứng của nó từ chủng P-5722 lần lượt được nêu trong các SEQ ID NO: 1 và 2. Theo phương án khác, biến thể của các trình tự p46 này có thể được sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế, như được mô tả dưới đây.

Zhang và các đồng tác giả mô tả và xác định đặc điểm của protein bám dính p97 của M. hyo [Infect. Immun. 63: 1013-1019, 1995]. Ngoài ra, King và các đồng tác giả mô tả protein 124kD Mhpl từ chủng P-5722 của M. hyo và thể hiện số liệu cho thấy rằng Mhpl và p97 là cùng protein [Vaccine 15:25-35 (1997)]. Các protein p97 này có thể được

sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế. Theo một phương án, dịch nổi nuôi cấy *M. hyo* chứa p97 mà các trình tự nucleotit và axit amin tương ứng của nó từ chủng P-5722 lần lượt được nêu trong các SEQ ID NO: 3 và 4. Theo phương án khác, biến thể của các trình tự p97 này có thể được sử dụng trong vacxin theo sáng chế, như được mô tả dưới đây.

Dịch nổi nuôi cấy *M. hyo* có thể còn chứa các kháng nguyên protein đặc hiệu với *M. hyo* như, nhưng không chỉ giới hạn ở, các protein có trọng lượng phân tử khoảng 41kD (p41), 42kD (p42), 89kD (p89) và 65kD (p65). Xem Okada et al., 2000, J. Vet. Med. B 47:527-533 và Kim et al., 1990, Infect. Immun. 58(8):2637-2643. Ngoài ra, dịch nổi nuôi cấy *M. hyo* có thể chứa các kháng nguyên protein đặc hiệu với *M. hyo* có trọng lượng phân tử khoảng 102kD (p102) và 216kD (p216). Xem bằng sáng chế Mỹ các số 6,162,435 và 7,419,806 cấp cho Minnion và các đồng tác giả.

Chủng *M. hyo* bất kỳ đều có thể được sử dụng để sản xuất phần hòa tan của chế phẩm *M. hyo* theo sáng chế. Các chủng *M. hyo* thích hợp có thể được thu từ các nguồn thương mại hoặc học viện, bao gồm các nguồn lưu giữ như Bộ sưu tập chủng giống kiểu Mỹ (American Type Culture Collection: ATCC) (Manassas, Va.) và bộ sưu tập giống NRJRL (Agricultural Research Service, u.s. Department of Agriculture, Peoria, 111.). Riêng ATCC liệt kê sáu chủng *M. hyo* sau để bán: *M. hyo* ATCC 25095, *M. hyo* ATCC 25617, *M. hyo* ATCC 25934, *M. hyo* ATCC 27714, *M. hyo* ATCC 27715 và *M. hyo* ATCC 25934D. Chủng *M. hyo* được ưu tiên sử dụng trong các phương án của sáng chế được nhận dạng là chủng P-5722-3, ATCC #55052, lưu giữ vào ngày 30-5-1990 theo các điều luật do Phòng Sáng chế và Nhãn hiệu Hoa Kỳ yêu cầu. Do có sự lây lan của bệnh, các chủng có thể còn được thu bằng cách thu hồi *M. hyo* từ chất tiết hoặc mô phổi từ lợn bị nhiễm các chủng đã biết gây bệnh viêm phổi do *Mycoplasma* ở lợn.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cần lưu ý rằng các biến thể của trình tự *M. hyo* có thể được sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế. Các biến thể này có thể thay đổi về mức tương đồng trình tự tới 10-20% và vẫn giữ được các đặc tính kháng nguyên mà làm cho nó hữu ích trong vacxin. Tốt hơn, nếu biến thể *M. hyo* có mức tương đồng trình tự ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 85%, tốt hơn là ít nhất 90%, thậm chí tốt hơn là ít nhất 95% so với trình tự hệ gen có chiều dài đầy đủ của chủng *M. hyo* kiểu đại. Các đặc tính kháng nguyên của vacxin có thể, ví dụ, được ước tính bằng thí nghiệm về liều quyết định như được đề cập trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế. Hơn nữa, các đặc tính

kháng nguyên của kháng nguyên M. hyo đã được cải biến tạo ra mức miễn dịch phòng ngừa ít nhất là 70%, tốt hơn là 80%, tốt hơn là 90% so với protein M. hyo kiểu dại.

Theo một phương án, kháng nguyên p46 hòa tan của M. hyo được đưa vào vaccin theo sáng chế ở nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 1,5 µg/ml đến 10 µg/ml, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 2 µg/ml đến 6 µg/ml. Cần lưu ý rằng p46 là protein dùng cho thử nghiệm về hoạt lực của M. hyo (xem phần ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây). Theo phương án khác, kháng nguyên M. hyo có thể được đưa vào vaccin với lượng cuối nằm trong khoảng từ 5,5% đến 35% tổng lượng dịch nuôi cấy M. hyo đã được xử lý bằng protein A.

Chế phẩm hòa tan M. hyo theo sáng chế vừa an toàn vừa có tác dụng kháng M. hyo và thích hợp để dùng dưới dạng liều duy nhất. Ngoài ra, các tác giả sáng chế ngạc nhiên phát hiện ra rằng chế phẩm hòa tan M. hyo có thể được kết hợp hữu hiệu với kháng nguyên từ các tác nhân gây bệnh khác mà không có sự ngăn cản miễn dịch giữa các kháng nguyên. Điều này làm cho chế phẩm hòa tan M. hyo trở thành cơ sở hữu hiệu cho các vaccin đa trị. Các kháng nguyên bổ sung có thể được sử dụng đồng thời với chế phẩm M. hyo (tức là dưới dạng các vaccin đơn lẻ riêng biệt) hoặc kết hợp thành vaccin dùng ngay.

Theo một phương án, vaccin theo sáng chế chứa ít nhất một kháng nguyên hòa tan M. hyo và ít nhất một kháng nguyên bổ sung. Theo một phương án, ít nhất một kháng nguyên bổ sung phòng ngừa vi sinh vật mà có thể gây bệnh ở lợn.

Theo một số phương án, ít nhất một thành phần kháng nguyên bổ sung phòng ngừa vi khuẩn, virus hoặc động vật nguyên sinh mà được biết là gây nhiễm cho lợn. Ví dụ về các vi sinh vật này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các sinh vật sau: circovirus typ 2 ở lợn (PCV2), virus gây hội chứng sinh sản và hô hấp ở lợn (PRRSV), parvovirus ở 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 cúm ở lợn (SIV), kháng nguyên *Escherichia coli*, *Brachyspira hyodysenteriae*, coronavirus hô hấp ở lợn, virus gây dịch tiêu chảy ở lợn (PED), rotavirus, Torque teno virus (TTV), virus cự bào ở lợn, virus đường ruột ở lợn, vectơ 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 tổ hợp của chúng.

Theo một phương án, vaccin theo sáng chế chứa hỗn hợp gồm ít nhất một (ví dụ, hai hoặc nhiều) kháng nguyên hòa tan M. hyo và kháng nguyên PCV2. Theo phương án khác, vaccin này tạo ra đáp ứng miễn dịch phòng ngừa ở lợn kháng cả M. hyo lẫn PCV2.

Theo một phương án, vaccin kết hợp M. hyo/PCV2 theo sáng chế được đề xuất dưới dạng liều duy nhất, dùng ngay trong một lọ vaccin. Vaccin kết hợp dùng ngay này không cần phải trộn các vaccin riêng biệt, nên không có nguy cơ lẫn tạp chất hoặc thao tác bổ sung liên quan đến việc trộn và không cần phải dùng hỗn hợp này trong vòng vài giờ. Tương tự, vaccin hỗn hợp M. hyo/PCV2 một lọ làm giảm chất thải và không gian bảo quản của máy lạnh xuống còn một nửa. Hơn thế nữa, việc dùng một liều loại bỏ được thao tác liên quan đến việc dùng liều thứ hai cho động vật. cần lưu ý rằng mặc dù hiện có các vaccin kết hợp PCV2/M. hyo, song chúng được bào chế dưới dạng vaccin hai liều dùng ngay (Circumvent®PCVM) hoặc vaccin liều duy nhất hai lọ, đòi hỏi phải dùng đồng thời hai vaccin riêng biệt (ví dụ, Ingelvac CircoFLEX® và Ingelvac MycoFLEX®). Tốt hơn, nếu vaccin kết hợp M. hyo/PCV2 theo sáng chế tương thích với các kháng nguyên khác, như kháng nguyên virus PRRS, sao cho tất cả các kháng nguyên đều được dùng trong một liều duy nhất.

Theo một số phương án, thành phần kháng nguyên PCV2 của vaccin kết hợp M. hyo/PCV2 là ở dạng khảm circovirus typ 1-typ 2. Virus dạng khảm này chứa circovirus typ 1 ở lợn tái tổ hợp bất hoạt biểu hiện protein ORF2 của circovirus typ 2 ở lợn. Circovirus lợn dạng khảm và phương pháp bào chế nó được mô tả trong WO 03/049703 A2, cũng như trong bằng sáng chế Mỹ các số 7,279,166 và 7,575,752, các tài liệu này được đưa vào bản mô tả này theo cách viện dẫn.

Theo một phương án, trình tự ADN có chiều dài đầy đủ của hệ gen virus dạng khảm PCV1-2 tương ứng với SEQ ID NO: 5 hoặc biến thể của nó, như được mô tả dưới đây. Theo phương án khác, gen capsit của ORF2 gây miễn dịch của virus dạng khảm PCV1-2 tương ứng với SEQ ID NO: 6. Theo phương án khác, trình tự axit amin của protein ORF2 gây miễn dịch do virus dạng khảm PCV1-2 biểu hiện tương ứng với SEQ ID NO: 7.

Theo phương án khác nữa, trình tự ADN có chiều dài đầy đủ của hệ gen virus dạng khảm PCV1-2 tương ứng với SEQ ID NO: 8. Theo một phương án, gen capsit ORF2 gây

miễn dịch của virus PCV1-2 dạng khả tương ứng với SEQ ID NO: 9. Theo phương án khác, gen capsit của protein ORF2 gây miễn dịch của virus dạng khả PCVT- 2 tương ứng với SEQ ID NO: 10.

Tuy nhiên, ADN ORF2 của PCV2 và protein của virus dạng khả PCV1-2 không bị giới hạn ở các trình tự được mô tả trên đây do ADN ORF2 của PCV2 và protein là vùng có tính bảo toàn cao trong các thể phân lập PCV2.

Theo một số phương án, thành phần kháng nguyên PCV2 của vacxin kết hợp M. hyo/PCV2 là ở dạng protein ORF2 tái tổ hợp. Theo một phương án, protein ORF2 tái tổ hợp được biểu hiện từ vectơ baculovirus. Theo cách khác, các vectơ biểu hiện đã biết khác có thể được sử dụng, như bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, vectơ parapoxvirus.

Theo một phương án, protein ORF2 của PCV2 tái tổ hợp là protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 11, được mã hóa bởi SEQ ID NO: 12 (Số truy cập trong ngân hàng gen AF086834). Theo phương án khác, protein ORF2 tái tổ hợp là protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 13, được mã hóa bởi SEQ ID NO: 14. Theo phương án khác nữa, protein ORF2 tái tổ hợp tương ứng với SEQ ID NO: 15. Theo phương án khác nữa, protein ORF2 của PCV2 tái tổ hợp tương ứng với SEQ ID NO: 7. Theo phương án khác nữa, protein ORF2 của PCV2 tái tổ hợp tương ứng với SEQ ID NO: 10.

Tuy nhiên, sáng chế không được giới hạn ở các trình tự ADN và protein ORF2 cụ thể được mô tả trên đây. Do ADN và protein ORF2 của PCV2 là vùng có tính bảo toàn cao trong các thể phân lập PCV2, ORF2 của PCV2 có thể là hữu hiệu làm nguồn ADN và/hoặc polypeptit ORF2 của PCV2 khi được sử dụng trong virus dạng khả PCV1-2 hoặc trong protein PCV2 tái tổ hợp.

Ví dụ về thể phân lập PCV2 thích hợp mà từ đó các trình tự ADN và protein ORF2 của PCV2 có thể để tạo ra là thể phân lập PCV2 số 40895 (lưu giữ trong ATCC vào ngày 7-12-2001 và được gán Mã lưu trữ ATCC cho sáng chế là PTA-3914).

Trình tự hệ gen (nucleotit) của thể phân lập PCV2 số 40895 là có thể sử dụng với số hiệu lưu giữ trong ngân hàng gen AF264042. Ví dụ khác về thể phân lập PCV2 mà từ đó các trình tự ADN và protein ORF2 của PCV2 có thể được tạo ra bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các thể phân lập: Imp.999, Imp.1010-Stoon, Imp. 1011-48121 và Imp. 1011- 48285. Số hiệu lưu giữ trong ngân hàng gen của các trình tự hệ gen tương ứng với các thể phân lập PCV2 này lần lượt là AF055391, AF055392, AF055393 và

AF055394.

Trong một số dạng, các phân gây miễn dịch của protein ORF2 của PCV2 được sử dụng làm thành phần kháng nguyên trong chế phẩm. Ví dụ, các dạng hoặc đoạn được cắt ngắn và/hoặc được thay thế của protein ORF2 của PCV2 có thể được sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cần lưu ý rằng biến thể của trình tự PCV2 có thể được sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế. Các biến thể này có thể thay đổi về mức tương đồng trình tự tới 10-20% và vẫn giữ được các đặc tính kháng nguyên mà làm cho nó hữu ích trong vaccin. Tốt hơn, nếu biến thể của PCV2 có mức tương đồng trình tự ít nhất là 80%, tốt hơn là ít nhất 85%, tốt hơn là ít nhất 90%, thậm chí tốt hơn là ít nhất 95% so với trình tự hệ gen có chiều dài đầy đủ của thể phân lập PCV2 kiểu đại. Các đặc tính kháng nguyên của vaccin có thể, ví dụ, được ước tính bằng thí nghiệm về liều quyết định như được đề cập trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế. Hơn nữa, các đặc tính kháng nguyên của kháng nguyên PCV2 đã được cải biến tạo ra mức miễn dịch phòng ngừa ít nhất 70%, tốt hơn là 80%, tốt hơn là 90% so với protein ORF2 của PCV2 kiểu đại.

Thành phần kháng nguyên PCV2 được đề xuất trong vaccin ở mức đưa vào kháng nguyên hữu hiệu tạo ra đáp ứng miễn dịch mong muốn, tức là làm giảm tỷ lệ mắc hoặc giảm mức độ nghiêm trọng của các dấu hiệu lâm sàng do nhiễm PCV2.

Theo một phương án, virus dạng khảm PCV1-2 được đưa vào vaccin theo sáng chế ở mức ít nhất $1,0 < RP < 5,0$, trong đó RP là đơn vị hoạt lực tương đối xác định được bằng ELISA định lượng kháng nguyên (thử nghiệm hoạt lực *in vitro*) so với vaccin so sánh. Theo phương án khác, virus dạng khảm PCV1-2 được đưa vào vaccin theo sáng chế ở nồng độ cuối khoảng 0,5% đến 5% kháng nguyên PCV1-2 đơn nguyên cô 20 lần (20X).

Theo phương án khác, protein tái tổ hợp ORF2 của PCV2 được đưa vào vaccin theo sáng chế ở mức ít nhất 0,2 μg kháng nguyên/ml vaccin cuối ($\mu\text{g}/\text{ml}$). Theo phương án khác, protein tái tổ hợp ORF2 của PCV2 được đưa vào ở mức nằm trong khoảng từ 0,2 đến 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Theo phương án khác nữa, protein tái tổ hợp ORF2 của PCV2 được đưa vào ở mức nằm trong khoảng từ 0,3 đến 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Theo phương án khác nữa, protein tái tổ hợp ORF2 của PCV2 được đưa vào ở mức nằm trong khoảng từ 0,35 đến 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Theo phương án khác nữa, protein tái tổ hợp ORF2 của PCV2 được đưa vào ở mức nằm trong khoảng từ 0,4 đến 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Theo một phương án, vaccin theo sáng chế chứa hỗn hợp gồm ít nhất một kháng nguyên hòa tan M. hyo (ví dụ, hai hoặc nhiều), kháng nguyên circovirus typ 2 ở lợn (PCV2), và kháng nguyên virus PRRS. Theo phương án khác, vaccin này tạo ra đáp ứng miễn dịch phòng ngừa ở lợn kháng M. hyo, PCV2 và virus PRRS.

Theo một phương án, vaccin kết hợp M. hyo/PCV2/PRRS theo sáng chế được đề xuất dưới dạng vaccin liều duy nhất hai lọ. Ví dụ, theo một số phương án, chế phẩm M. hyo/PCV2 được đề xuất dưới dạng chế phẩm lỏng ổn định trong lọ thứ nhất và virus PRRS được đề xuất ở trạng thái đông khô trong lọ thứ hai. Theo một số phương án, các kháng nguyên lợn bổ sung có thể được thêm vào lọ thứ nhất hoặc lọ thứ hai.

Theo một phương án, thành phần virus PRRS được đề xuất dưới dạng virus sống được cải biến di truyền, được làm đông khô. Trước khi dùng, chất lỏng M. hyo/PCV2 từ lọ thứ nhất có thể được dùng để hydrat hóa lại virus PRRS trong lọ thứ hai để cả ba kháng nguyên có thể được dùng cho động vật trong liều duy nhất, cần lưu ý rằng mặc dù hiện có các vaccin kết hợp PCV2/M. hyo/PRRS, song chúng được đề xuất dưới dạng vaccin liều duy nhất ba lọ, đòi hỏi phải dùng đồng thời ba vaccin riêng biệt (ví dụ, Ingelvac CircoFLEX®, Ingelvac MycoFLBX® và Ingelvac®PRRS MLV).

Tác nhân gây bệnh PRRS được phân lập lần đầu ở Hà Lan, và được đặt tên là virus Lelystad. Virus này được mô tả trong WO 92/21375 (Stichting Centraal Diegeneeskundig Instituut). Thể phân lập của virus PRRS châu Âu được lưu giữ ở Viện nghiên cứu Pasteur ở Paris (Institut Pasteur of Paris), số 1-1102. Typ Bắc Mỹ được phân lập hầu như đồng thời với thể phân lập của virus typ châu Âu, và được mô tả trong WO-93/03760 (Collins et al.) Thể phân lập của virus typ Bắc Mỹ được lưu giữ ở Bộ sưu tập chủng kiểu Mỹ (ATCC), số VR-2332.

Các chủng khác nhau đã được phân lập từ cả typ virus châu Âu lẫn typ virus Bắc Mỹ. WO 93/07898 (Akzo) mô tả chủng châu Âu, và vaccin được tạo ra từ đó, lưu giữ ở CNCM (Institut Pasteur), số 1-1140. Tương tự, WO 93/14196 (Rhone-Merieux) mô tả chủng mới phân lập được ở Pháp, lưu giữ ở CNCM (Institut Pasteur), số 1-1153. Hơn thế nữa, EP0595436 B1 (Solvay) mô tả chủng typ Bắc Mỹ mới, độc hơn so với chủng mô tả ban đầu, và vaccin chứa nó. Chủng này đã được lưu giữ ở ATCC, song số hiệu lưu giữ không được đề cập chi tiết trong bản mô tả này. Ngoài ra, ES2074950 BA (Cyanamid Iberica) và bằng sáng chế đồng dạng GB2282811 B2 mô tả cái gọi là "chủng Tây Ban

Nha", chủng này khác với các chủng châu Âu và Bắc Mỹ. "Chủng Tây Ban Nha" này đã được lưu giữ ở Bộ sưu tập chủng tế bào động vật châu Âu (European Animal Cell Culture Collection: EACCC), số V93070108.

Các kháng nguyên virus PRRS thích hợp để dùng trong chế phẩm M. hyo/PCV2/PRRS theo sáng chế bao gồm các thể phân lập virus PRRS, các chủng virus PRRS Trung Quốc, các chủng virus PRRS châu Âu, cũng như các dạng được cải biến di truyền của các thể phân lập/chủng này. Theo một phương án, thành phần kháng nguyên virus PRRS được dùng trong chế phẩm theo sáng chế là virus PRRS Bắc Mỹ.

Theo một số phương án, thành phần kháng nguyên virus PRRS được sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế là thể phân lập virus PRRS Bắc Mỹ có ký hiệu p129 hoặc dạng được cải biến di truyền sống của nó. Tốt hơn, nếu virus PRRS được cải biến di truyền này không thể gây bệnh nhiễm song có khả năng tạo ra đáp ứng miễn dịch phòng ngừa hữu hiệu chống bệnh nhiễm virus PRRS kiểu dại.

Virus PRRS được cải biến di truyền để sử dụng trong vacxin theo sáng chế có thể được sản xuất từ dòng gây nhiễm. Việc bào chế dòng ADN bổ trợ gây nhiễm của thể phân lập virus PRRS Bắc Mỹ có ký hiệu p129 được mô tả trong bằng sáng chế Mỹ số 6,500,662 tài liệu này được đưa vào bản mô tả này theo cách viện dẫn. Trình tự ADN bổ trợ p129 được bộc lộ trong số truy cập trong ngân hàng gen AF494042 và trong bằng sáng chế Mỹ số 6,500,662.

Theo một phương án, trình tự nucleotit của dạng p129 không độc để sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế được nêu trong SEQ ID NO: 16. Tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn ở trình tự này. Trình tự này và trình tự của các dạng p129 không độc khác được mô tả trong PCT/IB2011/055003, nộp ngày 9-11-2011, nội dung của nó (bao gồm đơn nộp vào pha quốc gia Mỹ bất kỳ trên cơ sở đơn này) được đưa vào bản mô tả này theo cách viện dẫn. Tốt hơn, nếu virus PRRS được cải biến để ngăn ngừa sự giảm điều hòa chức năng qua trung gian interferon.

Theo các phương án khác, thành phần kháng nguyên virus PRRS được sử dụng trong vacxin theo sáng chế là thể phân lập virus PRRS có ký hiệu ISU-55. Thể phân lập ISU-55 được lưu giữ ở Bộ sưu tập chủng kiểu Mỹ (ATCC), với số hiệu lưu giữ VR2430. Trình tự nucleotit của các gen ORF2 đến ORF5 của thể phân lập ISU-55 được nêu trong SEQ ID NO: 17. Trình tự nucleotit của các gen ORF6 và ORF7 của thể phân lập ISU-55

được nêu trong SEQ ID NO: 18.

Các thể phân lập virus PRRS Bắc Mỹ thích hợp khác mà có thể được sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế là ISU-12, được lưu giữ ở ATCC với số hiệu lưu giữ VR2385 [tinh chế vết tan 3 x] và VR2386 [tinh chế không vết tan]. Các thể phân lập virus PRRS Bắc Mỹ thích hợp khác mà có thể được sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế là: ISU-51, ISU-3927, ISU-1894, ISU-22 và ISU-79, được lưu giữ ở ATCC lần lượt với các số hiệu lưu giữ VR2498, VR2431, VR2475, VR2429 và VR2474. Các dạng được cải biến di truyền của thể phân lập bất kỳ trong số các thể phân lập ISU này có thể được sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế. Các thể phân lập ISU này và thể phân lập ISU-55 được mô tả chi tiết trong các bằng sáng chế Mỹ sau cấp cho Paul và các đồng tác giả: US 5,695,766, 6,110,467, 6,251,397, 6,251,404, 6,380,376, 6,592,873, 6,773,908, 6,977,078, 7,223,854, 7,264,802, 7,264,957 và 7,517,976, các tài liệu này được đưa vào bản mô tả này theo cách viện dẫn.

Theo các phương án khác nữa, thành phần kháng nguyên virus PRRS được sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế là typ Bắc Mỹ được lưu giữ ở Bộ sưu tập chủng kiểu Mỹ (ATCC), số VR-2332 hoặc dạng được cải biến di truyền của nó. Ví dụ, virus PRRS có thể là virus sống được cải biến trên cơ sở thể phân lập đã được nhận dạng ATCC VR2332, thể phân lập này được sử dụng trong INGELVAC® PRRS ATP và INGELVAC® PRRS MLV, từ hãng Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.

Theo các phương án khác nữa, thành phần kháng nguyên virus PRRS được sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế là thể phân lập virus PRRS châu Âu hoặc virus Lelystad hoặc dạng được cải biến di truyền của chúng. Ví dụ về chủng virus PRRS thích hợp được nhận dạng là thể lưu số 1-1102, được mô tả trên đây. Các trình tự nucleotit và axit amin tương ứng với thể lưu 1-1102 được mô tả trong bằng sáng chế Mỹ số 5,620,691 cấp cho Wensvoort và các đồng tác giả, tài liệu này được đưa vào bản mô tả này theo cách viện dẫn. Việc bào chế dòng gây nhiễm của thể phân lập virus PRRS châu Âu hoặc virus Lelystad được mô tả trong bằng sáng chế Mỹ số 6,268,199, tài liệu này được đưa vào bản mô tả này theo cách viện dẫn.

Ví dụ khác về thể phân lập virus PRRS thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các thể phân lập được mô tả trên đây. Tương tự, các dạng được cải biến di truyền sống của thể phân lập virus PRRS có thể được sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế.

Dòng gây nhiễm có thể được sử dụng để tái tạo các sinh vật được cải biến di truyền sống này.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cần lưu ý rằng các biến thể của trình tự virus PRRS có thể được sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế. Các biến thể này có thể thay đổi về mức tương đồng trình tự tới 10-20% và vẫn giữ được các đặc tính kháng nguyên mà làm cho nó hữu ích trong vaccin. Tốt hơn, nếu biến thể virus PRRS có mức tương đồng trình tự ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 85%, tốt hơn là ít nhất 90%, thậm chí tốt hơn là ít nhất 95% so với trình tự hệ gen có chiều dài đầy đủ của thể phân lập virus PPRS kiểu đại. Các đặc tính kháng nguyên của vaccin có thể, ví dụ, được ước tính bằng thí nghiệm về liều quyết định như được đề cập trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế. Hơn nữa, các đặc tính kháng nguyên của kháng nguyên virus PPRS đã được cải biến tạo ra mức miễn dịch phòng ngừa ít nhất 70%, tốt hơn là 80%, tốt hơn là 90% so với kháng nguyên virus PPRS kiểu đại.

Theo một phương án, thành phần kháng nguyên virus PPRS là virus sống được cải biến di truyền mà được đưa vào vaccin theo sáng chế ở mức ít nhất $2,1 < \text{TCID}_{50} < 5,2$, trong đó TCID_{50} là liều gây nhiễm nuôi cấy mô 50% xác định được bằng cách định lượng kháng nguyên (thử nghiệm hoạt lực *in vitro*).

Thành phần kháng nguyên PCV2 của chế phẩm M. hyo/PCV2/PRRS có thể ở dạng circovirus dạng khảm typ-1-typ-2, virus dạng khảm này bao gồm circovirus typ 1 ở lợn tái tổ hợp bất hoạt biểu hiện protein ORF2 của circovirus typ 2 ở lợn. Theo phương án khác, thành phần kháng nguyên PCV2 của chế phẩm M. hyo/PCV2/PRRS ở dạng protein ORF2 tái tổ hợp.

Các kháng nguyên PCV2 thích hợp để sử dụng trong chế phẩm M. hyo/PCV2/PRRS có thể được tạo ra từ thể phân lập bất kỳ trong số các thể phân lập PCV2 được mô tả trên đây, cũng như các thể phân lập PCV2 khác. Các kháng nguyên PCV2 thích hợp để sử dụng trong vaccin theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các trình tự PCV2 được mô tả trên đây và các biến thể của chúng.

Vaccin theo sáng chế có thể được bào chế theo cách thường được chấp nhận để chứa các chất mang chấp nhận được đối với động vật, kể cả người (nếu áp dụng được), như chất đệm chuẩn, chất ổn định, chất pha loãng, chất bảo quản và/hoặc chất làm hòa tan, và cũng có thể được bào chế để tạo điều kiện thuận lợi cho việc giải phóng ổn định.

Các chất pha loãng bao gồm nước, nước muối, dextroza, etanol, glyxero1, và các chất tương tự. Các chất phụ gia để tạo tính đẳng trương bao gồm natri clorua, dextroza, manito1, sorbitol và lactoza, và các chất tương tự. Chất ổn định bao gồm albumin, và các chất tương tự. Các chất dẫn và phụ gia thích hợp khác cho vacxin, bao gồm các chất đặc biệt hữu hiệu trong việc bào chế vacxin sống được cải biến, là đã được biết hoặc hiển nhiên 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, tài liệu này được đưa vào bản mô tả này theo cách viện dẫn.

Vacxin theo sáng chế có thể còn chứa một hoặc nhiều thành phần điều biến miễn dịch bổ sung như, ví dụ, tá dược hoặc xytokin, và các chất tương tự. Loại tá dược thích hợp để sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế bao gồm: tá dược dầu trong nước, tá dược polyme và nước, tá dược nước trong dầu, tá dược nhôm hydroxit, tá dược vitamin E và tổ hợp của chúng. Một số ví dụ cụ thể về các tá dược 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, Bacto-Adjuvant, một số polyme tổng hợp như poly axit amin và copolyme 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 lipit A, và tá dược Avridin lipit-amin (N,N-dioctadexyl-N',N'-bis(2-hydroxyetyl)-propandiamin), "REGRESSIN" (Vetrepharm, Athens, Ga.), dầu parafin, hệ tá dược RIB I (Ribi Inc., Hamilton, Mont.), muramyl dipeptit và các chất tương tự.

Ví dụ không giới hạn về nhũ tương dầu trong nước hữu ích trong vacxin theo sáng chế bao gồm các chế phẩm được cải biến SEAM62 và SEAM 1/2. SEAM62 được cải biến là nhũ tương dầu trong nước chứa 5% (thể tích) squalen (Sigma), 1% (thể tích) chất tẩy rửa SPAN® 85 (các chất hoạt động bề mặt ICI), 0,7% (thể tích) chất tẩy rửa TWEEN® 80 (các chất hoạt động bề mặt ICI), 2,5% (thể tích) etanol, 200 µg/ml Quil A, 100 µg/ml cholesterol và 0,5% (thể tích) lexitin. SEAM 1/2 được 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.

Ví dụ khác về tá dược hữu ích trong vacxin theo sáng chế là SP-dầu. Như được sử dụng trong bản mô tả này và yêu cầu bảo hộ, thuật ngữ "SP-dầu" chỉ nhũ tương dầu chứa copolyme khối polyoxyetylen-polyoxypropylen, squalan, polyoxyetylen sorbitan monooleat và dung dịch muối đệm. Copolyme khối polyoxyetylen-polyoxypropylen là chất hoạt động bề mặt giúp cho việc tạo huyền phù các thành phần rắn và 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 po10 xamer 401 có bán trên thị trường với tên thương mại Pluronic® L-121. Nói chung, nhũ tương SP-dầu là hỗn hợp tá dược kích thích miễn dịch chứa từ 1 đến 3% thể tích copolyme khối, từ 2 đến 6% thể tích squalan, tốt hơn là từ 3 đến 6% squalan, và từ 0,1 đến 0,5% thể tích polyoxyetylen sorbitan monooleat, với phần còn lại là dung dịch muối đệm. Theo một phương án, nhũ tương SP-dầu có mặt trong thành phẩm với lượng thể tích từ 1% đến 25%, tốt hơn là từ 2% đến 15%, tốt hơn là từ 5% đến 12% thể tích. Ví dụ khác về tá dược thích hợp để sử dụng trong vacxin theo sáng chế là tá dược AMPHIGENT™ gồm lexitin đã loại dầu được hòa tan trong dầu, thường là parafin lỏng nhẹ.

Ví dụ khác về tá dược hữu ích trong vacxin theo sáng chế là các tá dược độc quyền sau: hệ tá dược nhũ tương kép Microsol Diluvac Forte®, tá dược Emunade, và tá dược XSolve. Cả hai tá dược Emunade và XSolve đều là nhũ tương dầu khoáng nhẹ trong nước, nhưng Emunade còn chứa alhydrogel, và d,l- α -tocopheryl axetat là một phần của tá dược XSolve. Ví dụ khác về tá dược thích hợp để sử dụng trong vacxin theo sáng chế là tá dược ImbranFLEX™ (tá dược nước trong dầu). Ví dụ khác về tá dược thích hợp là tá dược trên cơ sở Carbomer (Carbopol®). Các 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 được thêm vào với lượng nằm trong khoảng từ 100 μ g đến 10 mg/liều. Theo phương án khác, hỗn hợp tá dược/tá dược được thêm vào với lượng nằm trong khoảng từ 200 μ g đến 5 mg/liều. Theo phương án khác nữa, hỗn hợp tá dược được thêm vào với lượng nằm trong khoảng từ 300 μ g đến 1 mg/liều.

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

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

Khía cạnh khác đề cập đến phương pháp bào chế vacxin theo sáng chế. Phương pháp này bao gồm các bước: i) nuôi cấy *M. hyo* trong môi trường thích hợp trong khoảng thời gian 18-144 giờ; ii) tiếp theo làm bất hoạt giống *M. hyo*; iii) thu hoạch dịch nuôi cấy đã được làm bất hoạt, trong đó dịch nuôi cấy đã được làm bất hoạt chứa chế phẩm toàn tế bào *M. hyo* chứa cả phân đoạn chất lỏng hòa tan lẫn thành phần tế bào không hòa tan; iv) tách phân đoạn chất lỏng hòa tan ra khỏi thành phần tế bào không hòa tan; và v) loại bỏ hầu hết cả IgG lẫn phức chất kháng nguyên/globulin miễn dịch ra khỏi phân đoạn chất lỏng hòa tan.

Ví dụ về môi trường thích hợp để nuôi cấy *M. hyo* là nước cái PPLO (*Mycoplasma* Broth Base), mà khi được bổ sung các chất làm giàu dinh dưỡng, được dùng để phân lập và nuôi cấy *Mycoplasma*.

Theo một số phương án, giống *M. hyo* được sinh trưởng cho đến mức sinh trưởng pha loga muộn, sau đó làm bất hoạt giống. Theo một số phương án khác, làm bất hoạt giống bằng cách nâng độ pH (ví dụ, đến 7,8). Điều này xảy ra bằng cách cho giống sản xuất tiếp xúc với chất làm bất hoạt, như etylenimin hai thành phần (BEI). BEI được tạo ra tại chỗ trong quá trình ủ L-bromoetylamin hydrobromua (BEA) trong giống sản xuất. Tiếp theo, trung hòa độ pH của giống được làm bất hoạt, như bằng cách thêm lượng tương đương của chất trung hòa chất làm bất hoạt trong dung dịch. Theo một số phương án, chất làm bất hoạt là BEI và chất trung hòa là natri thiosulfat. Theo một phương án, độ pH của giống được làm bất hoạt được điều chỉnh đến 7,4 bằng cách thêm thiosulfat.

Theo một số phương án, phân đoạn lỏng hòa tan của chế phẩm toàn tế bào *M. hyo* được tách từ thành phần tế bào không hòa tan bằng phương pháp thông thường. Theo một phương án, việc tách này được thực hiện nhờ bước lọc. Theo phương án khác, việc tách này được thực hiện nhờ bước ly tâm. Theo phương án khác nữa, việc tách này được thực hiện nhờ bước kết tủa.

Theo một phương án, phân đoạn lỏng hòa tan của chế phẩm toàn tế bào *M. hyo* đã được trung hòa bất hoạt được xử lý bằng nhựa Protein A để hầu như loại bỏ cả IgG lẫn

phức chất kháng nguyên/globulin miễn dịch chứa trong đó. Theo các phương án khác, nhựa Protein G có thể được sử dụng để hầu như loại bỏ cả IgG lẫn phức chất kháng nguyên/globulin miễn dịch chứa trong phân đoạn lỏng hòa tan. Phương pháp loại bỏ cả IgG lẫn phức chất kháng nguyên/globulin miễn dịch nhờ các nhựa Protein A hoặc Protein G là được biết rõ trong lĩnh vực này.

Theo khía cạnh khác, phương pháp bào chế chế phẩm gây miễn dịch, như vaccin, theo sáng chế bao gồm bước bào chế kháng nguyên M. hyo hòa tan được mô tả trên đây và trộn nó với tá dược thích hợp và một hoặc nhiều chất mang được dụng. Phương pháp này tùy ý bao gồm bước thêm ít nhất một kháng nguyên lợn bổ sung, như kháng nguyên PCV2 và/hoặc kháng nguyên virus PRRS như được mô tả trên đây.

Khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến kit. “Kit” chỉ nhiều thành phần được nhóm với nhau. Theo một phương án, kit theo sáng chế chứa lọ (hoặc vật đựng thích hợp khác) chứa vaccin chứa phần hòa tan của chế phẩm toàn tế bào *Mycoplasma hyopneumoniae* (M. hyo), trong đó phần hòa tan của chế phẩm M. hyo là hầu như không chứa cả (i) IgG lẫn (ii) phức chất kháng nguyên/globulin miễn dịch. Tùy ý, kit có thể còn chứa cảm nang hướng dẫn. Cảm nang hướng dẫn này chứa thông tin về cách dùng vaccin.

Theo một số phương án, lọ chứa phần hòa tan của chế phẩm M. hyo còn chứa kháng nguyên PCV2. Theo một số phương án, chế phẩm kết hợp M. hyo/PCV2 trong lọ được đề xuất dưới dạng chế phẩm lỏng dùng ngay.

Theo các phương án khác, kit chứa lọ thứ hai chứa kháng nguyên virus PRRS. Theo một số phương án, kháng nguyên virus PRRS là ở dạng virus sống được cải biến di truyền mà được đề xuất ở trạng thái đông khô. Trong các trường hợp này, cảm nang hướng dẫn sẽ bao gồm các hướng dẫn về cách hydrat hóa lại thành phần virus PRRS bằng các thành phần lỏng từ lọ chứa chế phẩm kết hợp M. hyo/PCV2. Cảm nang hướng dẫn cũng sẽ chứa thông tin về cách dùng chế phẩm đa trị M. hyo/PCV2/PRRS.

Theo một số phương án, vaccin theo sáng chế được dùng cho lợn có kháng thể được tạo ra từ mẹ kháng M. hyo. Theo các phương án khác, vaccin theo sáng chế được dùng cho lợn có kháng thể được tạo ra từ mẹ kháng cả M. hyo lẫn ít nhất một vi sinh vật khác mà có thể gây bệnh ở lợn.

Theo một số phương án, vaccin theo sáng chế, như vaccin đơn trị hoặc đa trị, được dùng cho lợn con 3 tuần tuổi hoặc lớn hơn. Tuy nhiên, hàm ý rằng chế phẩm vaccin đơn

trị hoặc đa trị theo sáng chế có thể được dùng để tiêm chủng lại cho lợn cái con trước khi giao phối. Như đã biết trong lĩnh vực này, lợn cái con là lợn cái chưa từng có thai.

Các lợn cái con được tiêm chủng sẽ truyền kháng thể được tạo ra từ mẹ đến các lợn mới sinh còn bú của chúng thông qua sữa non.

Cũng hàm ý rằng vacxin đơn trị hoặc đa trị theo sáng chế có thể được sử dụng để tiêm chủng lại hàng năm cho các đàn giao phối. Tốt hơn, nếu vacxin đơn trị hoặc đa trị theo sáng chế được dùng cho lợn (ví dụ, lợn con hoặc lợn cái con) trong một liều. Theo một phương án, vacxin đa trị theo sáng chế không cần trộn các vacxin đơn trị riêng biệt trước khi dùng, tức là nó được đề xuất dưới dạng chế phẩm dùng ngay. Theo phương án khác, chế phẩm đa trị cần trộn vacxin nhị trị chứa trong lọ thứ nhất với vacxin đơn trị chứa trong lọ thứ hai. Tùy ý, các kháng nguyên bổ sung có thể được thêm vào các lọ này.

Theo một số phương án, sự khởi đầu miễn dịch là từ 2-3 tuần sau khi tiêm chủng chế phẩm vacxin đơn trị hoặc đa trị theo sáng chế. Theo các phương án khác, thời gian miễn dịch là khoảng 17-23 tuần sau khi tiêm chủng chế phẩm vacxin đơn trị hoặc đa trị theo sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Phương pháp sản xuất *Mycoplasma hyopneumoniae* để kháng nguyên M. hyo có thể kết hợp với PCV2

Lên men và làm bất hoạt M. hyo

Môi trường cho sản xuất giống và sản xuất kháng nguyên được chuẩn bị như sau. Nước cái chứa sinh vật giống vi khuẩn gây viêm phổi (Pleuropneumonia-like Organism: PPLO) được tạo ra từ tim lợn (BD Biosciences catalog No. 21498) được tạo ra theo hướng dẫn của nhà sản xuất (tức là 21g/l) và dung dịch chiết nấm men được tạo ra ở 21g/l trong USP. Tiếp theo, thêm dung dịch chiết nấm men vào PPLO ở 6,25% và khử trùng hỗn hợp thu được bằng cách gia nhiệt đến 121°C trong >30 phút. Điều chế xystein hydroclorua ở 90g/l và lọc vô trùng. Dung dịch dextroza được tạo ra bằng cách thêm 450g dextroza/lít nước USP tiếp theo khử trùng bằng nhiệt. Để chuẩn bị môi trường cuối, huyết thanh lợn được thêm vào môi trường bazơ ở 10% tiếp theo là xystein ở 0,01% và dextroza ở 1,0%. Cấy 10% thể tích giống M. hyopneumoniae (chủng P-5722-3) pha loga vào môi trường thu được. Giữ giống này ở 37°C và duy trì pH và DO lần lượt ở 7,0 và 25%. Ở giai đoạn sinh trưởng pha loga muộn, giống được làm bất hoạt bằng etylenimin hai thành phần (BEI), một hợp chất aziridin, được sản xuất từ 2-bromoethylamin hydrobromua. Cụ thể,

làm bất hoạt bằng cách nâng độ pH lên 7,8 bằng cách thêm 2-bromoethylaminhydrobromua (BEA) đến nồng độ cuối 4 mM và ủ trong 24 giờ. Trung hòa BEI bằng cách thêm natri thiosulfat theo tỷ lệ mol 1:1 tiếp theo là ủ thêm 24 giờ. Giữ dịch nuôi cấy đã được làm bất hoạt ở 2-8°C cho đến khi thực hiện bước xử lý tiếp theo.

Ví dụ 2: Phương pháp sản xuất Circovirut lợn dạng khảm (cPCV)1-2

cPCV1-2 được xây dựng cấu trúc bằng cách nhân dòng gen capsit gây miễn dịch của circovirut lợn typ 2 (PCV2) vào khung chính hệ gen của circovirut lợn typ 1 không gây bệnh (PCV1). Quy trình xây dựng cấu trúc dòng ADN dạng khảm được mô tả, ví dụ, trong bằng sáng chế Mỹ số 7,279,166, tài liệu này được đưa vào bản mô tả này theo cách viện dẫn. Nguồn gây nhiễm của virut dạng khảm nhận được từ Tiến sỹ X. J. Meng, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA, và được dùng để gây nhiễm vào tế bào thận lợn (Porcine Kidney: PK)-15 sinh trưởng trong môi trường cần thiết tối thiểu (Minimum Essential Medium: MEM) có bổ sung 0,05% sản phẩm thủy phân lactalbumin (LAH), 30 pg/mL gentamixin sulfat và 5% huyết thanh thai bò. Tế bào PK-15 nhiễm cPCV1-2 thu được tiếp tục được nhân lên bằng cách cấy chuyển theo bậc thêm bốn lần bằng cách sử dụng cùng môi trường sinh trưởng ngoại trừ 2-3% huyết thanh thai bò. Mề cấy chuyển thứ năm được làm động, làm tan băng và lọc, và dịch tan được dùng để chuẩn bị giống sản xuất và giống hoạt động kế tiếp.

Môi trường dùng để sản xuất giống là giống với môi trường dùng để sản xuất giống sản xuất. 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 nuôi cấy dòng tế bào PK- 15. Môi trường sinh trưởng có thể được bổ sung lên tới 10% huyết thanh bò, lên tới 0,5% sản phẩm thủy phân lactalbumin, lên tới 0,5% albumin huyết thanh bò, và lên tới 30 µg/mL geniamixin. Đối với môi trường cho sự sinh sản của virut, MEM, OptiMEM hoặc môi trường tương đương được sử dụng. Môi trường cho sự sinh sản của virut có thể được bổ sung lên tới 0,5% sản phẩm thủy phân lactalbumin, lên tới 2% huyết thanh bò, lên tới 0,5% albumin huyết thanh bò, và lên tới 30 µg/mL gentamixin. Lên tới 5 g/l glucoza và lên tới 5 mmol/L L-glutamin có thể được thêm vào môi trường sinh trưởng và/hoặc môi trường cho sự sinh sản của virut, nếu cần, để duy trì các tế bào này.

Virut giống gốc cPCV1-2 được thêm vào huyền phù tế bào PK-15 và được hấp phụ trong thời gian lên tới 3 giờ. Pha loãng virut giống trong môi trường sinh trưởng cơ bản để tạo ra mức bội nhiễm (MOI) nằm trong khoảng 0,1 - 0,0001.

Trước hết, cấy giống tế bào PK-15 với virus giống hoạt động khi nuôi cấy tế bào, hoặc khi đạt tới mức nhập dòng 20% đến 50%. Bước cấy chuyển ban đầu này có thể được gọi là “Phương pháp gây nhiễm một bước” để sản xuất lô kháng nguyên, hoặc có thể tiếp tục được dùng để cấy chuyển theo bậc. Để cấy chuyển theo bậc, tế bào PK-15 nhiễm cPCV1-2 tiếp tục được nhân lên tới đợt cấy chuyển 7 với tỷ lệ 1:5-20 để virus sinh sản. Môi trường nuôi cấy chứa huyền phù tế bào bị nhiễm từ đợt cấy chuyển trước đó đóng vai trò nguyên liệu giống cho đợt cấy chuyển tiếp theo, ủ tế bào nhiễm cPCV1-2 trong 3 đến 14 ngày đối với mỗi đợt cấy chuyển ở $36 \pm 2^\circ\text{C}$ khi tế bào đạt tới mức nhập dòng $> 90\%$. Virus cPCV1-2 gây ra các thay đổi bệnh lý tế bào quan sát được trong quá trình virus này sao chép. Khi thu hoạch, quan sát thấy vòng tròn tế bào và mảnh vỡ nổi đáng kể. Cũng quan sát thấy rõ môi trường nuôi cấy bị nhiễm vi khuẩn hoặc nấm. Thời gian ủ giữa các lần thu hoạch đối với 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 và tối đa	Giới hạn nhiệt độ
Gây nhiễm một bước	5 đến 16 ngày	$36 \pm 2^\circ\text{C}$
Cấy chuyển theo bậc (MSV + 3 đến MSV + 7)	16 đến 36 ngày	$36 \pm 2^\circ\text{C}$

Dịch nuôi cấy cPCV1-2 được thu hoạch trong bình vô trùng và được lấy mẫu để thử nghiệm *Mycoplasma* bằng phương pháp đã biết. Nhiều mẻ thu hoạch có thể được dẫn từ chai lẫn, bình phản ứng sinh học và bình truyền dịch.

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

Phương pháp làm bất hoạt, giảm độc lực hoặc khử độc virus cPCV1-2 sẽ được mô tả. Sau khi cô kháng nguyên cPCV, thêm *Beta*-propiolacton (BPL) vào thành phần virus cPCV1-2 đã thu gom để thu được nồng độ khoảng 0,2% thể tích. Tiếp theo, khuấy dịch virus đã thu gom này trong ít nhất 15 phút rồi chuyển dịch kháng nguyên đơn thể bất hoạt sang bình vô trùng thứ hai. Duy trì dịch kháng nguyên đã chuyển sang ở $2 - 7^\circ\text{C}$, có khuấy liên tục, trong ít nhất 24 giờ. Sau ít nhất 24 giờ, thêm phần BPL bổ sung thứ hai 0,2% thể tích vào huyền phù đã thu gom. Tiếp theo, khuấy các thành phần, chuyển sang bình thứ ba, và duy trì ở $2-7^\circ\text{C}$, có khuấy liên tục, trong thời gian bổ sung không ít hơn 84 giờ. Nói

chung, tổng thời gian làm bất hoạt không ít hơn 108 giờ và không nhiều hơn 120 giờ. Phương pháp làm bất hoạt này được tóm tắt trong Bảng 2 dưới đây.

Bảng 2: Phương pháp làm bất hoạt

Chất làm bất hoạt	Nồng độ cuối	Giới hạn nhiệt độ	Thời gian-Giờ (tối thiểu/tối đa)
Beta-propiolacton (BPL)	0,4% thể tích (2 lần bổ sung 0,2% thể tích)	2 - 7°C (w/khuấy)	108-120

Việc làm bất hoạt được kết thúc bằng cách thêm dung dịch natri thiosulfat có nồng độ cuối không quá 0,1M. Điều chỉnh độ pH của lô kháng nguyên đã được làm bất hoạt đến 6,8 bằng NaOH hoặc HCl. Sau khi làm bất hoạt, lấy mẫu từ hỗn hợp để thử mức độ hoàn thành quá trình làm bất hoạt. Chuẩn hóa sản phẩm kháng nguyên cPCV1-2 theo mục tiêu lớn hơn 1,0 RP như đo được bằng ELISA về hoạt lực.

Ví dụ 3: Xử lý xuôi dòng kháng nguyên M. hyo và thử nghiệm phân tích đối với các kháng nguyên đã được xử lý này

Xử lý xuôi dòng kháng nguyên M. hyo:

Dịch lên men đã được làm bất hoạt (điều chế được như được mô tả trên đây trong Ví dụ 1) được xử lý đối với mỗi nhóm được chỉ ra là như sau. Các kháng nguyên M. hyo đã được xử lý này được sử dụng trong Ví dụ 4 dưới đây.

T02: (toàn đơn thể) không được xử lý.

T03: (10 x UF cô) cô bằng cách lọc dòng tiếp tuyến bằng màng có ngưỡng trọng lượng phân tử 100 KDa (sợi rỗng). Giảm thể tích cuối đến 10 x.

T04 & T05: (10 x UF cô và ly tâm) thu gom tế bào *Mycoplasma* cô (từ T03) và rửa một lần bằng PBS bằng cách ly tâm ở ~20,000xg (Sorvall model RC5B).

T06 & T07: (10 x cô) ly tâm dịch lên men đã được làm bất hoạt ở ~20,000xg (Sorvall RC5B) và rửa một lần bằng cách tạo huyền phù lại tế bào trong PBS tiếp theo là ly tâm bổ sung. Giảm thể tích cuối đến 10 x.

T08: (10 x cô và gia nhiệt) cô và rửa tế bào *Mycoplasma* thu được ở T06 và gia nhiệt đến 65°C trong 10 phút.

T09: (Dịch nổi không chứa tế bào) dịch nổi thu gom được từ lần ly tâm thứ nhất như được mô tả đối với T06 được lọc vô trùng qua bộ lọc 0,2 micron (Nalgene).

T10: (Dịch nổi không chứa tế bào-xử lý bằng Protein-A) trộn dịch nổi vô trùng (điều chế được ở T09) với nhựa Protein A (Protein A Sepharose, Pharmacia Inc) theo tỷ

lệ thể tích 10:1 trong 4 giờ. Loại bỏ nhựa bằng cách lọc vô trùng và bảo quản dịch lọc ở 2-8°C. Quy trình này sử dụng bước xử lý protein A “xuôi dòng” sau lên men để loại bỏ kháng thể và phức chất miễn dịch. Mặc dù sáng chế không loại trừ bước xử lý protein A ngược dòng, song các tác giả sáng chế phát hiện ra rằng trong trường hợp của M. hyo, bước xử lý protein A ngược dòng đối với môi trường sinh trưởng cho ra kết quả p46 thấp hơn và không ổn định so với môi trường không được xử lý (số liệu không được thể hiện). Thử nghiệm phân tích đối với các kháng nguyên đã được xử lý xuôi dòng của M. hyo

Các chế phẩm kháng nguyên M. hyo đã được xử lý xuôi dòng (điều chế được như được mô tả trên đây) được thử nghiệm về sự thu hồi kháng nguyên p46 đặc hiệu với M. hyo, và sự có mặt của kháng thể PCV2. Ngoài ra, các chế phẩm kháng nguyên M. hyo này được thử nghiệm về sự có mặt của Torque Teno Virut (TTV), bao gồm kiểu gen 1 (g1TTV) và kiểu gen 2 (g2TTV). Kết quả được thể hiện trong Bảng 3 dưới đây.

Bảng 3: Đặc điểm của các kháng nguyên đã được xử lý xuôi dòng của M. hyo

Mẫu điều trị	M. hyo đơn thể	Kháng thể PCV2	ADN bằng qPCR	
	p46 RU/mL	Tỷ lệ s/p	g1TTV	g2TTV
Toàn đơn thể	809	0,248	1,0QE+03	1,78E+03
10 x UF cô	6666	0,819	1,00E+03	9,94E+03
10 x UF cô + ly tâm	614	0,019	0	0
10 x cô	763	-0,015	1,90E+02	1,91E+02
10 x cô + gia nhiệt	690	-0,012	0	2,07E+02
Dịch nổi không chứa tế bào	719	0,242	4,20E+02	3,23E+03
Dịch nổi không chứa tế bào (Prot A)	826	-0,014	0	2,06E+03

Theo Bảng 3, sự thu hồi kháng nguyên p46 đặc hiệu với M. hyo được chứng minh đối với mỗi chế phẩm kháng nguyên được xử lý xuôi dòng của M. hyo. Ngoài ra, các mẫu điều trị sau loại bỏ thành công kháng thể PCV2: 10 x UF cô & ly tâm, 10 x ly tâm, 10 x ly tâm & gia nhiệt và dịch nổi không chứa tế bào (xử lý bằng Protein-A). Đối với TTV, các mẫu điều trị sau loại bỏ thành công g1TTV: 10 x UF cô & ly tâm, 10 x ly tâm & gia nhiệt, và dịch nổi không chứa tế bào (xử lý bằng Protein-A). Chỉ duy nhất mẫu điều trị có ký hiệu 10 x UF cô & ly tâm loại bỏ g2TTV. Các thể phân lập virus Torque teno, bao gồm các kiểu gen 1 và 2 được mô tả trong US20110150913, tài liệu này được đưa vào bản mô tả này theo cách viện dẫn.

Do đã biết trong lĩnh vực này rằng Protein A liên kết với IgG, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này hiểu rằng không chỉ kháng thể PCV2, mà cả các kháng thể

lợn khác, bao gồm kháng thể PRRS, kháng thể HPS, và kháng thể SIV sẽ được loại bỏ một cách hữu hiệu nhờ xử lý bằng Protein-A. Điều này khiến cho dịch nổi M. hyo không chứa tế bào được xử lý bằng Protein-A là tương thích không chỉ với kháng nguyên PCV2, mà còn với các kháng nguyên lợn khác do thiếu sự can thiệp miễn dịch giữa các kháng nguyên này. Ngoài ra, việc loại bỏ mảnh vỡ không phải tế bào bào vệ và việc loại bỏ globulin miễn dịch và các phức chất kháng nguyên/globulin miễn dịch được tin chắc là tạo ra vaccin an toàn.

Ví dụ 4: Bào chế chế phẩm vaccin thực nghiệm M. hyo

Tất cả các vaccin M. hyo thực nghiệm đều có nồng độ cuối của tá dược Amphigen 5%. Ngoài ra, tất cả các vaccin đều được chuẩn hóa với p46 ELISA và bảo quản bằng thimerosol. Các chế phẩm vaccin thực nghiệm được bào chế với kháng nguyên M. hyo điều chế được theo các mẫu điều trị TQ2-T10 trên đây. Ngoài ra, mẫu điều trị T01 tương ứng với thuốc vờ (không kháng nguyên M. hyo, chỉ có tá dược Amphigen 5%) trong khi mẫu điều trị T11 là đối chứng dương tính tương ứng với vaccin M. hyo trên cơ sở bacterin hết hạn (RespiSure-ONE®, Pfizer Animal Health). Các chế phẩm này được mô tả trong Bảng 4 dưới đây.

Bảng 4: Các chế phẩm vaccin thực nghiệm M. hyo

Mẫu điều trị	Loại IVP *	p46 đích đơn vị/ds	Kháng nguyên M. hyo (mL)	Tá dược (mL)	Thể tích chế phẩm (mL)
T01	123639 (Thuốc vờ)	Chỉ có Amphigen 5%, không kháng nguyên			
T02	L100211A	452	279,36	250	1000
T03	L100211B	452	6,78	50	200
T04	L100211C	452	73,62	50	200
T05	L100211D	816	132,90	50	200
T06	L100211E	452	59,24	50	200
T07	L100211F	816	106,95	50	200
T08	L100211G	452	65,51	50	200
T09	L100211H	452	62,87	50	200
T10	L100211J	452	54,72	50	200
T11	A827870	Vaccin “RespiSure” hết hạn			

* Investigational Veterinary Product (IVP): Sản phẩm thú y nghiên cứu

Ví dụ 5: Đánh giá tác dụng in vivo của vaccin M. hyo với các kháng nguyên M. hyo từ việc xử lý xuôi dòng khác nhau

Nghiên cứu này được thực hiện để đánh giá tác dụng in vivo của các vaccin *Mycoplasma hyopneumoniae* (M. hyo) với các kháng nguyên M. hyo từ việc xử lý xuôi

dòng khác nhau (different downstream process: DSP). Lợn 3 tuần tuổi được tiêm chủng qua đường trong bắp bằng liều duy nhất của các chế phẩm vacxin khác nhau được mô tả trong Bảng 4 trên đây. Mười sáu con được xếp vào mỗi nhóm điều trị. Cho lợn dùng liều quyết định ở 21 ngày sau khi tiêm chủng thể phân lập thực địa M. hyo độc. Mổ khám nghiệm lợn ở 28 ngày sau liều quyết định và lấy phổi và tính điểm số tổng hợp phù hợp với bệnh nhiễm M. hyo. Tiêu chuẩn chủ yếu phòng ngừa liệu M. hyo quyết định là điểm số tổng hợp của phổi. Thường được thừa nhận rằng có mối quan hệ giữa kích thước tổn thương phổi do bệnh viêm phổi địa phương gây ra và tác dụng phụ đối với tốc độ sinh trưởng. Bảng 5 dưới đây thể hiện điểm số tổn thương phổi đối với các nhóm điều trị tương ứng. Ý nghĩa thống kê được xác định bằng phân tích mô hình hỗn hợp (Mixed Model Analysis) về điểm số phổi đối với mỗi nhóm.

Bảng 5: Kết quả tổn thương phổi

Điều trị	Mô tả	p46 RP Đích/Quan sát được	% tổn thương phổi được chuyển đổi ngược từ trung bình LS	% Khoảng phổi có thương tổn	Trái ngược	Giá trị p	Ý nghĩa
T01	Thuốc vờ (5% Amphigen)	N/A	11,7	1,2 – 44,3	N/A	N/A	N/A
T02	Toàn đơn trị	13/15,6	1,2	0,1 – 18,5	T01 so với 02	0	Có
T03	Toàn đơn trị UF 10x	13/11,9	0,3	0,0 – 2,8	T01 so với 03	0	Có
T04	UF 10x + Ly tâm	13/28,1	5,9	0,0 – 40,5	T01 so với 04	0,1589	No
T05	UF 10x + Ly tâm	24/48,2	3,7	0,0 – 42,3	T01 so với T05	0,0309	Có
T06	10x Ly tâm	13/30,4	4,7	0,0 – 23,6	T01 so với 06	0,0388	Có
T07	10x Ly tâm	24/57,4	4,6	0,3 – 37,3	T01 so với T07	0,0323	Có
T08	10x Ly tâm + Gia nhiệt	13/17,7	4,5	0,3 – 21,7	T01 so với T08	0,0137	Có
T09	Dịch nổi (không tế bào)	13/14,1	1,4	0,0 – 33,0	T01 so với T09	0,0004	Có
T10	Dịch nổi + Prot A	13/12,1	3,1	0,0 – 25,8	T01 so với T10	0,0094	Có
1	RSO hết hạn	13/12,5	2,2	0,1 – 32,1	T01 so với T11	0,0009	Có

Theo Bảng 5 trên đây, kết quả với các kháng nguyên M. hyo từ các xử lý xuôi dòng khác nhau chỉ ra rằng tất cả các vacxin thực nghiệm ngoại trừ T04 đều khác biệt đáng kể so với thuốc vờ. Các kết quả tổn thương do M. hyo này được vẽ thành đồ thị trên Fig.1. Như được thể hiện trên Fig.1, T04 cho kết quả không chấp nhận được. Tất cả các nhóm điều trị khác đều khác biệt đáng kể so với thuốc vờ (T01). Điểm số tổng hợp của phổi chỉ ra rằng T02, T03 và T09-T11 cho mức phòng ngừa hữu hiệu nhất đối với liệu M. hyo quyết định.

Hoạt lực tương đối của p46 của vacxin thực nghiệm được đánh giá bằng thử nghiệm chất hấp phụ gắn enzym kẹp kháng thể kép (double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay: DAS ELISA). Kết quả DAS ELISA đối với p46 được thể hiện trong Bảng 5 trên đây chỉ ra rằng tất cả các vacxin thực nghiệm đều vượt quá hoạt lực đích. Ngoài ra, hoạt lực tương đối của p46 được duy trì hoặc gia tăng trong quá trình bảo quản vacxin trong thời gian một tháng (số liệu không được thể hiện). Hoạt lực gia tăng theo thời gian đã được quan sát thấy ở các kháng nguyên được ly tâm với ngoại lệ là các kháng nguyên được gia nhiệt. Nói chung, có lẽ “khung” tế bào vỡ ra theo thời gian và giải phóng kháng nguyên p46 liên kết với màng nhiều hơn trong trường hợp của kháng nguyên được ly tâm.

Ví dụ 6: Đánh giá mức độ tương thích của vacxin M. hyo với kháng nguyên PCV2

Nghiên cứu này được thực hiện để đánh giá mức độ tương thích của vacxin thực nghiệm M. hyo chứa kháng nguyên M. hyo từ việc xử lý xuôi dòng khác nhau với kháng nguyên PCV2. Các chế phẩm vacxin thực nghiệm M. hyo được mô tả trong các Bảng 4 và 5 trên đây. Hoạt lực tương đối của p46 quan sát được đối với các vacxin này được mô tả trong Bảng 5 trên đây. Mỗi vacxin thực nghiệm M. hyo này được kết hợp với kháng nguyên PCV2. Trong ví dụ này, kháng nguyên PCV2 là virus dạng khảm PCV Typ 1-Typ 2 (Fostera PCV) điều chế được như được mô tả trên đây trong Ví dụ 2. Virus dạng khảm này được đưa vào chế phẩm ở mức ban đầu khoảng $1,6 < \text{RP}$, trong đó RP là đơn vị hoạt lực tương đối xác định được bằng phương pháp định lượng kháng nguyên PCV2 ELISA (thử nghiệm về hoạt lực *in vitro*) so với vacxin so sánh hiệu nghiệm.

Các chế phẩm kết hợp M. hyo/PCV2 thực nghiệm được đánh giá bằng PCV2 ELISA. Kết quả được thể hiện trên Fig.2. Như được thể hiện trên Fig.2, chỉ có các chế phẩm kháng nguyên M. hyo từ việc xử lý xuôi dòng sau là tương thích với kháng nguyên PCV2: Siêu lọc & ly tâm (T04 & T05), ly tâm (T06 & T07), ly tâm + gia nhiệt (T08) và dịch nổi được xử lý bằng Protein A (T10). Trong đó, dịch nổi M. hyo được xử lý bằng Protein A là tương thích nhất với kháng nguyên PCV2 so với đối chứng thuốc vò chứa virus dạng khảm và tá được Amphigen, song không có kháng nguyên M. hyo. Mức virus PCV dạng khảm trong dịch nổi được xử lý bằng Protein-A là 1,5 RP so với 1,69 RP đối với thuốc vò. Do đó kết luận được rằng không có hoặc có ở mức không đáng kể sự can thiệp miễn dịch giữa chế phẩm kháng nguyên hòa tan M. hyo được xử lý bằng Protein A và kháng nguyên PCV2 của virus dạng khảm.

Tác dụng *in vivo* của dịch nổi được xử lý bằng Protein-A được chứng minh trong Ví dụ 5 trên đây cùng với các kết quả được mô tả trong ví dụ này chỉ ra rằng dịch nổi được xử lý bằng Protein-A là cơ sở rất hữu hiệu đối với các chế phẩm kết hợp M. hyo- PCV2.

Ví dụ 7: Đánh giá tác dụng của PCV2 của vacxin kết hợp PCV2/M. hyo trong một chai trong các chế phẩm tá dược khác nhau

Nghiên cứu này được thiết kế để đánh giá tác dụng của PCV2 của vacxin kết hợp PCV2/M. hyo trong một lọ trong các chế phẩm tá dược khác nhau. Trong ví dụ này, kháng nguyên PCV2 là virus dạng khảm PCV Typ 1-Typ 2 chết (Fostera PCV). Virus dạng khảm này được kết hợp với chế phẩm kháng nguyên hòa tan M. hyo là hầu như không chứa IgG (tức là dịch nổi được xử lý bằng Protein A).

Xử lý dịch:

Dịch lên men M. hyo đã được làm bất hoạt (được mô tả trên đây trong Ví dụ 1) được xử lý đối với mỗi nhóm được chỉ định là như sau.

T02-T04: Toàn bộ dịch lên men chứa tế bào *M. hyopneumoniae* sống (được mô tả trên đây) được ly tâm ở ~20,000xg (Sorvall RC5B) và thu gom dịch nổi và khử trùng qua bộ lọc 0,2µM. rProtein A Sepharose (số phần 17-5199-03, GE Healthcare) được bao trong cột sắc ký 1 lít. Sau khi loại bỏ dung dịch đệm bảo quản và xử lý bằng 2 thể tích cột axit axetic 1M, cân bằng nhựa này bằng 5 thể tích cột dung dịch đệm NaPO₄ 50mM/NaCl 1M, pH=7,04. Khoảng 2 lít dịch chứa kháng nguyên *M. hyopneumoniae* đã lọc/làm trong được đưa qua nhựa Protein A ở lưu tốc 100cm/giờ. Thu gom dòng chảy qua và khử trùng qua bộ lọc 0,2µM.

T05: Đây là đối chứng dương tính tương ứng với chế phẩm kiểu Fostera PCV (không kháng nguyên M. hyo). Mức virus dạng khảm trong chế phẩm kiểu Fostera PCV này là xấp xỉ mức bào chế liều gây miễn dịch tối thiểu (Minimum Immunizing Dose: MID). Virus dạng khảm được đưa vào các vacxin thực nghiệm PCV2/M. hyo ở mức bào chế tương tự.

Tất cả các vacxin PCV2/M. hyo thực nghiệm đều được bào chế với các chế phẩm tá dược khác nhau. Các vacxin thực nghiệm này được bào chế với các kháng nguyên M. hyo được xử lý theo các mẫu điều trị T02-T04 trên đây. Ngoài ra, mẫu điều trị T01 tương ứng với thuốc vờ (nước muối vô trùng).

Tất cả các vacxin đều được chuẩn hóa bằng ELISA đối với p46 và bảo quản bằng thimerosol. Các chế phẩm thực nghiệm này được mô tả trong Bảng 6 dưới đây, trong đó

ký hiệu * chỉ kháng nguyên M. hyo từ giống M. hyo tổng, dịch nổi được xử lý bằng Protein A và ký hiệu ** chỉ loại sản phẩm thú y nghiên cứu (IVP).

Bảng 6: Các chế phẩm vacxin thực nghiệm PCV2/M. hyo dùng cho nghiên cứu về tác dụng của PCV2

Điều trị	Loại IVP **	Kháng nguyên PCV1-2	Kháng nguyên M. Hyo*	Tá dược	Thành phần khác
T01	87-244-DK (Thuốc vờ)	NA			Nước muối vô trùng
T02	L0411RK08	1,6 RP	7,5 RP	SP-dầu 10%	NA
T03	L0411RK09			Amphigen 5%	
T04	L0611RK03			Amphigen 5% + SLCD 5%	
T05	L0611RK04		NA	SLCD 20%	

Lợn 3 tuần tuổi được tiêm chủng qua đường trong bắp bằng liều duy nhất của các chế phẩm vacxin khác nhau được mô tả trong Bảng 6 trên đây. Mười sáu con được xếp vào mỗi nhóm điều trị. Cho lợn dùng liều quyết định ở 21 ngày sau khi tiêm chủng thể phân lập thực địa PCV2 độc.

Fig.3 là đồ thị thể hiện kết quả virus huyết PCV2 (PCR định lượng PCV2k) quan sát được với các nền tá dược khác nhau, cần lưu ý rằng virus huyết PCV2 được dùng làm biến tác dụng sơ cấp. Kết quả virus huyết PCV2 được thể hiện dưới dạng số bản sao ADN/ml. Như được thể hiện trên Fig.3, tất cả các mẫu điều trị đều có mức virus huyết thấp hơn đáng kể so với thuốc vờ vào ngày 28, 35 và 42 (dùng liều quyết định là vào ngày 21). Tá dược SP-dầu 10% có mức virus huyết thấp hơn đáng kể so với Amphigen 5% vào ngày 28 và 35. Tá dược Amphigen 5% + SLCD 5% có mức virus huyết thấp hơn đáng kể so với Amphigen 5% vào ngày 28 và 35. Nền tá dược SLCD 20% có mức virus huyết thấp hơn đáng kể so với Amphigen 5% vào ngày 28, 35 và 42.

Huyết thanh học PCV2, sự thải PCV2 qua phân, sự thải PCV2 qua mũi, đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào (Cell Mediated Immune: CMI), sự tiêu bạch huyết, và hóa mô miễn dịch (Immunohistochemistry: IHC) cũng được theo dõi dưới dạng biến tác dụng thứ cấp. Các kết quả này sẽ được mô tả dưới đây.

Fig.4 là đồ thị thể hiện kết quả PCV2 ELISA vào ngày 1, 20 và 42 của nghiên cứu (dùng liều quyết định là vào ngày 21). Vị trí của mỗi mẫu được thể hiện dưới dạng tỷ lệ mẫu/dương tính (S/P). Như được thể hiện trên Fig.4, SLCD 20% là mẫu điều trị duy nhất khác biệt đáng kể so với thuốc vờ (T01) vào cả ngày 20 lẫn ngày 42. Tương tự, Amphigen

5% là mẫu điều trị duy nhất khác biệt đáng kể so với thuốc vờ vào ngày 20.

Fig.5 là đồ thị thể hiện mức thải PCV2 qua phân thu được với các nhóm điều trị T02-T04 so với thuốc vờ (T01). Kết quả được thể hiện dưới dạng số bản sao ADN của PCV2/ml. Kết quả trên Fig.5 chỉ ra rằng tất cả các nhóm điều trị đều có mức thải qua phân thấp hơn đáng kể so với thuốc vờ vào ngày 42. Ngoài ra, Amphigen 5% & SLCD 5% (T04) có mức thải qua phân thấp hơn đáng kể so với Amphigen 5% (T03) vào ngày 42. Không ghi nhận được sự khác biệt điều trị nào khác.

Fig.6 là đồ thị thể hiện mức thải PCV2 qua mủ thu được với các nhóm điều trị T02-T04 so với thuốc vờ (T01). Kết quả được thể hiện dưới dạng số bản sao ADN của PCV2/ml. Kết quả trên Fig.6 chỉ ra rằng tất cả các nhóm điều trị đều có mức thải qua mủ thấp hơn đáng kể so với thuốc vờ vào ngày 42. Ngoài ra, SLCD 20% (T05) có mức thải qua mủ thấp hơn đáng kể so với Amphigen 5% (T03) vào ngày 42. Không ghi nhận được sự khác biệt điều trị nào khác.

Fig.7 (A & B) là hai đồ thị thể hiện kết quả của thử nghiệm interferon-gama (IFN- γ) đo đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào (CMI) đặc hiệu với PCV2. Kết quả về CMI được thể hiện là sau tiêm chủng/trước liều quyết định (Fig.7A), và sau tiêm chủng/sau liều quyết định (Fig.7B). Trong các đồ thị này, sự kích thích 5×10^6 được coi là đáng kể (...). Tất cả các vacxin thực nghiệm PCV2/M. hyo đều có đáp ứng IFN- γ sau tiêm chủng phát hiện được. SP-dầu 10% (T02) cho đáp ứng IFN- γ sau tiêm chủng mạnh nhất. SLCD 20% (T05) tạo ra đáp ứng sớm hơn, nhưng đáp ứng thấp nhất vào ngày 20. Có đáp ứng cao sau liều quyết định, đặc biệt là quan sát thấy ở nhóm thuốc vờ. Ngoài ra, đáp ứng sau liều quyết định là thấp hơn ở các nhóm điều trị lợn được tiêm chủng so với nhóm thuốc vờ.

Bảng 7 dưới đây thể hiện mức tan bạch huyết thu được với các nhóm điều trị thực nghiệm trái ngược với thuốc vờ.

Bảng 7: Mô bệnh học (sự tan bạch huyết) PCV2

Điều trị	Mức tan bạch huyết			Trái ngược với thuốc vờ	
	Dương tính	Âm tính	% Đã từng dương tính	Trị số p	Ý nghĩa
Thuốc vờ	9	7	56%	NA	NA
SP-dầu 10%	1	15	6%	0,0059	Có
Amphigen 5%	1	15	6%	0,0059	Có

Amph 5% +SLCD 5%	0	16	0%	0,0008	Có
SLCD 20%	1	15	6%	0,0059	Có

Kết quả trong Bảng 7 trên đây cho thấy rằng tất cả các vaccin đều tạo ra sự phòng ngừa mạnh đối với sự tan bạch huyết. Cũng không quan sát thấy các trái ngược điều trị vaccin có ý nghĩa thống kê.

Bảng 8 dưới đây thể hiện hóa mô miễn dịch thu được với các nhóm điều trị thực nghiệm trái ngược với thuốc vờ.

Bảng 8: Mô bệnh học (hóa mô miễn dịch đối với PCV2)

	Hóa mô miễn dịch			Trái ngược với thuốc vờ	
Điều trị	Dương tính	Âm tính	% Đã từng dương tính	Trị số p	Ý nghĩa
Thuốc vờ	12	4	75%	NA	NA
SP-dầu 10%	0	16	0%	0,0001	Có
Amphigen 5%	1	15	6%	0,0002	Có
Amph 5% + SLCD 5%	0	16	0%	0,0001	Có
SLCD 20%	0	16	6%	0,0001	Có

Kết quả trong Bảng 8 trên đây cho thấy rằng tất cả các vaccin đều tạo ra sự phòng ngừa mạnh đối với sự khu trú PCV2 như được chứng minh bằng hóa mô miễn dịch. Cũng không quan sát thấy các trái ngược điều trị vaccin có ý nghĩa thống kê.

Kết luận, kết quả trong ví dụ này chứng minh rằng chế phẩm kháng nguyên hòa tan M. hyo không ngăn cản tác dụng của PCV2. Kết quả này cũng cho thấy rằng tất cả các chế phẩm vaccin thực nghiệm PCV/M. hyo đều có tác dụng chống lại liều PCV2 quyết định. Ngoài ra, kết quả này chỉ ra rằng có sự khác biệt về số và thống kê nhất định thu được với các chế phẩm tá được khác nhau, với SP-dầu 10% cho tác dụng mạnh nhất.

Ví dụ 8: Đánh giá tác dụng của M. hyo của vaccin kết hợp PCV2/M. hyo trong một lọ với các chế phẩm tá được khác nhau

Nghiên cứu này được thiết kế để đánh giá tác dụng của M. hyo của vaccin kết hợp PCV2/M. hyo trong một lọ với các chế phẩm tá được khác nhau. Kháng nguyên M. hyo được kết hợp với Circovirut lợn (virus chết dạng khảm Typ 1-Typ 2, hoặc PCV1-2) trong một lọ.

Xử lý dịch:

Dịch lên men M. hyo đã được làm bất hoạt (được mô tả trên đây trong Ví dụ 1)

được xử lý đối với mỗi nhóm được chỉ định là như sau.

T02-T04: Các nhóm điều trị này là giống như được mô tả đối với các nhóm điều trị T02- T04 trong Ví dụ 7 trên đây.

T05: Nhóm này được bào chế với tế bào M. hyo được làm bất hoạt (Vaccin vi khuẩn M. hyo) như được mô tả trong Ví dụ 1 trên đây dưới đề mục “Lên men và làm bất hoạt”.

Tất cả các vaccin PCV2/M. hyo thực nghiệm đều được bào chế với các chế phẩm tá dược khác nhau. Các chế phẩm vaccin thực nghiệm này được bào chế với các kháng nguyên M. hyo được xử lý theo các nhóm điều trị T02-T04. Ngoài ra, nhóm điều trị T01 tương ứng với thuốc vờ (nước muối vô trùng). Nhóm điều trị T05 là đối chứng dương tính tương ứng với vaccin RespiSure® hết hạn, là vaccin trên cơ sở vaccin vi khuẩn M. hyo (Pfizer Animal Health).

Các chế phẩm thực nghiệm này được mô tả trong Bảng 9 dưới đây, trong đó ký hiệu * chỉ kháng nguyên M. hyo từ giống M. hyo tổng, dịch nổi được xử lý bằng Protein A và ký hiệu ** chỉ loạt sản phẩm thú y nghiên cứu (IVP).

Bảng 9: Các chế phẩm vaccin thực nghiệm PCV2/M. hyo dùng cho nghiên cứu về tác dụng của M. hyo trong các chế phẩm tá dược khác nhau

Điều trị	Loạt IVP**	Kháng nguyên PCV1-2	Kháng nguyên M.Hyo*	Tá dược	Khác
T01	87-244-DK (Thuốc vờ)	NA			Nước muối vô trùng
T02	L0411RK08	1,6 RP	7,5 RP	SP-dầu 10%	NA
T03	L0411RK09			Amphigen 5%	
T04	L0611RK03			Amphigen 5% + SLCD 5%	
T05	A827870	Vaccin “RespiSure” hết hạn			

Lợn 3 tuần tuổi được tiêm chủng qua đường trong bắp bằng liều duy nhất của các chế phẩm vaccin khác nhau được mô tả trong Bảng 9 trên đây. Mười bốn con được xếp vào cả nhóm thuốc vờ lẫn nhóm SP-dầu 10%, 13 con được xếp vào nhóm đối chứng dương tính, và 16 con được xếp vào cả nhóm Amphigen 5% lẫn nhóm Amphigen 5% + SLCD 5%.

Cho lợn dùng liều quyết định ở 21 ngày sau khi tiêm chủng thể phân lập thực địa M. hyo độc. Mô khám nghiệm lợn ở 28 ngày sau liều quyết định và lấy phổi và tính điểm

số tổng hợp phù hợp với bệnh nhiễm M. hyo. Bảng 10 dưới đây thể hiện điểm số tổn thương phổi đối với các nhóm điều trị tương ứng. Ý nghĩa thống kê được xác định bằng phân tích mô hình hỗn hợp (Mixed Model Analysis) về điểm số phổi đối với mỗi nhóm.

Bảng 10: Tổn thương phổi do M. hyo

Điều trị	Số con	Tổn thương phổi trung bình LS	Giới hạn % tổn thương phổi
Thuốc vờ (T01)	14	13,1%	0,1 - 50,5
SP-dầu 10% (T02)	14	4,3%	0,0 - 50,8
Amphigen 5% (T03)	16	4,7%	0,0-38,5
Amph 5%+SLCD 5% (T04)	16	12,0%	0,1-55,8
RSO hết hạn (T05)	13	2,28%	0,0-34,5

Như được chỉ ra trong Bảng 10 trên đây, nhóm thuốc vờ có điểm số tổn thương phổi trung bình là 13,1%, so với các nhóm điều trị SP-dầu 10% và Amphigen 5% có điểm số tổn thương phổi trung bình lần lượt là 4,3% và 4,7%. Cả hai chế phẩm SP-dầu 10% và Amphigen 5% đều cho mức độ tổn thương phổi giảm và/hoặc được ngăn ngừa. Do đó, các vaccin PCV/M. hyo thực nghiệm bào chế với SP-dầu 10% hoặc Amphigen 5% được coi là có tác dụng. Kháng nguyên PCV2 rõ ràng không ngăn cản tác dụng của M. hyo của các chế phẩm này.

Ngược lại, nhóm Amphigen 5% + SLCD 5% có điểm số tổn thương phổi trung bình là 12,0%, kết quả này không chấp nhận được ở chỗ nó không khác biệt so với thuốc vờ. Kết quả là, vaccin PCV/M. hyo thực nghiệm bào chế với Amphigen 5% + SLCD 5% được coi là không có tác dụng.

Cần lưu ý rằng do số lợn giảm và khả năng biến đổi cao về việc tính điểm số tổn thương phổi nên không thể kết luận chứng minh được tác dụng điều trị thống kê trong nghiên cứu này. Do đó, đã quyết định rằng nghiên cứu khác sẽ được thiết kế để thử nghiệm tác dụng của M. hyo của các chế phẩm thực nghiệm PCV/M. hyo trong SP-dầu 10%. Nghiên cứu lặp lại này được thể hiện trong Ví dụ 9 dưới đây.

Ví dụ 9: Đánh giá tác dụng của M. hyo của vaccin kết hợp PCV2/M. hyo trong một lọ trong SP-dầu 10%

Nghiên cứu này được thiết kế để đánh giá tác dụng của phân đoạn M. hyo của bốn vaccin PCV2/M. hyo thực nghiệm (loạt L0711RK11, L0711RK12, L0711RK13 và L0711RK 14 trong Bảng 11 dưới đây) được bào chế bằng các quy trình sản xuất M. hyo có sử

dùng Protein A để loại bỏ IgG so với các vacxin đối chứng bào chế bằng quy trình sản xuất M. hyo chuẩn, mỗi một trong bốn vacxin PCV2/M. hyo này đều chứa SP-dầu 10% làm tá dược.

Xử lý dịch:

T02: Kháng nguyên *M. hyopneumoniae* được làm bất hoạt được mô tả dưới đề mục “Lên men và làm bất hoạt” trong Ví dụ 1 trên đây.

T03 và T04: Bào chế với tế bào *M. hyopneumoniae* được làm bất hoạt như được mô tả dưới đề mục “Lên men và làm bất hoạt” trong Ví dụ 1 trên đây.

T05: Xử lý môi trường bằng Protein A để nuôi cấy *M. hyopneumoniae*. PPLO (được tạo ra từ tim lợn) được tạo ra theo hướng dẫn của nhà sản xuất (tức là 21g/l) và dung dịch chiết nấm men được điều chế ở 21g/l theo USP. Thêm dung dịch chiết nấm men vào PPLO ở 6,25% và khử trùng hỗn hợp thu được bằng cách gia nhiệt đến 121°C trong > 30 phút. Điều chế xystein hydroclorua ở 90g/l và lọc vô trùng. Điều chế dung dịch dextroza bằng cách thêm 450g dextroza/lít nước USP tiếp theo là khử trùng bằng nhiệt. Để điều chế môi trường cuối, thêm huyết thanh lợn vào môi trường bazơ 10% tiếp theo là xystein ở 0,01% và dextroza ở 1,0%. Kháng thể trong môi trường PPLO đầy đủ được loại bỏ bằng cách xử lý bằng protein A. Nối vắn tắt, đóng gói một lít rProtein A Sepharose (số phần 17-5199-03 GE Healthcare) trong cột thủy tinh (10 x 11,5cm). Sau khi loại bỏ dung dịch bảo quản, xử lý cột bằng 2 thể tích cột axit axetic 1M. Cân bằng nhựa này bằng 5 thể tích cột 50 mM NaPO₄, dung dịch đệm NaCl 1M (pH=7,0). Nạp 15 lít môi trường PPLO đầy đủ lên nhựa ở lưu tốc tuyến tính 140 cm/giờ. Thu gom dòng chảy qua và khử trùng qua bộ lọc 0,2 micron (Sartorius). Môi trường đã được xử lý này được dùng để tế bào *M. hyopneumoniae* sinh sản như được mô tả dưới đề mục “Lên men và làm bất hoạt” trên đây. Toàn bộ giống đã được làm bất hoạt (chứa tế bào) được bào chế thành vacxin cuối.

T06: Tế bào *M. hyopneumoniae* được làm bất hoạt được điều chế như được mô tả dưới đề mục “Lên men và làm bất hoạt” trong Ví dụ 1 trên đây. Dịch lên men được làm bất hoạt được ly tâm ở ~20,000 x g (Sorvall RC5B) trong 30 phút và khử trùng dịch nổi qua bộ lọc 0,2 µM. Đóng gói 115ml nhựa rProtein A (số phần 12-1279-04, MAbSelect, GE Healthcare) trong cột sắc ký (5x6cm). Sau khi loại bỏ dung dịch đệm bảo quản và xử lý bằng 2 thể tích cột axit axetic 1M, cân bằng nhựa này bằng 5 thể tích cột NaPO₄ 50mM/dung dịch đệm NaCl 1M, pH=7,01. Khoảng 1,2 lít dịch chứa kháng nguyên *M.*

hyopneumoniae đã lọc/làm trong được đưa qua nhựa Protein A ở lưu tốc 120cm/giờ. Thu gom dòng chảy qua và khử trùng qua bộ lọc 0,2µM.

T07: Tế bào *M. hyopneumoniae* được làm bất hoạt được điều chế như được mô tả dưới đề mục “Lên men và làm bất hoạt” trong Ví dụ 1 trên đây. Dịch lên men được làm bất hoạt được làm trong bằng cách lọc dòng tiếp tuyến. Nói vắn tắt, bộ lọc polyete sulfon (GE Healthcare, số phần 56-4102-71) có cỡ lỗ danh định 0,2µM được khử trùng bằng dung dịch natri hydroxit 0,5N tiếp theo là rửa kỹ bằng nước USP vô trùng. Dịch nuôi cấy *Mycoplasma* được làm bất hoạt được đưa vào thiết bị ở tốc độ tái tuần hoàn là 14,6L/phút và áp suất qua màng là 2-3,4 PSI. Việc làm trong được thực hiện ở nhiệt độ trong phòng. Thu gom dịch lọc và bảo quản ở 2-8°C cho đến khi xử lý tiếp. Đóng gói 115ml nhựa rProtein A (số phần 12-1279-04, MAbSelect, GE Healthcare) trong cột sắc ký (5x6cm). Sau khi loại bỏ dung dịch đệm bảo quản và xử lý bằng 2 thể tích cột axit axetic 1M, cân bằng nhựa này bằng 5 thể tích cột NaPO₄ 50mM/dung dịch đệm NaCl 1M, pH=7,01. Khoảng 2,3 lít dịch chứa kháng nguyên *M. hyopneumoniae* đã lọc/làm trong được đưa qua nhựa Protein A ở lưu tốc 120cm/giờ. Thu gom dòng chảy qua và khử trùng qua bộ lọc 0,2µM.

T08: Tế bào *M. hyopneumoniae* được làm bất hoạt được điều chế như được mô tả dưới đề mục “Lên men và làm bất hoạt” trên đây. Dịch lên men được làm bất hoạt được ly tâm ở ~20,000xg (Sorvall RC5B) trong 30 phút và khử trùng dịch nổi qua bộ lọc 0,2µM. Đóng gói 115ml rProtein A Sepharose (số phần 17-5199-03 GE Healthcare) trong cột sắc ký (5x6cm). Sau khi loại bỏ dung dịch đệm bảo quản và xử lý bằng 2 thể tích cột axit axetic 1M, cân bằng nhựa này bằng 5 thể tích cột NaPO₄ 50mM/dung dịch đệm NaCl 1M, pH=7,01. Khoảng 1,2 lít dịch chứa kháng nguyên *M. hyopneumoniae* đã lọc/làm trong được đưa qua nhựa Protein A ở lưu tốc 120cm/giờ. Thu gom dòng chảy qua và khử trùng qua bộ lọc 0,2µM.

Các chế phẩm vacxin thực nghiệm được bào chế với các kháng nguyên *M. hyo* được xử lý theo các mẫu điều trị T02-T08 trên đây. T02, T03 và T04 tương ứng với các đối chứng dương tính. Ngoài ra, mẫu điều trị T01 tương ứng với thuốc vờ (nước muối vô trùng).

Các chế phẩm thực nghiệm này được mô tả trong Bảng 11 dưới đây. Kháng nguyên *M. hyo* tương ứng với kháng nguyên *M. hyo* từ giống *M. hyo* tổng, dịch nổi được xử lý bằng Protein A. Thông tin trong cột “xử lý bằng Protein A” chỉ dịch nổi *M. hyo* được xử

lý bằng Protein A trước hoặc sau lên men.

Bảng 11: Các chế phẩm vaccin thực nghiệm PCV2/M. hyo dùng cho nghiên cứu về tác dụng của M. hyo trong tá dược SP-dầu

Điều trị	Loạt	Kháng nguyên PCV1-2	Kháng nguyên M. hyo	Xử lý bằng Protein A	Phương pháp làm trong dịch nổi	Tên loại Protein A	Tá dược	Khác
T01	L0311AS11	NA						Nước muối vô trùng
T02	A828718	NA	13	RespiSure One hết hạn			Amphigen	NA
T03	L0711RK09	1,5 RP	7,5 RP	M. hyo không được xử lý bằng Protein A và có PCV-2			SP-dầu 10%	
T04	L0711RK10	NA		M. hyo không được xử lý bằng Protein A và không có PCV-2				
T05	L0711RK11	1,5 RP		Trước	NA	Sepharose		
T06	L0711RK12			Sau	Ly tâm	MABSelect		
T07	L0711RK13			Sau	Lọc	MABSelect		
T08	L0711RK14			Sau	Ly tâm	Sepharose		

Lợn 3 tuần tuổi được tiêm chủng qua đường trong bắp bằng liều duy nhất của các chế phẩm vaccin khác nhau được mô tả trong Bảng 11 trên đây. Có 18 con được xếp vào mỗi nhóm. Cho lợn dùng liều quyết định ở 21 ngày sau khi tiêm chủng thể phân lập thực địa M. hyo độc. Mổ khám nghiệm lợn ở 28 ngày sau liều quyết định và lấy phổi và tính điểm số tổng hợp phù hợp với bệnh nhiễm M. hyo. Fig.8 (A & B) thể hiện điểm số tổn thương phổi đối với các nhóm điều trị tương ứng. Ý nghĩa thống kê được xác định bằng phân tích mô hình hỗn hợp (Mixed Model Analysis) về điểm số phổi đối với mỗi nhóm.

Kết quả về tổn thương phổi trên Fig.8A và 8B chỉ ra rằng trong tất cả các mẫu điều trị, chỉ có hai mẫu (T07 và T08) có 100% số lợn nằm trong danh mục có tổn thương phổi <5%. Cần lưu ý rằng khác biệt thống kê rất lớn được quan sát thấy trong nghiên cứu này.

Kết quả trong ví dụ này chứng minh tác dụng của M. hyo trong chế phẩm thực nghiệm PCV2/M. hyo trong một lọ có sử dụng dịch nổi được xử lý bằng Protein A và sử

dụng SP-dầu làm tá dược. Ngoài ra, Ví dụ 7 trên đây chứng minh tác dụng của PCV2 trong chế phẩm PCV2/M. hyo trong một lọ có sử dụng dịch nổi được xử lý bằng Protein A và sử dụng SP-dầu làm tá dược. Tóm lại, tác dụng của cả M. hyo lẫn PCV2 đều được chứng minh trong chế phẩm kết hợp PCV2/M. hyo trong một lọ có sử dụng dịch nổi được xử lý bằng Protein A.

Ví dụ 10: Độ an toàn in vivo trong vacxin thực nghiệm PCV2/M. hyo

Nghiên cứu này được thực hiện để đánh giá độ an toàn *in vivo* của các vacxin PCV2-M. hyo thực nghiệm bào chế được ở liều kháng nguyên tối đa trong các chế phẩm tá dược khác nhau ở động vật chủ khi sử dụng ở độ tuổi thấp nhất (3 tuần tuổi). Các nền tá dược khác nhau được đánh giá để xác định nền tá dược nào trong số đó cho profin an toàn chấp nhận được trên cơ sở nhiệt độ, phản ứng ở vị trí tiêm và quan sát lâm sàng. Chế phẩm SLCD 20%/SP-dầu 10% được dùng làm đối chứng dương tính (“không an toàn”) do các vấn đề mô học với các phản ứng ở vị trí tiêm quan sát được bởi nhóm nghiên cứu này và các vấn đề khác.

Xử lý dịch:

Tất cả các vacxin đều được bào chế với kháng nguyên *M. hyopneumoniae* được làm bất hoạt được mô tả dưới đề mục “Lên men và làm bất hoạt” trong Ví dụ 1. Kháng nguyên M. hyo toàn đơn thể được sử dụng do nó được biết là chứa các kháng nguyên M. hyo hòa tan và không hòa tan, ngoài các globulin miễn dịch và phức chất miễn dịch mà có thể loại bỏ được sau khi xử lý bằng protein A. Có thể kết luận hợp lý rằng việc loại bỏ mảnh vỡ tế bào không hòa tan và globulin miễn dịch và phức chất miễn dịch sẽ chỉ làm tăng thêm độ an toàn của chế phẩm vacxin. Dự tính của nghiên cứu này là thử nghiệm một cách nghiêm ngặt độ an toàn của các chế phẩm tá dược khác nhau chứa kháng nguyên PCV2 và kháng nguyên M. hyo. Các kháng nguyên PCV2 và M. hyo được bào chế ở mức giải phóng tối đa để đánh giá thêm độ an toàn. Các chế phẩm thực nghiệm này được mô tả trong Bảng 12 dưới đây. IVP chỉ sản phẩm thú y nghiên cứu (IVP).

Bảng 12: Các chế phẩm vacxin thực nghiệm PCV2/M. hyo dùng để nghiên cứu về độ an toàn

Loại IVP	Kháng nguyên PCV1-2	Kháng nguyên M.Hyo*	Tá dược	Khác	Thể tích vacxin tối thiểu (mL)
87-244-DK (Thuốc vờ)	NA			Nước muối vô trùng	NA

L0411RK15	7,8 RP	13 RP	SP-dầu 10%	NA	200
L0411RK16			Amphigen 5%		200
L0611RK05			Amphigen 5% + SLCD 5%		200
L0611RK06			SLCD 20% + SP-dầu 10%		200

* Kháng nguyên M. hyo = từ giống M. hyo tổng (kháng nguyên toàn đơn thể).

Các thông số an toàn dùng trong nghiên cứu này là profin nhiệt độ trực tràng và phản ứng ở vị trí tiêm. Kết quả của nghiên cứu này chỉ ra rằng tất cả các nền tá được đưa ra đều cho profin an toàn chấp nhận được về profin nhiệt độ trực tràng và quan sát lâm sàng (kết quả không được thể hiện), chỉ có SLCD 20% + SP-dầu 10% (tức là đối chứng dương tính) là khác biệt đáng kể so với vacxin thuốc vờ và có nhiều phản ứng nghiêm trọng ở vị trí tiêm (kết quả không được thể hiện).

Ví dụ 11: Điều chế kháng nguyên M. hyo được xử lý bằng Protein A dùng cho các nghiên cứu then chốt

Fig.9 là sơ đồ tiến trình thể hiện một phương án về quy trình sản xuất dùng để điều chế kháng nguyên M. hyo được xử lý bằng protein tương thích với PCV2. Toàn bộ giống M. hyo được làm bất hoạt được làm trong tế bào bằng cách lọc dòng tiếp tuyến.

Nói vắn tắt, bộ lọc polyete sulfon (GE Healthcare, số phần 56-4102-49) có cỡ lỗ danh định 0,45µm được khử trùng bằng dung dịch natri hydroxit 0,5N tiếp theo là rửa kỹ bằng nước USP vô trùng. Dịch nuôi cấy *Mycoplasma* được làm bất hoạt được đưa vào thiết bị ở tốc độ tái tuần hoàn là 11,0 l/phút và áp suất qua màng là ~5 PSI. Việc làm trong được thực hiện ở nhiệt độ trong phòng. Thu gom dịch lọc và bảo quản ở 2-8°C cho đến khi xử lý tiếp.

Sau khi làm trong, xử lý dịch chứa kháng nguyên bằng nhựa protein A để làm giảm mức kháng thể. Nói vắn tắt, đóng gói nhựa protein A MAbSelect (GE Healthcare) trong cột thủy tinh tới độ cao 12cm. Cân bằng nhựa này bằng 5 thể tích cột natri phosphat 50mM, dung dịch đệm NaCl 250mM (pH=7,0). Nạp dịch chứa kháng nguyên, tương đương với 10 thể tích cột, lên nhựa ở lưu tốc tuyến tính 100 cm/giờ. Thu gom dịch qua cột và lọc vô trùng qua bộ lọc 0,2 micron. Tái tạo cột bằng cách cho 3 thể tích cột dung dịch axetat 25mM có độ pH=3,7 tiếp theo là 4 thể tích cột dung dịch axit axetic 1M chảy qua. Đo các mức kháng thể kháng PCV2 và kháng nguyên *M. hyopneumoniae* trong dịch kháng nguyên cuối lần lượt bằng ELISA kháng thể đặc hiệu với PCV2 và ELISA định lượng kháng nguyên p46.

Ví dụ 12: Đánh giá hoạt tính diệt virus PRRS

Các nghiên cứu trong ví dụ này được thiết kế để đánh giá các nền tá dược khác nhau về hoạt tính diệt virus PRRS. Các tá dược ban đầu tập trung vào tá dược duy nhất (tức là chế phẩm không chứa kháng nguyên PCV hoặc kháng nguyên M. hyo). Việc đánh giá tá dược về hoạt tính diệt virus PRRS được thể hiện trên Fig.10. Việc đánh giá sơ bộ về hoạt tính diệt virus chỉ ra rằng SP-dầu 10%, Carbopol 0,2% và Amphigen 5% không có hoạt tính diệt virus PRRS. Ngược lại, tá dược SLCD 20% rõ ràng là có hoạt tính diệt virus PRRS.

Các nghiên cứu khác được thực hiện để đánh giá các chế phẩm PCV/M. hyo chứa các nền tá dược khác nhau có hoạt tính diệt virus PRRS hay không. Kết quả được thể hiện trong Bảng 13, trong đó ký hiệu * chỉ loại vacxin không diệt được PRRSV.

Bảng 13: Kết quả của thử nghiệm diệt virus PRRS bằng các chế phẩm khác nhau

Loại vacxin dùng trong các nghiên cứu của Ví dụ 7, 8,10		Hoạt lực			Diệt virus PRRS	
Nghiên cứu	Mô tả	Loại	p46RP (ru/ds)	PCV2 NVSL RP	A	B
Ví dụ 7, 8, 10	Nước muối vô trùng (natri clorua 0,9%)	87-244-DK (Thuốc vờ)				
Ví dụ 7, 8	cPCV (RP 1,6) + M. hyo được xử lý bằng Protein A (RP 7,5) trong SP-dầu 10%	L0411RK08	7,1	1,29	-0,10	-0,13
Ví dụ 7, 8	cPCV (RP 1,6) + M. hyo được xử lý bằng Protein A (RP 7,5) trong Amphigen	L0411RK09	7,3	1,33	-0,10	+0,14
Ví dụ 7, 8	cPCV (RP 1,6) + M. hyo được xử lý bằng Protein A (RP 7,5) trong Amph 5% +	L0611RK03	6,9	1,15	-0,36	-0,33
Ví dụ 7	cPCV (RP 1,6) đơn thể trong SLCD 20%	L0611RK04		1,50	-1,86*	-0,50
Ví dụ 8	Loại RespiSure One hết hạn	A827870	12,6			
Ví dụ 10	cPCV (RP 7,8) + M. hyo Toàn đơn thể (RP 13,3) trong SP-dầu 10%	L0411RK15	14	1,03	-0,32	-0,03
Ví dụ 10	cPCV (RP 7,8) + M. hyo Toàn đơn thể (RP 13,3) trong Amphigen 5%	L0411RK16	15,5	1,12	-0,36	-0,53
Ví dụ 10	cPCV (RP 7,8) + M. hyo Toàn đơn thể (RP 13,3) trong Amph 5% + SLCD 5%	L0611RK05	17,5	1,50	-0,54	-0,33
Ví dụ 10	cPCV (RP 7,8) + M. hyo Toàn đơn thể (RP 13,3) trong SLCD 20% + SP-dầu	L0611RK06	15,9	1,13	-1,93*	-0,99*

*Chỉ diệt virus (>0,7 log mức hao hụt)

A-GMT đối chứng thử nghiệm diệt virus ~5,53 log/mL B - GMT đối chứng thử nghiệm

diệt virus ~6,42 log/mL

Kết quả nêu trong Bảng 13 trên đây chỉ ra rằng SP-dầu 10% là không có hoạt tính diệt virus PRRS.

Các loại vaccine PCV/M. hyo khác được bào chế bằng cách sử dụng SP-dầu 10% làm tá dược (Bảng 14). Hoạt lực kháng nguyên của các loại vaccine này được so sánh với loại vaccine PCV/M. hyo so sánh (L1211RK15) chứa 0,688% thể cô 20x của kháng nguyên PCV2 (điều chế được như được mô tả trong Ví dụ 2); và 9,40% kháng nguyên M. hyo điều chế được như được mô tả trong Ví dụ 11. Kết quả nêu trong Bảng 14 dưới đây còn chỉ ra rằng SP-dầu 10% là không có hoạt tính diệt virus PRRS. Các trị số của mẫu thử nghiệm trong Bảng 14 đều cao hơn (dấu +) so với đối chứng thử nghiệm diệt virus, chúng có hiệu giá trung bình số học (geometric mean titer: GMT) khoảng $5,9 \pm 0,5$ log/ml.

Bảng 14: Kết quả của thử nghiệm diệt virus bằng các chế phẩm PCV/M. hyo khác nhau chứa SP-dầu 10%

Loại vaccine được sử dụng		Hoạt lực		Diệt virus PRRS
Mô tả	Loại	p46 RP (ru/ds) so với L1211RK15	PCV2 NVSL so với L1211RK15	Log10 TCID50/mL
Chất pha loãng vô trùng (nước vô trùng)	1949122	na	na	
cPCV + M. hyo được xử lý bằng Protein A trong SP-dầu 10%	L0912RK12	1,62	2,60	+0,58
cPCV + M. hyo được xử lý bằng Protein A trong SP-dầu 10%	L0912RK10	0,88	1,23	+0,58
cPCV + M. hyo được xử lý bằng Protein A trong SP-dầu 10%	L0912RK11	1,24	2,62	+0,58
cPCV + M. hyo được xử lý bằng Protein A trong SP-dầu 10%	L0912RK08	1,08	1,03	+0,91
cPCV + M. hyo được xử lý bằng Protein A trong SP-dầu 10%	L0912RK09	1,65	2,06	+0,50

GMT đối chứng thử nghiệm diệt virus ~ $5,9 + 0,5$ log/ml

Kết quả trong ví dụ này chứng minh rằng SP-dầu 10% là không có hoạt tính diệt virus PRRS. Kết quả trong ví dụ này còn chứng minh rằng chế phẩm PCV/M. hyo chứa SP-dầu 10% là thuộc loại vaccine được coi là không có hoạt tính diệt virus PRRS (Bảng 13 và Bảng 14). Kết luận, chế phẩm PCV/M. hyo chứa SP-dầu 10% được coi là nền hữu hiệu cho hỗn hợp tam trị gồm PCV, M. hyo và virus PRRS.

Ví dụ 13: Bào chế vaccine kết hợp PCV/M. hyo/PRRS

Chế phẩm PCV/M. hyo chứa nền tá dược mà không có hoạt tính diệt virus PRRS

(xem các Bảng 13 và 14 trên đây) được đề xuất dưới dạng dùng ngay trong chế phẩm lỏng trong một lọ. Chế phẩm PCV/M. hyo trong một lọ này sử dụng dịch nổi M. hyo được xử lý bằng Protein A. Cả tác dụng của M. hyo lẫn PCV2 đều đã được chứng minh trong các chế phẩm PCV2/M. hyo có sử dụng cho nổi M. hyo được xử lý bằng Protein A (xem Ví dụ 7- 9). Trong ví dụ này, chế phẩm PCV2/M. hyo nhị trị được kết hợp với kháng nguyên virus PRRS đơn thể.

Theo một phương án, chế phẩm kết hợp PCV/M. hyo trong SP-dầu 10% và tương ứng với một trong số các loạt vacxin L0711RK11, L0711RK12, L0711RK13 và L0711RK14 trong Bảng 11 trên đây được đề xuất dưới dạng dùng ngay trong chế phẩm lỏng một lọ. Kết quả nêu trong Ví dụ 12 trên đây chứng minh rằng SP-dầu 10% là không có hoạt tính diệt virus PRRS. Ví dụ 12 còn chứng minh rằng các chế phẩm PCV2/M. hyo chứa SP-dầu 10% là thuộc loại vacxin được coi là không có hoạt tính diệt virus PRRS. Trong ví dụ này, chế phẩm lỏng PCV2/M. hyo trong một lọ này được dùng để tái hydrat hóa chế phẩm virus PRRS sống được cải biến di truyền động khô chứa trong lọ thứ hai, sao cho tất cả các kháng nguyên đều chứa trong một lọ duy nhất trước khi được dùng cho lợn có độ tuổi thích hợp (ví dụ, ở 3 tuần tuổi hoặc lớn hơn).

Theo một phương án, virus PRRS virus có trình tự hệ gen tương ứng với SEQ ID NO: 16 hoặc biến thể của nó. Theo phương án khác, virus PRRS dùng trong chế phẩm tam trị là thể phân lập virus PRRS có ký hiệu ISU-55, được lưu giữ ở ATCC với số hiệu lưu giữ VR 2430. Lượng thích hợp của các kháng nguyên tương ứng sẽ được mô tả trong bản mô tả này. Mong muốn là, tất cả các kháng nguyên đều được dùng trong một lọ duy nhất cho lợn.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm gây miễn dịch chứa phần hòa tan của chế phẩm toàn tế bào *Mycoplasma hyopneumoniae* (M. hyo), trong đó phần hòa tan của chế phẩm M. hyo chứa các kháng nguyên protein tan đặc hiệu với M.hyo và được chuẩn bị từ nguyên liệu tế bào không tan và gần như không chứa cả (i) IgG lẫn (ii) phức chất miễn dịch gồm kháng nguyên liên kết với globulin miễn dịch.
2. Chế phẩm gây miễn dịch theo điểm 1, trong đó phần hòa tan đã được xử lý bằng protein-A hoặc protein-G trước khi được thêm vào chế phẩm gây miễn dịch.
3. Chế phẩm gây miễn dịch theo điểm 1, trong đó chế phẩm gây miễn dịch này còn chứa kháng nguyên mà có tác dụng bảo vệ chống lại vi sinh vật được chọn từ nhóm bao gồm virus gây hội chứng sinh sản và hô hấp ở lợn (PRRSV), parvovirus ở 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 cúm ở lợn (SIV), kháng nguyên của *Escherichia coli*, *Brachyspira hyodysenteriae*, coronavirus hô hấp ở lợn, virus gây dịch tiêu chảy ở lợn (PED), rotavirus, virus Torque teno (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 tổ hợp của chúng.
4. Chế phẩm gây miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó chế phẩm gây miễn dịch này còn chứa tá dược.
5. Chế phẩm gây miễn dịch theo điểm 4, trong đó tá dược được chọn từ nhóm bao gồm tá dược dầu trong nước, tá dược polyme và nước, tá dược nước trong dầu, tá dược nhôm hydroxit, tá dược vitamin E và tổ hợp của chúng.
6. Chế phẩm gây miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó chế phẩm gây miễn dịch này còn chứa chất mang được dụng.
7. Chế phẩm gây miễn dịch theo điểm 1 hoặc 2, trong đó chế phẩm gây miễn dịch này ở dạng liều duy nhất.
8. Chế phẩm gây miễn dịch theo điểm 3, trong đó chế phẩm gây miễn dịch này ở dạng liều duy nhất.
9. Kit gồm:

lọ chứa chế phẩm gây miễn dịch chứa phần hòa tan của chế phẩm toàn tế bào *Mycoplasma hyopneumoniae* (M. hyo), trong đó phần hòa tan của chế phẩm M. hyo chứa các kháng nguyên protein tan đặc hiệu với M.hyo và được chuẩn bị từ nguyên liệu tế bào không tan và gần như không chứa cả (i) IgG lẫn (ii) phức chất miễn dịch kháng nguyên/globulin miễn dịch.

10. Kit theo điểm 9, trong đó kit này còn chứa cảm nang hướng dẫn chứa thông tin về cách dùng chế phẩm gây miễn dịch.

11. Phương pháp bào chế chế phẩm gây miễn dịch chứa phần hòa tan của chế phẩm toàn tế bào *Mycoplasma hyopneumoniae* (M. hyo), phương pháp này bao gồm các bước sau:

- i) nuôi cấy M. hyo trong môi trường thích hợp trong khoảng thời gian từ 18 đến 144 giờ;
- ii) tiếp theo làm bất hoạt giống M. hyo;
- iii) thu hoạch dịch nuôi cấy đã được làm bất hoạt, trong đó dịch nuôi cấy đã được làm bất hoạt chứa chế phẩm toàn tế bào M. hyo chứa cả phân đoạn lỏng hòa tan lẫn thành phần tế bào không hòa tan;
- iv) tách phân đoạn chất lỏng hòa tan ra khỏi thành phần tế bào không hòa tan; và
- v) gần như loại bỏ cả IgG lẫn phức chất kháng nguyên/globulin miễn dịch ra khỏi phân đoạn chất lỏng hòa tan để tạo ra phần hòa tan của chế phẩm toàn tế bào M. hyo.

Fig.1

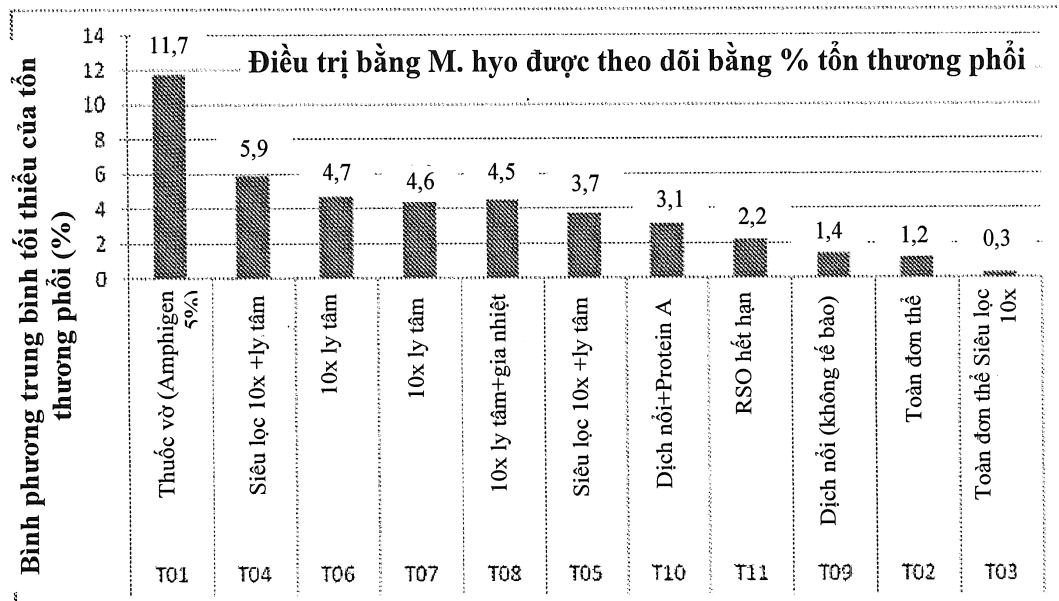


Fig.2

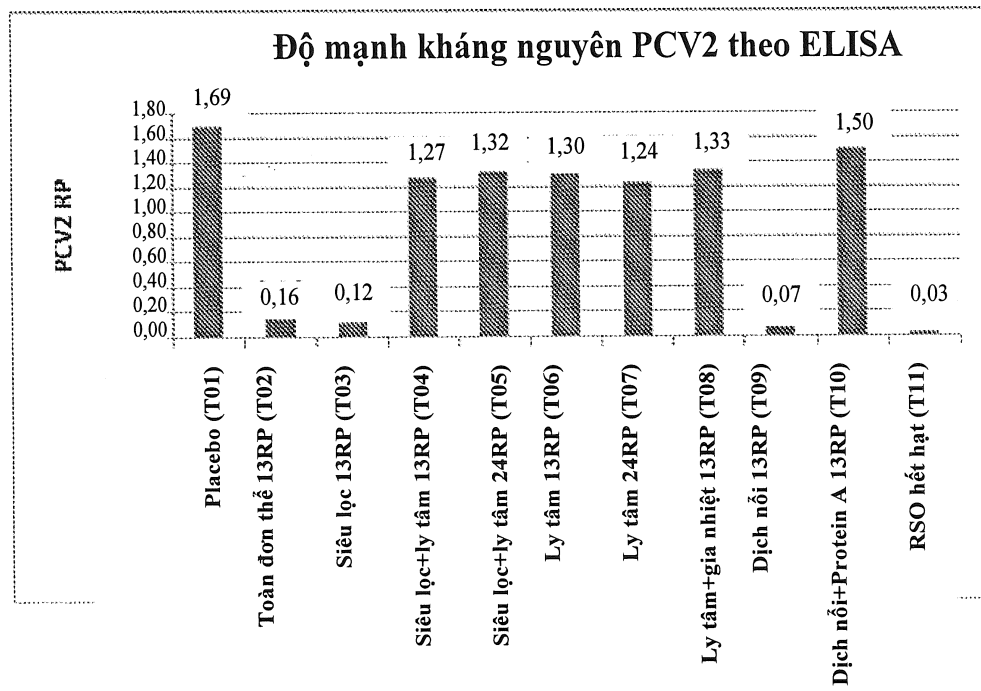


Fig.3

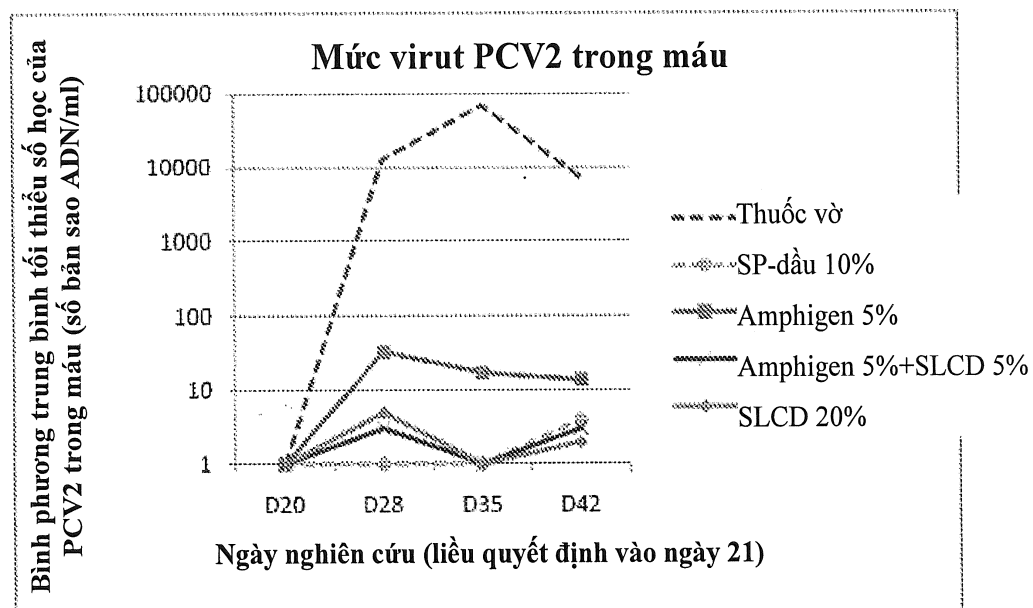


Fig.4

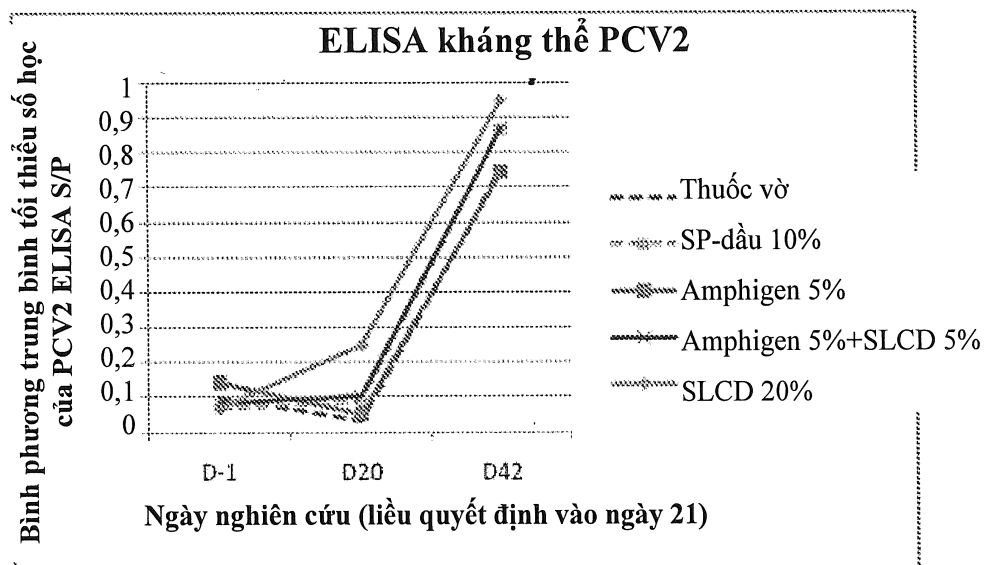


Fig.5

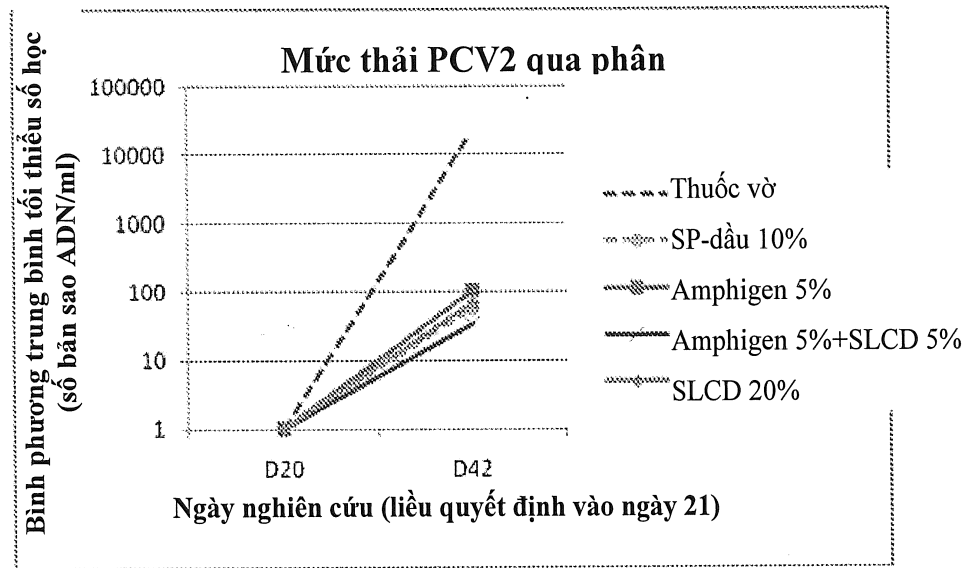


Fig.6

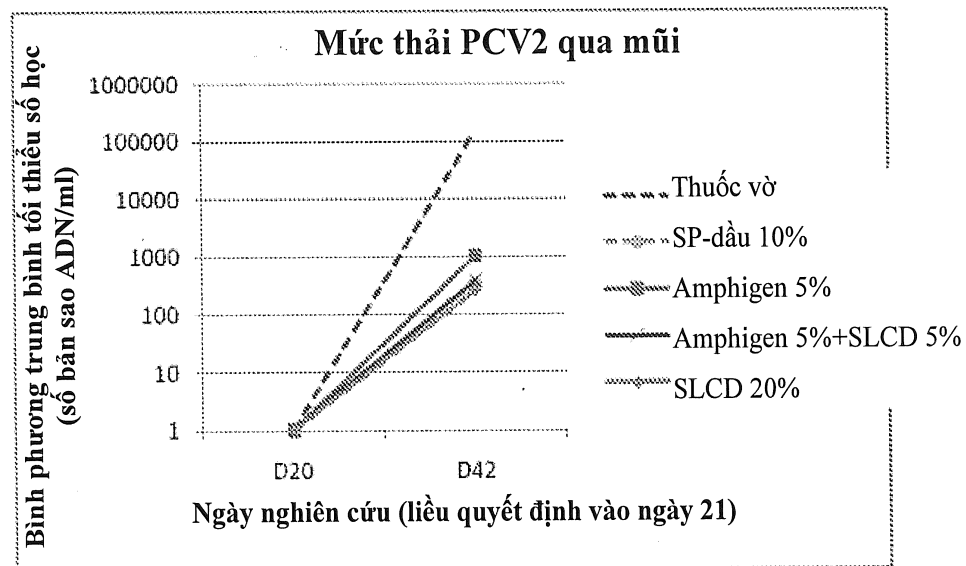


Fig.7A

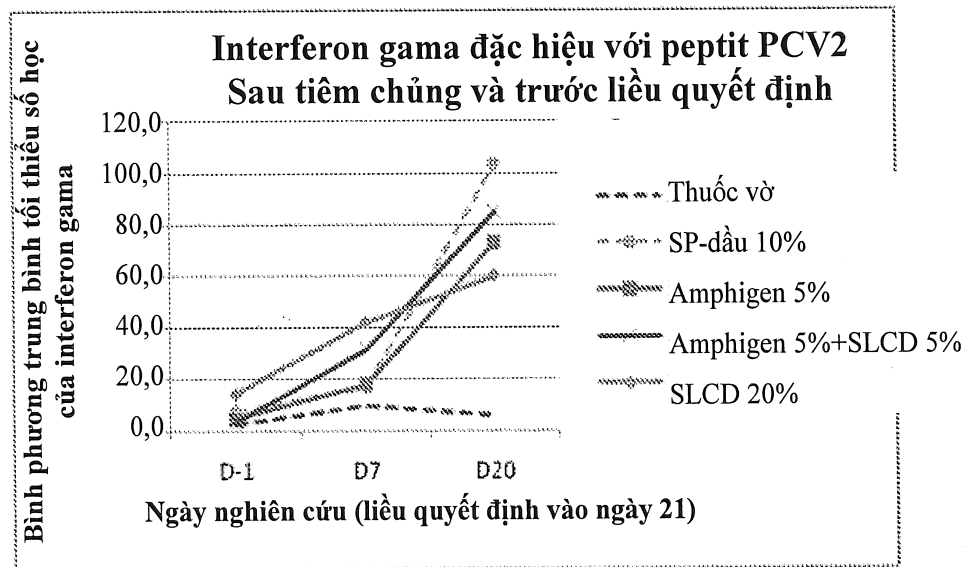


Fig.7B

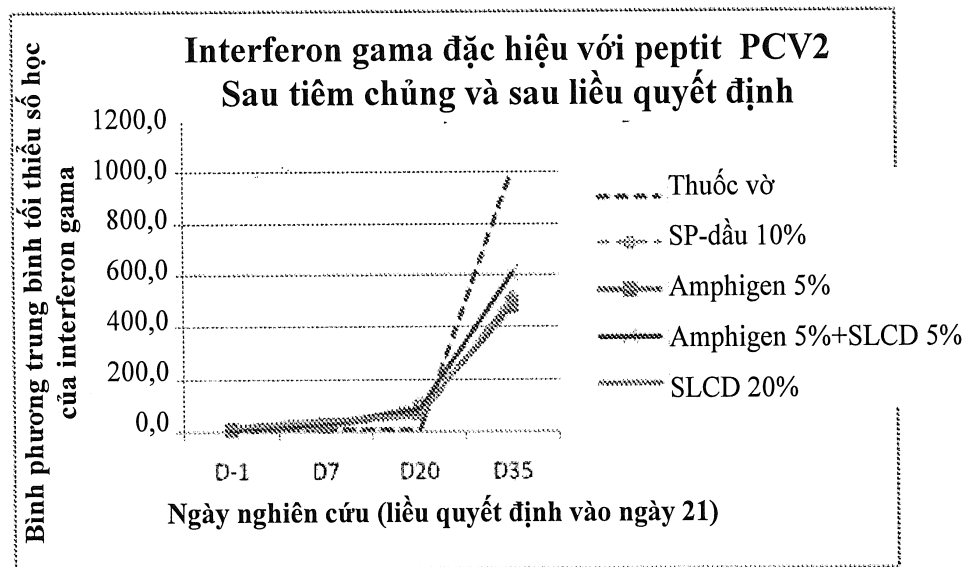


Fig.8A

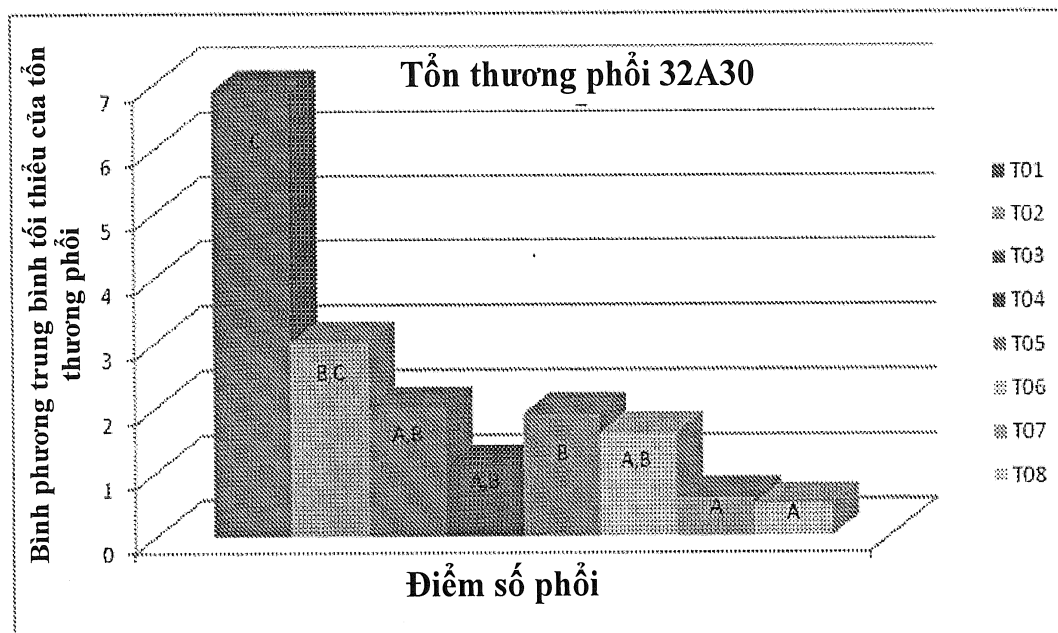


Fig.8B

Trái ngược	Tỷ lệ giảm nhẹ	Khoảng tin cậy 95%
T01 so với T02	41,2	-5,9 đến 76,5
T01 so với T03	64,7	29,4 đến 100
T01 so với T04	76,5	41,2 đến 100
T01 so với T05	73,3	33,3 đến 100
T01 so với T06	62,5	25 đến 100
T01 so với T07	87,5	62,5 đến 100
T01 so với T08	88,2	64,7 đến 100

Fig.9

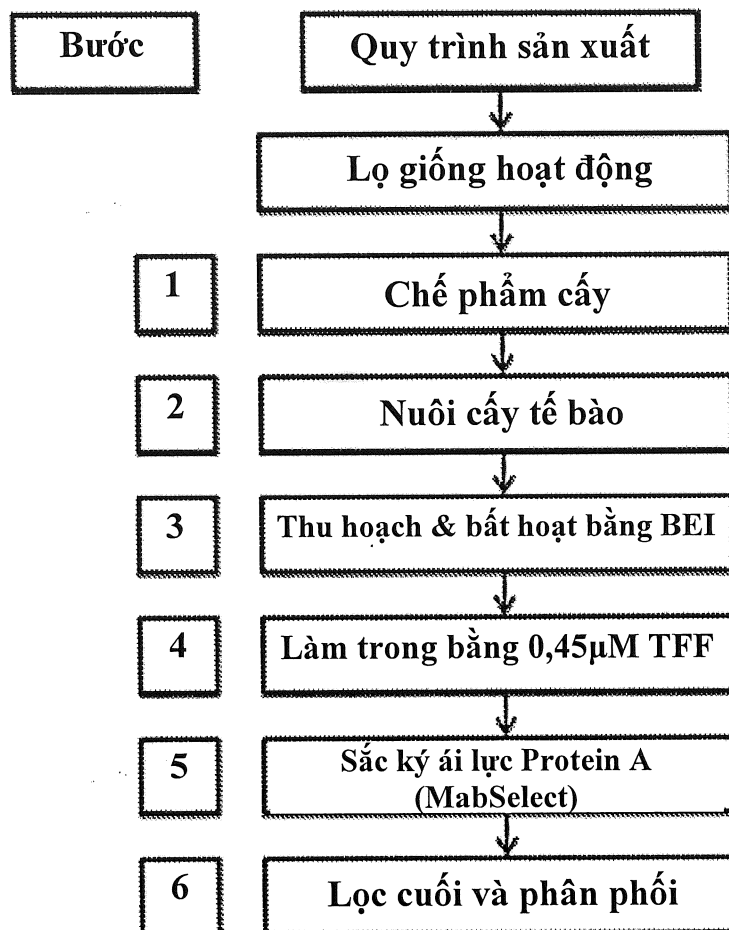


Fig.10

Hoạt tính diệt virus sơ bộ	Khác biệt so với nước			
	Tái hydrat hóa 100%	90/10	90/10	Hoạt tính diệt virus trung bình
	Hiệu giá đông khô	Lỏng (DMEM) 90/10	Lỏng (Ultra) 90/10	
SLCD 20%	0,8	0,7	2,0	1,3
Carbopol 0,2%	0,3	-0,3	0,2	-0,1
SP-dầu 10%	0,2	0,0	0,0	0,0
SP-dầu 10%/Carbopol 0,2%	0,3	-0,2	0,0	-0,1
SLCD 20%/SP-dầu 10%	1,0	0,3	0,7	0,5
SLCD 20%/SP-dầu 10%/Carbopol 0,2%	0,2	0,0	0,5	0,3
Amphigen 5% (từ dung dịch gốc 40%)	1,0	0,7	1,5	1,1
Amphigen 2,5% (từ dung dịch gốc 40%)	NA	-0,2	NA	-0,2
Amphigen 5% (từ dung dịch gốc 20%)	NA	0,8	NA	0,8
Amphigen 2,5% (từ dung dịch gốc 20%)	NA	0,2	NA	0,2
Amphigen 5% (từ dung dịch gốc 40%)	NA	1,3	NA	1,3
Amphigen 2,5% (từ dung dịch gốc 40%)	NA	0,8	NA	0,8
	Chỉ ra hoạt tính diệt virus tiềm tàng			

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Pfizer Inc.
Galvin, Jeffrey
Nitzel, Gregory
Garrett, Keith
Kulawik II, James
Ricker, Tracy
Smutzer, Megan

<120> CHẾ PHẨM GÂY MIỄN DỊCH CHỨA PHẦN HÒA TAN CỦA CHẾ PHẨM TOÀN TẾ BÀO MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE VÀ PHƯƠNG PHÁP BẢO CHẾ CHẾ PHẨM NÀY

<130> PC71911A

<150> US 61/620,165

<151> 2012-04-04

<160> 18

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 1260

<212> ADN

<213> Mycoplasma hyopneumoniae

<400> 1

```

atgaaaaaaa tgcttagaaa aaaattccttg tattcatcag ctatttatgc aacttcgctt      60
gcatcaatta ttgcatttgt tgcagcagggt tgtggacaga cagaatcagg ttcgacttct      120
gattctaaac cacaagccga gacgctaaaa cataaagtaa gtaatgattc tattcgaata      180
gcactaaccg atccggataa tcctcgatga attagtgtctc aaaaagatat tatttcttat      240
gttgatgaaa cagaggcagc aacttcaaca attacaaaaa accaggatgc acagaataac      300
tgactcactc agcaagctaa ttttaagcca gcacaaaaag gatttattat tgcccctgaa      360
aatggaagtg gagttggaac tgctgttaat acaattgctg ataaaggaat tccgattgtt      420
gcctatgatc gactaattac tggatctgat aaatatgatt ggtatgtttc ttttgataat      480
gaaaaagttg gcgaattaca aggtctttca cttgcagcgg gtctattagg aaaagaagat      540
ggtgcttttg attcaattga tcaaatgaat gaatatctaa aatcacatat gccccagag      600
acaatttctt tttatacaat cgcggggttc caagatgata ataactccca atatttttat      660
aatggtgcaa tgaaagtact taaagaatta atgaaaaatt cgggaaataa gataattgat      720
ttatctcctg aaggcgaaaa tgctgtttat gtcccaggat gaaattatgg aactgccggt      780
caaagaatcc aatcttttct aacaattaac aaagatccag caggtggtta taaaatcaaa      840
gctgttggtt caaaaccagc ttctattttc aaaggatttc ttgccccaaa tgatggaatg      900
gccgarcaag caatcaccaa attaaaactt gaaggatttg atacccaaaa aatctttgta      960
actggtcaag attataatga taaagccaaa acttttatca aagacggcga tcaaaatatg     1020
acaatttata aacctgataa agtttttagga aaagttgctg ttgaagttct tcgggtttta     1080
attgcaaaga aaaataaagc atccagatca gaagtcgaaa acgaactaaa agcaaaaacta     1140

```

ccaaatattt catttaaata tgataatcaa acatataaag tgcaaggtaa aaatattaat 1200
 acaatttttag taagtccagt aattgttaca aaagctaag ttgataatcc tgatgcctaa 1260

<210> 2
 <211> 419
 <212> PRT
 <213> Mycoplasma hyopneumoniae

<400> 2

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

Ala Thr Ser Leu Ala Ser Ile Ile Ala Phe Val Ala Ala Gly Cys Gly
 20 25 30

Gln Thr Glu Ser Gly Ser Thr Ser Asp Ser Lys Pro Gln Ala Glu Thr
 35 40 45

Leu Lys His Lys Val Ser Asn Asp Ser Ile Arg Ile Ala Leu Thr Asp
 50 55 60

Pro Asp Asn Pro Arg Trp Ile Ser Ala Gln Lys Asp Ile Ile Ser Tyr
 65 70 75 80

Val Asp Glu Thr Glu Ala Ala Thr Ser Thr Ile Thr Lys Asn Gln Asp
 85 90 95

Ala Gln Asn Asn Trp Leu Thr Gln Gln Ala Asn Leu Ser Pro Ala Pro
 100 105 110

Lys Gly Phe Ile Ile Ala Pro Glu Asn Gly Ser Gly Val Gly Thr Ala
 115 120 125

Val Asn Thr Ile Ala Asp Lys Gly Ile Pro Ile Val Ala Tyr Asp Arg
 130 135 140

Leu Ile Thr Gly Ser Asp Lys Tyr Asp Trp Tyr Val Ser Phe Asp Asn
 145 150 155 160

Glu Lys Val Gly Glu Leu Gln Gly Leu Ser Leu Ala Ala Gly Leu Leu
 165 170 175

Gly Lys Glu Asp Gly Ala Phe Asp Ser Ile Asp Gln Met Asn Glu Tyr
 180 185 190

Leu Lys Ser His Met Pro Gln Glu Thr Ile Ser Phe Tyr Thr Ile Ala
 195 200 205

Gly Ser Gln Asp Asp Asn Asn Ser Gln Tyr Phe Tyr Asn Gly Ala Met
 210 215 220

Lys Val Leu Lys Glu Leu Met Lys Asn Ser Gly Asn Lys Ile Ile Asp
225 230 235 240

Leu Ser Pro Glu Gly Glu Asn Ala Val Tyr Val Pro Gly Trp Asn Tyr
245 250 255

Gly Thr Ala Gly Gln Arg Ile Gln Ser Phe Leu Thr Ile Asn Lys Asp
260 265 270

Pro Ala Gly Gly Asn Lys Ile Lys Ala Val Gly Ser Lys Pro Ala Ser
275 280 285

Ile Phe Lys Gly Phe Leu Ala Pro Asn Asp Gly Met Ala Glu Gln Ala
290 295 300

Ile Thr Lys Leu Lys Leu Glu Gly Phe Asp Thr Gln Lys Ile Phe Val
305 310 315 320

Thr Gly Gln Asp Tyr Asn Asp Lys Ala Lys Thr Phe Ile Lys Asp Gly
325 330 335

Asp Gln Asn Met Thr Ile Tyr Lys Pro Asp Lys Val Leu Gly Lys Val
340 345 350

Ala Val Glu Val Leu Arg Val Leu Ile Ala Lys Lys Asn Lys Ala Ser
355 360 365

Arg Ser Glu Val Glu Asn Glu Leu Lys Ala Lys Leu Pro Asn Ile Ser
370 375 380

Phe Lys Tyr Asp Asn Gln Thr Tyr Lys Val Gln Gly Lys Asn Ile Asn
385 390 395 400

Thr Ile Leu Val Ser Pro Val Ile Val Thr Lys Ala Asn Val Asp Asn
405 410 415

Pro Asp Ala

<210> 3
<211> 3324
<212> ADN
<213> Mycoplasma hyopneumoniae

<400> 3
atgagtaaaa aatcaaaaac atttaaaatt ggtttgactg ccggaattgt tggctcttga 60
gtttttggtc taactgtcgg acttagcagc ttggcaaaat acagatcaga aagtccacga 120
aagattgcaa atgattttgc cgaaaagtt tcaacattag ctttagtcc ttatgctttt 180
gagactgatt ctgattataa aatagtcaaa aggtgactag ttgattctaa taacaatatt 240

agaaataaag	aaaaagttat	tgattccttt	tcctttttta	ctaaaaacgg	tgatcagtta	300
gaaaaaatta	attttcaaga	tcctgaatat	accaaggcga	agataacttt	tgagattcctt	360
gaaattatcc	ctgatgatgt	caatcaaaat	tttaaggtaa	aatttcaggc	attacaaaaa	420
cttcataatg	gtgatattgc	caaatctgat	atttatgagc	aaacagttgc	ttttgccaaa	480
cagtcaaadc	ttttagttgc	cgaatttaat	ttttcgctta	aaaaaattac	cgaaaaatta	540
aatcaacaaa	ttgaaaattt	atcaacaaaa	attacaaatt	ttgctgatga	aaaaacaagc	600
agccaaaaag	atccctcaac	tctaagagct	attgacttcc	aatacgattt	aaatacagcg	660
cgaaatcctg	aggatttaga	tataaagctt	gctaattatt	ttccagtact	taaaaattta	720
ataaacagac	taaataatgc	tcctgagaat	aaattaccta	ataatttggg	taatattttt	780
gaatttagct	ttgcaaaaga	tagttcaact	aatcaatatg	taagtatcca	gaaccaaatt	840
ccttcgctgt	ttttaaaagc	agatcttagt	caaagtgcc	gtgaaatttt	agctagccca	900
gatgaagttc	agccagttat	taacatttta	agattaatga	aaaaagataa	ttcttcttat	960
tttctaaatt	ttgaggattt	tgtaataat	ttaacactga	aaaatatgca	aaaagaagat	1020
ttaaatgcaa	agggtcaaaa	tctttctgcc	tatgaatttc	tagcagatat	taaatctgga	1080
tttttcctg	gagacaagag	atccagtcac	accaaggcag	aaattagtaa	tcttttaaat	1140
aaaaaagaaa	atatttatga	ctttggtaaa	tacaatggaa	aattcaacga	ccgtcttaac	1200
tcgccaaatt	tagaatatag	cctagatgca	gcaagcgcaa	gtcttgataa	aaaagataaa	1260
tcaatagttt	taattcccta	ccgccttgaa	attaaagata	aattttttgc	cgatgattta	1320
tatccagata	caaaagataa	tattctcgta	aaagaaggga	ttcttaaatt	aactggattt	1380
aaaaaaggct	caaaaattga	tctccctaac	atcaatcagc	aaatttttaa	aaccgaatat	1440
ttaccatttt	ttgaaaaagg	taaagaagaa	caagcaaaat	tagactatgg	taatattcta	1500
aatccatata	atactcaact	tgccaaagtt	gaagttgaag	ctctttttta	aggggaataaa	1560
aaccaagaaa	tctatcaagc	acttgatgga	aattatgcct	atgaattcgg	ggccttttaa	1620
tccgtgctta	attcctgaac	aggaaaaatt	cagcatcctg	aaaaagctga	tatccaaaga	1680
tttacaagac	atttagaaca	agttaaaatt	ggttctaatt	cagtttttaa	tcaaccacaa	1740
acaacaaaag	aacaagtaac	ttcaagtctt	aaaagtaata	acttttttaa	aaatggacac	1800
caagttgcaa	gttattttcca	ggatttactc	accaaggaca	aattaacaac	tttagagact	1860
ctttatgatc	tagcaaaaaa	atggggacta	gaaactaaca	gagcacaatt	cccaaaaggg	1920
gttttccaat	atacaaaaga	tatttttgca	gaagcagata	aattaaaatt	tttggaattg	1980
aagaaaaagg	atcctttaca	tcagataaaa	gaaattcacc	aactttcctt	taatatttta	2040
gcccgtaacg	atgtaataaa	atctgatgga	ttttacggag	ttttattatt	gccccaaagt	2100
gtaaaaactg	aattagaagg	caaaaatgag	gcgcaaat	ttgaagcgct	taaaaagtac	2160
tctttaattg	agaactcggc	ttttaaaact	actatttttag	ataaaaaatt	acttgaaggg	2220
actgatttta	aaaccttcgg	tgatttttta	aaagcatttt	tccttaaagc	agcccaattt	2280

```

aataatTTTtg cTccttgagc aaaatttagac gataatcttc agtattcatt tgaagctatc 2340
aaaaaagggg aaactacaaa agaaggtaaa agagaagaag tagataaaaa agttaaggaa 2400
ttggataata aaataaaagg tatattgcct cagccccag cagcaaaacc agaagcagca 2460
aaaccagtag cggctaaacc agaaacaaca aaaccagtag cagctaaacc tgaagcagct 2520
aaacctgaag cagcaaaacc agtagcggct aaaccagaag cagcaaaacc agtagcggct 2580
aaaccagaag cagcaaaacc agtagcggct aaaccagaag cagcaaaacc agtagcggct 2640
aaaccagaag cagcaaaacc agttgtact aatactggct ttctacttac aaataaacca 2700
aaagaagact atttccaat ggcttttagt tataaattag aatatactga cgaaaataaa 2760
ttaagcctaa aaacaccgga aattaatgta tttttagaac tagttcatca aagcgagtat 2820
gaagaacaag aaataataaa ggaactagat aaaactgttt taaatcttca atatcaattc 2880
caggaagtca aggtaactag tgaccaatat cagaaactta gccacccaat gatgaccgaa 2940
ggatcttcaa atcaaggtaa aaaaagcgaa ggaactccta accaaggtaa aaaagcagaa 3000
ggcgcgccta accaaggtaa aaaaagcgaa ggaactccta accaaggtaa aaaagcagaa 3060
ggagcaccta gtcaacaaag cccaactacc gaattaacta attaccttcc tgacttaggt 3120
aaaaaaattg acgaaatcat taaaaaaca ggtaaaaatt gaaaaacaga ggttgaacta 3180
atcgaggata atatcgctgg agatgctaaa ttgtatact ttatcctaag ggatgattca 3240
aatccggtg atcctaaaaa atcaagtcta aaagttaaaa taacagtaaa acaaagtaat 3300
aataatcagg aaccagaatc taaa 3324

```

<210> 4
 <211> 1108
 <212> PRT
 <213> Mycoplasma hyopneumoniae

<400> 4

Met Ser Lys Lys Ser Lys Thr Phe Lys Ile Gly Leu Thr Ala Gly Ile
 1 5 10 15

Val Gly Leu Gly Val Phe Gly Leu Thr Val Gly Leu Ser Ser Leu Ala
 20 25 30

Lys Tyr Arg Ser Glu Ser Pro Arg Lys Ile Ala Asn Asp Phe Ala Ala
 35 40 45

Lys Val Ser Thr Leu Ala Phe Ser Pro Tyr Ala Phe Glu Thr Asp Ser
 50 55 60

Asp Tyr Lys Ile Val Lys Arg Trp Leu Val Asp Ser Asn Asn Asn Ile
 65 70 75 80

Arg Asn Lys Glu Lys Val Ile Asp Ser Phe Ser Phe Phe Thr Lys Asn
 85 90 95

Gly Asp Gln Leu Glu Lys Ile Asn Phe Gln Asp Pro Glu Tyr Thr Lys
 100 105 110
 Ala Lys Ile Thr Phe Glu Ile Leu Glu Ile Ile Pro Asp Asp Val Asn
 115 120 125
 Gln Asn Phe Lys Val Lys Phe Gln Ala Leu Gln Lys Leu His Asn Gly
 130 135 140
 Asp Ile Ala Lys Ser Asp Ile Tyr Glu Gln Thr Val Ala Phe Ala Lys
 145 150 155 160
 Gln Ser Asn Leu Leu Val Ala Glu Phe Asn Phe Ser Leu Lys Lys Ile
 165 170 175
 Thr Glu Lys Leu Asn Gln Gln Ile Glu Asn Leu Ser Thr Lys Ile Thr
 180 185 190
 Asn Phe Ala Asp Glu Lys Thr Ser Ser Gln Lys Asp Pro Ser Thr Leu
 195 200 205
 Arg Ala Ile Asp Phe Gln Tyr Asp Leu Asn Thr Ala Arg Asn Pro Glu
 210 215 220
 Asp Leu Asp Ile Lys Leu Ala Asn Tyr Phe Pro Val Leu Lys Asn Leu
 225 230 235 240
 Ile Asn Arg Leu Asn Asn Ala Pro Glu Asn Lys Leu Pro Asn Asn Leu
 245 250 255
 Gly Asn Ile Phe Glu Phe Ser Phe Ala Lys Asp Ser Ser Thr Asn Gln
 260 265 270
 Tyr Val Ser Ile Gln Asn Gln Ile Pro Ser Leu Phe Leu Lys Ala Asp
 275 280 285
 Leu Ser Gln Ser Ala Arg Glu Ile Leu Ala Ser Pro Asp Glu Val Gln
 290 295 300
 Pro Val Ile Asn Ile Leu Arg Leu Met Lys Lys Asp Asn Ser Ser Tyr
 305 310 315 320
 Phe Leu Asn Phe Glu Asp Phe Val Asn Asn Leu Thr Leu Lys Asn Met
 325 330 335
 Gln Lys Glu Asp Leu Asn Ala Lys Gly Gln Asn Leu Ser Ala Tyr Glu
 340 345 350
 Phe Leu Ala Asp Ile Lys Ser Gly Phe Phe Pro Gly Asp Lys Arg Ser

355		360		365											
Ser	His	Thr	Lys	Ala	Glu	Ile	Ser	Asn	Leu	Leu	Asn	Lys	Lys	Glu	Asn
	370					375					380				
Ile	Tyr	Asp	Phe	Gly	Lys	Tyr	Asn	Gly	Lys	Phe	Asn	Asp	Arg	Leu	Asn
385					390					395					400
Ser	Pro	Asn	Leu	Glu	Tyr	Ser	Leu	Asp	Ala	Ala	Ser	Ala	Ser	Leu	Asp
				405					410					415	
Lys	Lys	Asp	Lys	Ser	Ile	Val	Leu	Ile	Pro	Tyr	Arg	Leu	Glu	Ile	Lys
			420					425					430		
Asp	Lys	Phe	Phe	Ala	Asp	Asp	Leu	Tyr	Pro	Asp	Thr	Lys	Asp	Asn	Ile
		435					440					445			
Leu	Val	Lys	Glu	Gly	Ile	Leu	Lys	Leu	Thr	Gly	Phe	Lys	Lys	Gly	Ser
	450					455					460				
Lys	Ile	Asp	Leu	Pro	Asn	Ile	Asn	Gln	Gln	Ile	Phe	Lys	Thr	Glu	Tyr
465					470					475					480
Leu	Pro	Phe	Phe	Glu	Lys	Gly	Lys	Glu	Glu	Gln	Ala	Lys	Leu	Asp	Tyr
				485					490					495	
Gly	Asn	Ile	Leu	Asn	Pro	Tyr	Asn	Thr	Gln	Leu	Ala	Lys	Val	Glu	Val
			500					505					510		
Glu	Ala	Leu	Phe	Lys	Gly	Asn	Lys	Asn	Gln	Glu	Ile	Tyr	Gln	Ala	Leu
		515					520					525			
Asp	Gly	Asn	Tyr	Ala	Tyr	Glu	Phe	Gly	Ala	Phe	Lys	Ser	Val	Leu	Asn
	530					535					540				
Ser	Trp	Thr	Gly	Lys	Ile	Gln	His	Pro	Glu	Lys	Ala	Asp	Ile	Gln	Arg
545					550					555					560
Phe	Thr	Arg	His	Leu	Glu	Gln	Val	Lys	Ile	Gly	Ser	Asn	Ser	Val	Leu
				565					570					575	
Asn	Gln	Pro	Gln	Thr	Thr	Lys	Glu	Gln	Val	Ile	Ser	Ser	Leu	Lys	Ser
			580					585					590		
Asn	Asn	Phe	Phe	Lys	Asn	Gly	His	Gln	Val	Ala	Ser	Tyr	Phe	Gln	Asp
		595					600					605			
Leu	Leu	Thr	Lys	Asp	Lys	Leu	Thr	Ile	Leu	Glu	Thr	Leu	Tyr	Asp	Leu
	610					615					620				

Ala Lys Lys Trp Gly Leu Glu Thr Asn Arg Ala Gln Phe Pro Lys Gly
 625 630 635 640
 Val Phe Gln Tyr Thr Lys Asp Ile Phe Ala Glu Ala Asp Lys Leu Lys
 645 650 655
 Phe Leu Glu Leu Lys Lys Lys Asp Pro Tyr Asn Gln Ile Lys Glu Ile
 660 665 670
 His Gln Leu Ser Phe Asn Ile Leu Ala Arg Asn Asp Val Ile Lys Ser
 675 680 685
 Asp Gly Phe Tyr Gly Val Leu Leu Leu Pro Gln Ser Val Lys Thr Glu
 690 695 700
 Leu Glu Gly Lys Asn Glu Ala Gln Ile Phe Glu Ala Leu Lys Lys Tyr
 705 710 715 720
 Ser Leu Ile Glu Asn Ser Ala Phe Lys Thr Thr Ile Leu Asp Lys Asn
 725 730 735
 Leu Leu Glu Gly Thr Asp Phe Lys Thr Phe Gly Asp Phe Leu Lys Ala
 740 745 750
 Phe Phe Leu Lys Ala Ala Gln Phe Asn Asn Phe Ala Pro Trp Ala Lys
 755 760 765
 Leu Asp Asp Asn Leu Gln Tyr Ser Phe Glu Ala Ile Lys Lys Gly Glu
 770 775 780
 Thr Thr Lys Glu Gly Lys Arg Glu Glu Val Asp Lys Lys Val Lys Glu
 785 790 795 800
 Leu Asp Asn Lys Ile Lys Gly Ile Leu Pro Gln Pro Pro Ala Ala Lys
 805 810 815
 Pro Glu Ala Ala Lys Pro Val Ala Ala Lys Pro Glu Thr Thr Lys Pro
 820 825 830
 Val Ala Ala Lys Pro Glu Ala Ala Lys Pro Glu Ala Ala Lys Pro Val
 835 840 845
 Ala Ala Lys Pro Glu Ala Ala Lys Pro Val Ala Ala Lys Pro Glu Ala
 850 855 860
 Ala Lys Pro Val Ala Ala Lys Pro Glu Ala Ala Lys Pro Val Ala Ala
 865 870 875 880
 Lys Pro Glu Ala Ala Lys Pro Val Ala Thr Asn Thr Gly Phe Ser Leu
 885 890 895

Thr Asn Lys Pro Lys Glu Asp Tyr Phe Pro Met Ala Phe Ser Tyr Lys
 900 905 910
 Leu Glu Tyr Thr Asp Glu Asn Lys Leu Ser Leu Lys Thr Pro Glu Ile
 915 920 925
 Asn Val Phe Leu Glu Leu Val His Gln Ser Glu Tyr Glu Glu Gln Glu
 930 935 940
 Ile Ile Lys Glu Leu Asp Lys Thr Val Leu Asn Leu Gln Tyr Gln Phe
 945 950 955 960
 Gln Glu Val Lys Val Thr Ser Asp Gln Tyr Gln Lys Leu Ser His Pro
 965 970 975
 Met Met Thr Glu Gly Ser Ser Asn Gln Gly Lys Lys Ser Glu Gly Thr
 980 985 990
 Pro Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala Pro Asn Gln Gly Lys Lys
 995 1000 1005
 Ala Glu Gly Thr Pro Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala Pro
 1010 1015 1020
 Ser Gln Gln Ser Pro Thr Thr Glu Leu Thr Asn Tyr Leu Pro Asp
 1025 1030 1035
 Leu Gly Lys Lys Ile Asp Glu Ile Ile Lys Lys Gln Gly Lys Asn
 1040 1045 1050
 Trp Lys Thr Glu Val Glu Leu Ile Glu Asp Asn Ile Ala Gly Asp
 1055 1060 1065
 Ala Lys Leu Leu Tyr Phe Ile Leu Arg Asp Asp Ser Lys Ser Gly
 1070 1075 1080
 Asp Pro Lys Lys Ser Ser Leu Lys Val Lys Ile Thr Val Lys Gln
 1085 1090 1095
 Ser Asn Asn Asn Gln Glu Pro Glu Ser Lys
 1100 1105

<210> 5
 <211> 1773
 <212> ADN
 <213> Circovirus lon

<400> 5
 ggtacctccg tggattgttc tccagcagtc ttccaaaatt gcaaagtagt aatcctccga 60
 tagagagctt ctacagctgg gacagcagtt gaggagtacc attcctgggg ggcctgattg 120

```

ctggtaatca aaatactgcg ggccaaaaaa ggaacagtac cccctttagt ctctacagtc 180
aatggatacc ggtcacacag tctcagtaga tcatcccaag gtaaccagcc ataaaaatca 240
tccaaaacaa caacttcttc tccatgatat ccatcccacc acttatttct actaggcttc 300
cagtaggtgt ccctaggctc agcaaaatta cgggcccact ggctcttccc acaaccgggc 360
gggcccacta tgacgtgtac agctgtcttc caatcacgct gctgcatctt cccgctcact 420
ttcaaaagtt cagccagccc gcggaaatct ctcacatacg ttacaggaaa ctgctcggct 480
acagtcacca aagaccccggt ctccaaaagg gtactcacag cagtagacag gtcgctgcgc 540
ttcccctggt tccgcggagc tccacactcg ataagtatgt ggccttcttt actgcagtat 600
tctttattct gctggtcggg tcctttcgct ttctcgatgt ggcagcgggc accaaaatac 660
cacttcacct tgtaaaaagt ctgcttctta gcaaaattcg caaaccctg gaggtgagga 720
gttctaccct cttccaaacc ttctcgcga caaacaatat aatcaaaaag ggagattgga 780
agctcccgtg ttttggtttt ctctcctcg gaaggattat taagggtgaa caccacctc 840
ttatgggggt gcgggccgct tttcttgctt ggcattttca ctgacgctgc cgagggtgctg 900
ccgctgccga agtgcgctgg taatactaca gcagcgact tctttcactt ttataggatg 960
acgtatccaa ggaggcggtt ccgcagaaga agacaccgcc cccgcagcca tcttggccag 1020
atcctccgcc gccgcccctg gctcgtccac ccccgccacc gctaccgttg gagaaggaaa 1080
aatggcatct tcaacacccg cctctccgc accttcggat atactgtcaa ggctaccaca 1140
gtcagaacgc cctcctgggc ggtggacatg atgagattta atattgacga ctttgttccc 1200
ccgggagggg ggaccaacaa aatctctata cccttgaat actacagaat aagaaagggt 1260
aaggttgaat tctggccctg ctccccatc acccagggtg ataggggagt gggctccact 1320
gctgttattc tagatgataa ctttgtaaca aaggccacag ccctaacctg tgaccatat 1380
gtaaactact cctcccgcca tacaatcccc caacccttct cctaccactc ccgttacttc 1440
acacccaaac ctgttcttga ctccaccatt gattacttcc aaccaaataa caaaaggat 1500
cagctttgga tgaggctaca aacctctaga aatgtggacc acgtaggcct cggcactgcg 1560
ttcgaaaaca gtatatacga ccaggactac aatatccgtg taaccatgta tgtacaattc 1620
agagaattta atcttaaga cccccactt aaaccctaaa tgaataaaaa taaaaaccat 1680
tacgatgtga taacaaaaaa gactcagtaa tttattttat atgggaaaag ggcacagggt 1740
gggtccactg cttcaaactg gccttcgggt acc 1773

```

<210> 6
<211> 702
<212> ADN
<213> Circovirut lön

```

<400> 6
atgacgtatc caaggaggcg ttaccgcaga agaagacacc gccccgcag ccatcttggc 60
cagatcctcc gccgcccgcc ctggctcgtc cccccgcc accgctaccg ttggagaagg 120

```

```

aaaaatggca tcttcaacac cgcctctcc cgcaccttcg gatatactgt caaggctacc 180
acagtcagaa cgccctcctg ggcggtggac atgatgagat ttaatatga cgactttgtt 240
cccccgagg gggggaccaa caaatctct ataccctttg aatactacag aataagaaag 300
gttaagggtg aattctggcc ctgctcccc atcaccagg gtgataggg agtgggctcc 360
actgctgtta ttctagatga taactttgta acaaaggcca cagccctaac ctatgacca 420
tatgtaaact actcctcccg ccatacaatc cccaaccct tctcctacca ctcccgttac 480
ttcacacca aacctgttct tgactccacc attgattact tccaacaaa taacaaaagg 540
aatcagcttt ggatgaggct acaaacctct agaaatgtgg accacgtagg cctcggcact 600
gcgttcgaaa acagtatata cgaccaggac tacaatatcc gtgtaaccat gtatgtacaa 660
ttcagagaat ttaatcttaa agacccccca cttaaaccct aa 702

```

<210> 7
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> Circovirus lon

<400> 7

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Lys Pro
 225 230

<210> 8
 <211> 1767
 <212> ADN
 <213> Circovirus lon

<400> 8
 ggtacctccg tggattgttc tccagcagtc ttccaaaatt gcaaagtagt aatcctccga 60
 tagagagctt ctacagctgg gacagcagtt gaggagtacc attcctgggg ggcctgattg 120
 ctggtaatca aaatactgcg ggccaaaaaa ggaacagtac cccctttagt ctctacagtc 180
 aatggatacc ggtcacacag tctcagtaga tcatcccaag gtaaccagcc ataaaaatca 240
 tccaaaacaa caactttctt tccatgatat ccatcccacc acttatttct actaggcttc 300
 cagtaggtgt cgctaggctc agcaaaaatta cgggcccact ggctcttccc acaaccgggc 360
 gggcccacta tgacgtgtac agctgtcttc caatcacgct gctgcatctt cccgctcact 420
 ttcaaaagtt cagccagccc gcggaaattt ctacatacgt ttacagggaa ctgctcggct 480
 acagtcacca aagaccccggt ctccaaaagg gtactcacag cagtagacag gtcgctgcgc 540
 ttcccctggt tccgcggagc tccacactcg ataagtatgt ggccttcttt actgcagtat 600
 tctttattct gctggtcgggt tcctttcgtt ttctcgatgt ggcagcgggc accaaaatac 660
 cacttcacct tgttaaaagt ctgcttctta gcaaaattcg caaaccctg gaggtgagga 720
 gttctaccct cttccaaacc ttcctctccg caaacaaaat aatcaaaaag ggagattgga 780
 agctcccgtt ttttgTTTTT ctctcctcgt gaaggattat taagggtgaa caccacctc 840
 ttatgggggt gcgggccgct tttcctgctt ggcattttca ctgacgctgc cgaggtgctg 900
 ccgctgccga agtgcgctgg taatactaca gcagcgact tctttcactt ttataggatg 960
 acgtatccaa ggaggcggtta ccgcagaaga agacaccgcc cccgcagcca tcttggccag 1020
 atcctccgcc gccgcccctg gctcgtccac ccccgccacc gctaccgttg gagaaggaaa 1080
 aatggcatct tcaacacccg cctctcccgc accttcggat atactgtcaa ggctaccaca 1140
 gtcagaacgc cctcctgggc ggtggacatg atgagattta atattgacga ctttgttccc 1200

ccgggagggg ggaccaacaa aatctctata ccccttgaat actacagaat aagaaagggt 1260
aagggtgaat tctggccctg ctcccccatc acccaggggtg ataggggagt gggctccact 1320
gctgttattc tagatgataa ctttgtaaca aaggccacag ccctaacctg tgacccatat 1380
gtaaaactact cctcccgcca tacaatcgcc caacccttct cctaccactc ccgttacttc 1440
acacccaaac ctgttcttga ctccaccatt gattacttcc aaccaaataa caaaaggaat 1500
cagcttttga tgagggtaca aacctctaga aatgtggacc acgtaggcct cggcactgcg 1560
ttcgaaaaca gtatatacga ccaggactac aatatccgtg taaccatgta tgtacaattc 1620
agagaattta atcttaaaga cccccactt aaaccctaaa tgaataaaaa taaaaacat 1680
tacgatgtga taacaaaaaa gactcagtaa tttattttat atgggaaaag ggcacaggg 1740
gggtccactg cttcaaatcg gccttcg 1767

<210> 9
<211> 702
<212> ADN
<213> Circovirut lợn

<400> 9
atgacgtatc caaggaggcg ttaccgcaga agaagacacc gccccgcag ccatcttggc 60
cagatcctcc gccgccgcc ctggctcgtc cccccgcc accgctaccg ttggagaagg 120
aaaaatggca tcttcaacac ccgcctctcc cgcaccttcg gatatactgt caaggctacc 180
acagtcagaa cgccctcctg ggcggtggac atgatgagat ttaatatgta cgactttggt 240
ccccggggag gggggaccaa caaatctct atacccttg aatactacag aataagaaag 300
gttaagggtg aattctggcc ctgctcccc atcaccagg gtgataggg agtgggctcc 360
actgctgtta ttctagatga taactttgta acaaggcca cagccctaac ctatgaccca 420
tatgtaaact actcctcccg ccatacaatc gcccaaccct tctcctacca ctcccgttac 480
ttcacacca aacctgttct tgactccacc attgattact tccaacaaa taacaaaagg 540
aatcagcttt ggatgaggct acaaacctct agaaatgtgg accacgtagg cctcggcact 600
gcgttcgaaa acagtatata cgaccaggac tacaatatcc gtgtaaccat gtatgtacaa 660
ttcagagaat ttaatcttaa agacccccca cttaaaccct aa 702

<210> 10
<211> 233
<212> PRT
<213> Circovirut lợn

<400> 10

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Lys Pro
225 230

<210> 11
<211> 233
<212> PRT
<213> Circovirut lơn

<400> 11

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Lys Pro
225 230

<210> 12

<211> 713

<212> ADN

<213> Circovirut lợn

<400> 12

cagctatgac gtatccaagg aggcgttacc gcagaagaag acaccgcccc cgcagccatc 60

ttggccagat cctccgccgc cgcccctggc tcgtccaccc ccgccaccgc taccgttgga 120

gaaggaaaaa tggcatcttc aacacccgcc tctccgcac cttcgatat actgtggaga 180

aggaaaaatg gcatcttcaa caccgcctc tccgcacct tcggatatac tgtgacgact 240

ttgttcccc gggagggggg accaacaaaa tctctatacc ctttgaatac tacagaataa 300

gaaagggttaa ggttgaattc tggccctgct ccccatcac ccagggtgat aggggagtg 360
 gctccactgc tgttattcta gatgataact ttgtaacaaa ggccacagcc ctaacctatg 420
 acccatatgt aaactactcc tcccgccata caatcccca acccttctcc taccactccc 480
 gttacttcac acccaaacct gttcttgact ccactattga ttacttccaa ccaaataaca 540
 aaaggaatca gctttggctg aggctacaaa cctctagaaa tgtggaccac gtaggcctcg 600
 gcactgcgtt cgaaaacagt aaatacgacc aggactacaa tatccgtgta accatgtatg 660
 tacaattcag agaatttaat cttaaagacc cccacttaa accctaaatg aat 713

<210> 13
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> Circovirut lợn

<400> 13

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Glu Pro
225 230

<210> 14
<211> 713
<212> ADN
<213> Circovirut lợn

<400> 14
ccgccatgac gtatccaagg aggcgttacc gcagaagaag acaccgcccc cgcagccatc 60
ttggccagat cctccgccgc cgcccctggc tcgtccaccc ccgccaccgc taccgttgga 120
gaaggaaaaa tggcatcttc aacacccgcc tctcccgcac cttcggatat actgtcaagg 180
ctaccacagt cacaacgccc tcctgggcgg tggacatgat gagatttaat attgacgact 240
ttgttcccc gggagggggg accaacaaaa tctctatacc ctttgaatac tacagaataa 300
gaaagggttaa ggttgaattc tggccctgct ccccatcac ccagggtgat aggggagtgg 360
gctccactgc tgttattcta gatgataact ttgtaacaaa ggccacagcc ctaacctatg 420
accatattgt aaactactcc tcccgccata caatccccca acccttctcc taccactccc 480
gttacttcac acccaaact gttcttgact ccactattga ttacttccaa ccaaataaca 540
aaaggaatca gctttggctg aggtacaaaa cctctagaaa tgtggaccac gtaggcctcg 600
gcactgcgtt cgaaaacagt aaatacgacc aggactacaa tatccgtgta accatgtatg 660
tacaattcag agaatttaat cttaaagacc cccacttga accctaagaa ttc 713

<210> 15
<211> 233
<212> PRT
<213> Circovirut lợn

<400> 15

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

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

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

Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Val Lys Ala Thr Thr Val Arg Thr

50 55 60
 Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asp Asp Phe Val
 65 70 75 80
 Pro Pro Gly Gly Gly Thr Asn Lys Ile Ser Ile Pro Phe Glu Tyr Tyr
 85 90
 Arg Ile Lys Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr
 100 105 110
 Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn
 115 120 125
 Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr
 130 135 140
 Ser Ser Arg His Thr Ile Pro Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr
 145 150 155 160
 Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro
 165 170 175
 Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Ser Arg Asn
 180 185 190
 Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Ile Tyr Asp
 195 200 205
 Gln Asp Tyr Asn Ile Arg Val Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe
 210 215 220
 Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Lys Pro
 225 230

<210> 16
 <211> 15450
 <212> ADN

<213> Virut gây hội chứng hô hấp và sinh sản ở lợn

<400> 16
 atgacgtata ggtgttggct ctatgccacg gcatttgtat tgtcaggagc tgtggccatt 60
 ggcacagccc aaaacttgct gcacggaaaa cgcccttctg tgacagcctt cttcagggga 120
 gcttaggggt ctgtccctag caccttgctt ctggagttgc actgccttac ggtctctcca 180
 cccctttaac catgtctggg atacttgatc ggtgcacgtg caccccaat gccaggggtg 240
 ttatggcgga gggccaagtc tactgcacac gatgtctcag tgcacggtct ctccttcctc 300
 tgaatctcca agttcctgag cttgggggtgc tgggcctatt ttataggccc gaagagccac 360
 tccggtggac gttgccacgt gcattcccca ctgtcgagtg ctcccctgcc ggggcctgct 420

ggctttctgc gatctttcca attgcacgaa tgaccagtgg aaacctgaac tttcaacaaa	480
gaatggtgcg ggttgagct gagatttaca gagccggcca actcaccct gcagttttga	540
aggctctaca agtttatgaa cggggttgtc gctggtaccc cattgtcgga cctgtccctg	600
gagtggccgt ttacgccaac tccctacatg tgagtgacaa acctttcccg ggagcaactc	660
atgtgttaac caacctaccg ctcccgaga ggcccaagcc tgaagacttt tgcccttttg	720
agtgtgctat ggctaacgtc tatgacattg gccataacgc cgtcatgtat gtggccagag	780
ggaaagtctc ctgggccct cgtggcggg atgaagtga atttgaaacc gtccccgaag	840
agttgaagtt gattgcgaac cgactccaca tctccttccc gccccaccac gcagtggaca	900
tgtctgagtt tgccttcata gccctggga gtggtgtctc cttgcgggtc gagcaccaac	960
acggctgcct tcccgtgat actgtccctg atgggaaactg ctggtggtac ttgtttgact	1020
tgctcccacc ggaagttcag aataaagaaa ttcgccgtgc taaccaattt ggctatcaaa	1080
ccaagcatgg tgtccatggc aagtacctac agcggaggct gcaagttaat ggtctccgag	1140
cagtgactga tacagatgga cctattgtcg tacagtactt ctctgttagg gagagtggga	1200
tccgccactt cagactggcg gaagaaccta gcctccctgg gtttgaagac ctctcagaa	1260
taagggtaga gcctaatacg tcgccaatgg gtggcaaggg tgaaaaaatc ttccggtttg	1320
gcagtcacaa gtggtacggt gctggaaaga gagcaaggag agcacgctct ggtgcgactg	1380
ccacggtcgc tcaccgcgct ttgcccgctc gcgaagcca gcaggccaag aagctcgagg	1440
ttgccagcgc caacagggct gagcatctca agtactattc cccgcctgcc gacgggaact	1500
gtggttgga ctgcatttcc gccattacca accggatggt gaattccaaa tttgaaacca	1560
ctcttcccga gagagtgaga cttcagatg actgggctac tgacgaggat cttgtgaata	1620
ccatccaaat cctcaggctc cccgcgccct tggacaggaa cgggtgcttg gctggcgcca	1680
agtacgtgct caagctggaa ggtgagcact ggaccgtctc tgtgaccctt gggatgacct	1740
cttctttgct ccccttgaa tgtgttcagg gttgttggtga gcataagagc ggtcttggtt	1800
tcccagacgt ggtcgaagtt tccggatttg accctgcctg tcttgaccga cttgctgaga	1860
taatgcactt gcctagcagt gtcattccag ctgctctggc cgagatgtcc gacgacttca	1920
atcgtctggc ttccccggcc gccactgtgt ggactgtttc gcaattcttt gcccgccaca	1980
gaggaggaga gcatcctgac cagggtgtgt tagggaaaat tatcaacctt tgtcaggtga	2040
ttgaggaatg ctgctgttcc cggaacaaag ccaaccgggc taccctggaa gaggttgcg	2100
caaaagtga ccagtacctc cgtggtgcag caagccttg agaatgcttg gccaaagt	2160
agagggctcg cccgccgagc gcgacggaca cctcctttga ttggaatgtt gtgcttcctg	2220
gggttgagac ggcgaatcag acaaccaaac agctcctatgt caaccagtgc cgcgctctgg	2280
ttcctgtcgt gactcaagag cttttggaca gagactcggc ccctctgacc gccttctcgc	2340
tgtccaattg ctactaccct gcacaagggt acgaggtccg tcaccgtgag aggctaaact	2400
ccttgctctc taagttggag ggggttggtc gtgaggaata tgggctcacg ccaactggac	2460

ctggcccgcg acccgcactg ccgaacgggc tcgacgagct taaagaccag atggaggagg 2520
 atctgctgaa attagtcaac gcccaggcaa cttcagaaat gatggccttg gcagccgagc 2580
 aggttgatct aaaagcttgg gtcaaaaatt acccacggtg gacaccgcca cccctccac 2640
 caagagttca gcctcgaaaa acgaagtctg tcaagagctt gctagagaac aagcctgtcc 2700
 ctgctccgcg caggaaggtc agatctgatt gtggcagccc gattttgatg ggcgacaatg 2760
 ttcctaacgg ttgggaagat tcgactgttg gtggtccctt tgatctttcg gcaccatccg 2820
 agccgatgac acctctgagt gagcctgtac ttattttccag gccagtgaca tctttgagtg 2880
 tgccggcccc agttcctgca ccgcgtagag ctgtgtcccg accgatgacg ccctcgagtg 2940
 agccaatttt tgtgtctgca ctgcgacaca aatttcagca ggtggaaaaa gcaaactctg 3000
 cggcagcagc gccgatgtgc caggacgaac ccttagattt gtctgcatcc tcacagactg 3060
 aatatgaggc ttcccccta acaccaccgc agaacgtggg cattctggag gtaagggggc 3120
 aagaagctga ggaagtctg agtgaaatct cggatattct gaatgatacc aaccctgcac 3180
 ctgtgtcatc aagcagctcc ctgtcaagtg ttaagatcac acgccccaaa tactcagctc 3240
 aagccattat cgactcgggc gggccctgca gtgggcacct ccaaaggga aaagaagcat 3300
 gcctccgcat catgctgaa gcttgtgatg cggccaagct tagtgacct gccacgcagg 3360
 aatggctttc tcgcatgtgg gataggggtg acatgctgac ttggcgcaac acgtctgctt 3420
 accaggcggt tcgcacctta gatggcaggt ttgggtttct ccaaagatg atactcgaga 3480
 cgccgccgcc ctaccctgtg gggtttgtga tgttgcctca caccctgca cttccgtga 3540
 gtgcagagag cgaccttacc attggttcag tcgccactga agatattcca cgcacctcg 3600
 ggaaaataga aaataccggt gagatgatca accagggacc cttggcatcc tctgaggaag 3660
 aaccgtata caaccaacct gccaaagact cccggatatc gtcgcggggg tctgacgaga 3720
 gcacagcagc tccgtccgcg ggtacagggt gcgccggctt atttactgat ttgccacctt 3780
 cagacggcgt agatgcggac ggtggggggc cgttgcagac ggtaagaaag aaagctgaaa 3840
 ggctcttcga ccaattgagc cgtcaggttt ttaacctcgt ctcccatctc cctgttttct 3900
 tctcacacct cttcaaactt gacagtgggt attctcggg tgattggggg tttgcagctt 3960
 ttactctatt ttgcctcttt ttgtgttaca gctaccatt cttcggtttc gttccctctt 4020
 tgggtgtatt ttctgggtct tctcggcgtg tgcgcatggg ggtttttggc tgctggctgg 4080
 cttttgctgt tggcctgttc aagcctgtgt ccgaccagc cggcactgct tgtgagtttg 4140
 actcgccaga gtgcaggaac gtccttcatt cttttgagct tctcaaacct tgggacctg 4200
 ttcgcagcct tgttggtggc cccgtcggtc tcggtcttgc cattcttggc aagttactgg 4260
 gcggggcacg ctacatctgg cattttttgc ttaggcttgg cattgttgca gattgtatct 4320
 tggctggagc ttatgtgctt tctcaaggta ggtgtaaaaa gtgctgggga tcttgataa 4380
 gaactgctcc taatgaaatc gccttcaacg tgttcccttt tacacgtgcg accaggtcgt 4440

cactcatcga	cctgtgcat	cggttttgtg	cgccaacagg	catggacccc	attttcctcg	4500
ccactgggtg	gcgtgggtgc	tggaccggcc	gaagtcccat	tgagcaaccc	tctgaaaaac	4560
ccatcgcggt	cgcccagttg	gatgaaaaga	ggattacggc	tagaactgtg	gtcgtcagc	4620
cttatgatcc	taatcaagcc	gtgaagtgtc	tgcgggtgtt	acaggcgggt	ggggcgatgg	4680
tggccgaggg	agtcccaaaa	gtggccaaag	tttctgctat	tccattccga	gccccttttt	4740
ttcccaccgg	agtgaagtt	gatcccgagt	gcaggatcgt	ggttgacccc	gataactttta	4800
ctacagccct	ccggtctggt	tactctacca	caaacctcgt	ccttggtgtg	ggggactttg	4860
cccagctgaa	tggactaaag	atcaggcaaa	tttccaagcc	ttcgggagga	ggcccacacc	4920
tcattgctgc	cctgcatgtt	gcctgctcga	tggcggttga	catgcttgct	ggggtttatg	4980
taacttcagt	ggggctctgc	ggtgccggca	ccaacgatcc	atggtgcact	aatccgtttg	5040
ccgttcctgg	ctacggacca	ggctctctct	gcacgtccag	attgtgcata	tcccaacatg	5100
gccttaccct	gcccttgaca	gcacttggtg	cgggattcgg	tcttcaggaa	atcgccttgg	5160
tcgttttgat	tttcgtttcc	atcggaggca	tggctcatag	gttgagttgt	aaggctgata	5220
tgctgtgcat	tttacttgca	atcgccagct	atgtttgggt	accccttacc	tggttgcttt	5280
gtgtgtttcc	ttgttggttg	cgctggttct	ctttgcaccc	ccttaccatc	ctatggttgg	5340
tgtttttctt	gatttctgta	aatatgcctt	cgggaatctt	ggccgtgggtg	ttattggttt	5400
ctctttggct	tttgggacgt	tatactaaca	ttgctggtct	tgtcaccccc	tatgatattc	5460
atcattacac	cagtggcccc	cgcggtgttg	ccgccttggc	taccgcacca	gatggaacct	5520
acttggtgct	cgtccgccgc	gctgcgttga	ctggtcgcac	catgctgttc	accccgcttc	5580
agcttgggtc	ccttcttgag	ggcgctttca	gaactcga	gccctcactg	aacaccgtca	5640
atgtggttgg	gtcctccatg	ggctctggtg	gagtgttcac	catcgacggg	aaaattaggt	5700
gcgtgactgc	cgcacatgtc	cttacgggtg	attcggctag	ggtttccgga	gtcggcttca	5760
atcaaagtct	tgactttgat	gtgaaagggg	acttcgccat	agctgattgc	ccgaattggc	5820
aaggagctgc	tcccaagacc	caattctgct	aggacggatg	gactggccgt	gcctattggc	5880
tgacatcctc	tggcgctcga	cccgggtgta	ttgggaatgg	attcgccctc	tgcttcaccg	5940
cgtgcggcga	ttccgggtcc	ccagtgatca	ccgaagctgg	tgagattgtc	ggcggtcaca	6000
caggatcaaa	taaacaagga	ggtggcatcg	tcacgcgcc	ttcaggccag	ttttgtaacg	6060
tggcacccat	caagctgagc	gaattaagtg	aattctttgc	tggaccaag	gtcccgtcgc	6120
gtgatgtgaa	ggttggcagc	cacataatta	aagacacgtg	cgaagtacct	tcagatcttt	6180
gcgccttgct	tgctgccaaa	cctgaactgg	agggaggcct	ctccaccgtc	caacttctgt	6240
gtgtgttttt	cctactgtgg	agaatgatgg	gacatgcctg	gacgcccttg	gttctgtgtg	6300
ggtttttcat	tctgaatgag	gttctcccag	ctgtcctggg	tcggagtgtt	ttctcctttg	6360
ggatgtttgt	gctatcttgg	ctcacaccat	ggtctgcgca	agttctgatg	atcaggcttc	6420
taacagcagc	tcttaacagg	aacagatggt	cacttgcctt	ttacagcctt	ggtgcggtga	6480

ccggttttgt	cgcagatctt	gcggtaaactc	aagggcaccc	gttgcaggca	gtaatgaatt	6540
tgagcaccta	tgccttcctg	cctcggatga	tggttgtgac	ctcaccagtc	ccagtgattg	6600
cgtgtggtgt	tgtgcaccta	cttgccatca	ttttgtactt	gttcaagtac	cgcggcctgc	6660
acaatgttct	tgttggtgat	ggagcgtttt	ctgcagcttt	cttcttgcca	tactttgccg	6720
agggaaagtt	gagggaaagg	gtgtcgcaat	cctgcggaat	gaatcatgag	tcattgactg	6780
gtgccctcgc	tatgagactc	aatgacgagg	acttggactt	ccttacgaaa	tggactgatt	6840
ttaagtgtct	tgtttctgcg	tccaacatga	ggaatgcagc	aggccaattc	atcgaggctg	6900
cctatgcaaa	agcacttaga	attgaacttg	cccagttggt	gcaggttgat	aaggttcgag	6960
gtactttggc	caagcttgag	gcttttgctg	ataccgtggc	accccaactc	tcgcccgggtg	7020
acattgttgt	tgctcttggc	catagcctg	ttggcagcat	cttcgaccta	aaggttgggtg	7080
gtaccaagca	tactctccaa	gtcattgaga	ccagagtcct	tgccgggtcc	aaaatgaccg	7140
tggcgcgcgt	cgttgacca	acccccacgc	ccccaccgc	acccgtgccc	atccccctcc	7200
caccgaaagt	tctagagaat	ggccccaacg	cctgggggga	tggggaccgt	ttgaataaga	7260
agaagaggcg	taggatggaa	accgtcggca	tctttgtcat	gggtgggaag	aagtaccaga	7320
aattttggga	caagaattcc	ggtgatgtgt	tttacgagga	ggtccatgac	aacacagatg	7380
cgtgggagtg	cctcagagtt	ggtgaccctg	ccgactttta	ccctgagaag	ggaactctgt	7440
gtgggcatac	tactattgaa	gataaggatt	acaaagtcta	cgcctcccca	tctggcaaga	7500
agttcctggt	ccccgtcaac	ccagagagcg	gaagagccca	atgggaagct	gcaaagcttt	7560
ccgtggagca	ggcccttggc	atgatgaatg	tcgacggtga	actgacggcc	aaagaagtgg	7620
agaaactgaa	aagaataatt	gacaaacttc	agggccttac	taaggagcag	tgtttaaact	7680
gctagccgcc	agcggcttga	cccgtgtggt	tcgcggcggc	ttggttggtta	ctgagacagc	7740
ggtaaaaata	gtcaaatctc	acaaccggac	tttcacccta	gggcctgtga	atttaaaagt	7800
ggccagtgag	gttgagctga	aagacgcggt	cgagcacaa	caacaccgg	ttgcaagacc	7860
ggttgacggt	ggtgttggtg	tcctgcgttc	cgcagttcct	tcgcttatag	atgtcctgat	7920
ctccggtgct	gacgcatctc	ctaagttact	cgctcgtcac	gggccgggga	acactgggat	7980
cgatggcacg	ctttgggact	ttgaggccga	ggccaccaaa	gaggaaattg	cgctcagtgc	8040
gcaaataata	caggcttggtg	acattaggcg	cggtgacgca	cctgaaattg	gtctccctta	8100
caagctgtac	cctgttaggg	gcaaccctga	gcgggtaaaa	ggagttttac	agaataacaag	8160
gtttggagac	ataccttaca	aaacccccag	tgacactggg	agcccagtg	acgcggctgc	8220
ctgcctcacg	cccaatgcca	ctccggtgac	tgatgggcgc	tccgtcttgg	ctactacat	8280
gccctccggt	tttgaattgt	atgtaccgac	cattccagcg	tctgtccttg	attatcttga	8340
ctctaggcct	gactgcccc	aacagttgac	agagcacggc	tgtgaggatg	ccgcattgag	8400
agacctctcc	aagtatgact	tgtccacca	aggctttggt	ttacctgggg	ttcttcgcct	8460

tgtagcgaag	tacctgtttg	cccacgtggg	taagtgcccg	cccgttcac	ggccttcac	8520
ttacctgcc	aagaattcta	tggtggaat	aaatgggaac	aggtttcaa	ccaaggacat	8580
tcagagcgtc	cccgaatcg	acgttctgtg	cgacagggc	gtgcgagaaa	actggcaaac	8640
tgttaccct	tgtaccctca	agaaacagta	ttgtgggaag	aagaagacta	ggacaatact	8700
cggcaccaat	aatttcattg	cggtggccca	ccgggcagcg	ttgagtgggtg	tcaccaggg	8760
cttcatgaaa	aaggcgttta	actcgcccat	cgccctcggg	aaaaacaaat	ttaaggagct	8820
acagactccg	atcttaggca	ggtgccttga	agctgatctt	gcatcctgtg	atcgatccac	8880
acctgcaatt	gtccgctggg	ttgccgcaa	ccttctttat	gaacttgcct	gtgctgaaga	8940
gcacctaccg	tcgtacgtgc	tgaactgctg	ccatgaccta	ttggtcacgc	agtccggcgc	9000
agtgactaag	aggggtggcc	tgctgtctgg	cgacccgatc	acttctgtgt	ctaaccacat	9060
ttacagcttg	gtgatatatg	cacagcacat	ggtgcttagt	tactttaaaa	gtggtcaccc	9120
tcattggcctt	ctgttcctac	aagaccagct	gaagtctgag	gacatgtctca	aagtccaacc	9180
cctgatcgtc	tattcggacg	acctcgtgct	gtatgccgaa	tctcccacca	tgccgaacta	9240
ccactgggtg	gtcgaacatc	tgaatttgat	gctgggtttt	cagacggacc	caaagaagac	9300
agccataacg	gactcgccat	catttctagg	ctgtaggata	ataaatggac	gccagctagt	9360
ccccaaccgt	gacaggatcc	tcgcggccct	cgcttaccat	atgaaggcaa	acaatgtttc	9420
tgaatactac	gccgcggcgg	ctgcaatact	catggacagc	tgtgcttggt	tagagtatga	9480
tcctgaatgg	tttgaagagc	ttgtggttgg	gatagcgcat	tgcgcccgca	aggacggcta	9540
cagctttccc	ggcccgcgt	tcttctgtc	catgtgggaa	aaactcagat	ccaatcatga	9600
ggggaagaag	tccagaatgt	gcgggtattg	cggggccctg	gctccgtacg	ccactgcctg	9660
tggcctcgac	gtctgtat	accacacca	cttccaccag	cattgtccag	tcacaatctg	9720
gtgtggccac	ccggctgggt	ctggttcttg	tagtgagtgc	aaaccccccc	tagggaaagg	9780
cacaagccct	ctagatgagg	tgtagaaca	agtcccgtat	aagcctccac	ggactgtaat	9840
catgcatgtg	gagcagggtc	tcaccctct	tgaccaggc	agataccaga	ctcgccgcgg	9900
attagtctcc	gttaggcgtg	gcatcagagg	aatgaagtt	gacctaccag	acggtgatta	9960
tgctagcacc	gccctactcc	ccacttgtaa	agagatcaac	atggtcgctg	tcgcctctaa	10020
tggtgtgcgc	agcaggttca	tcacgggtcc	gcccgggtgct	gggaaaacat	actggctcct	10080
tcagcaggtc	caggatgggtg	atgtcattta	cacaccgact	caccagacca	tgctcgacat	10140
gattagggct	ttggggacgt	gccggttcaa	cgtcccagca	ggtgcaacgc	tgcaattccc	10200
tgccccctcc	cgtaccggcc	cgtgggttcg	cctcctagcc	ggcggttggt	gtcctggtaa	10260
gaattccttc	ttggatgaag	cagcgtattg	taatcacctt	gatgtcttga	ggctccttag	10320
caaaaccacc	ctcacctgtc	tgggagactt	caaacaactc	caccagtggt	gttttgattc	10380
tcattgctat	gtttttgaca	tcatgcctca	gaccagttg	aagaccatct	ggagattcgg	10440
acagaacatc	tgtgatgcca	tccaaccaga	ttacagggac	aaacttgtgt	ccatgggtcaa	10500

cacaacccgt	gtaaccacg	tggaaaaacc	tgtcaagtat	gggcaagtcc	tcaccctta	10560
ccacagggac	cgagaggacg	gcgccatcac	aattgactcc	agtcaaggcg	ccacatttga	10620
tgtggtcaca	ctgcatttgc	ccactaaaga	ttcactcaac	aggcaaagag	cccttgttgc	10680
tatcaccagg	gcaagacatg	ctatctttgt	gtatgaccca	cacaggcaat	tgcagagcat	10740
gtttgatctt	cctgcgaagg	gcacacccgt	caacctcgca	gtgcaccgtg	atgagcagct	10800
gatcgtactg	gatagaaata	ataaagaatg	cacagttgct	caggctctag	gcaacggaga	10860
taaatttagg	gccaccgaca	agcgcgttgt	agattctctc	cgcgccattt	gtgctgatct	10920
ggaagggtcg	agctctccgc	tccccaaggt	cgcacacaac	ttgggatttt	atttctcacc	10980
tgatttgaca	cagtttgcta	aactcccgtt	agaccttgca	ccccactggc	ccgtggtgac	11040
aacccagaac	aatgaaaagt	ggccggatcg	gctggttgcc	agccttcgcc	ctgtccataa	11100
gtatagccgt	gcgtgcattg	gtgccggcta	tatggtgggc	ccctcggtgt	ttctaggcac	11160
ccctggggtc	gtgtcatact	acctcacaaa	atttgtcaag	ggcgaggctc	aagtgcttcc	11220
ggagacagtc	ttcagcaccg	gccgaattga	ggtggattgc	cgggagtatc	ttgatgacag	11280
ggagcgagaa	gttgctgagt	ccctcccaca	tgccttcatt	ggcgacgtca	aaggcaccac	11340
cgttggggga	tgtcatcatg	tcacctcaa	ataccttcg	cgcttccttc	ccaaggaatc	11400
agtcgcggta	gtcgggggtt	cgagccccgg	gaaagccgca	aaagcagtgt	gcacattgac	11460
ggatgtgtac	ctcccagacc	ttgaggccta	cctccaccca	gagactcagt	ccaagtgtctg	11520
gaaagttatg	ttggacttca	aggaagttcg	actgatggtc	tggaaagaca	agacggccta	11580
tttccaactt	gaaggccgct	atttcacctg	gtatcagctt	gcaagctacg	cctcgtacat	11640
ccgtgttcct	gtcaactcca	cggtgtatct	ggacccctgc	atggggccctg	ccctttgcaa	11700
cagaagagtt	gtcgggtcca	cccattgggg	agctgacctc	gcagtcaccc	cttatgatta	11760
cggtgctaaa	atcatcttgt	ctagcgctta	ccatggtgaa	atgcctcctg	gataacaagat	11820
tctggcgtgc	gcggagttct	cgctcgacga	cccagtcaag	tacaaacaca	cctgggggtt	11880
tgaatcggat	acagcgtatc	tgtatgagtt	caccggaaac	ggtgaggact	gggaggatta	11940
caatgatgcg	tttcgtgcgc	gccagaaagg	gaaaatttat	aaggccactg	ctaccagcat	12000
gaagttttat	tttcccccg	gccccgtcat	tgaaccaact	ttaggcctga	attgaaatga	12060
aatgggggtct	atacaaagcc	tcttcgacaa	aattggccag	ctttttgtgg	atgctttcac	12120
ggaatttttg	gtgtccattg	ttgatatcat	catatttttg	gccattttgt	ttggcttcac	12180
catcgccggt	tggctgggtg	tcttttgcac	cagattgggt	tgctccgcgg	tattccgtgc	12240
gcgccctgcc	attcaccctg	agcaattaca	gaagatccta	tgaggccttt	ctttctcagt	12300
gccgggtgga	cattcccacc	tggggggtaa	aacacccttt	ggggatgttt	tggcaccata	12360
aggtgtcaac	cctgattgat	gaaatgggtg	cgcgtcgaat	gtaccgcgtc	atggataaag	12420
cagggcaagc	tgccctgaaa	caggtggtga	gcgaggctac	gctgtctcgc	attagtagtc	12480

tggatgtggt ggctcatttt caacatcttg ccgccattga agccgagacc tgtaaataatt 12540
 tggcttctcg actgcccagtg ctacacaacc tgcgcatgac aggggtcaaatt gtaaccatag 12600
 tgtataatag cacttttaaat cagggtgtttg ctatTTTTtcc aacccttggt tcccggccaa 12660
 agcttcatga ttttcagcaa tggctaatag ctgtacattc ctccatattt tcctctgttg 12720
 cagcttcttg tactctTTTT gttgtgctgt gggtgagggt tccaatgcta cgtactgttt 12780
 ttggtttccg ctggttaggg gcaatTTTTt tttcgaactc atggtgaatt acacgggtgtg 12840
 tccaccttgc ctaccccgac aagcagccgc tgaggctcct gaaccggta ggtctctttg 12900
 gtgcaggata gggcatgacc gatgtgggga ggacgatcac gacgaactgg ggttcatggt 12960
 tccgcctggc ctctccagcg aaagccactt gaccagtgtt tacgcctgggt tggcgttcct 13020
 gtccttcagc tacacggccc agttccatcc cgagatattt gggatagga acgtgagtga 13080
 agtttatgtt gacatcaagc accaattcat ctgcgccgtt catgacgggc agaaccacac 13140
 cttgcctcgc catgacaata tttcagccgt atttcagacc tactatcaac atcagggtcga 13200
 cggcggcaat tggtttcacc tagaatggct gcgtcccttc ttttctctt ggttggtttt 13260
 aaatgtttcg tggtttctca ggcgttcgcc tgcaagccat gtttcagttc gagtctttca 13320
 gacatcaaaa ccaacactac cgcagcatca ggctttgttg tcctccagga catcagctgc 13380
 cttaggcatg gcgactcgtc ctttccgacg attcgcaaaa gctctcaatg ccgcacggcg 13440
 atagggacac ctgtgtatat caccatcaca gccaatgtga cagatgagaa ttacttacat 13500
 tcttctgatc tcctcatgct ttcttcttgc ctttctatg cttctgagat gagtgaaaag 13560
 ggattcaagg tggattttgg caatgtgtca ggcatcgtgg ctgtgtgtgt caactttacc 13620
 agctacgtcc aacatgtcaa agagtttact caacgctcct tgggtggtcga tcatgtgcgg 13680
 ctgcttcatt tcatgacacc tgagaccatg aggtgggcaa ccgttttagc ctgtcttttt 13740
 gccatcctac tggcaatttg aatgttcaag tatgttgggg aaatgcttga ccgcgggctg 13800
 ttgctcgcga ttgctttctt tgtggtgtat cgtgccgttc tggtttgctg tgctcgcaa 13860
 cgccaacagc agcagcagct ctcatTTcca gttgatttat aacttgacgc tatgtgagct 13920
 gaatggcaca gattggctgg cagaaaaatt tgattggcg gtggagactt ttgtcatctt 13980
 tcccggttg actcacattg tttcctattg tgcactcacc accagccatt tccttgacac 14040
 agttggtctg gttactgtgt ccaccgccgg gttttatcac gggcggtatg tcttgagtag 14100
 catctacgcg gtctgtgctc tggctgcgtt gatttgcttc gttattaggc ttgcaagaa 14160
 ctgcatgtcc tggcgctact cttgtaccag atataccaac ttccttctgg acactaaggg 14220
 cagactctat cgttggcgggt cgcccgttat catagaaaaa aggggtaagg ttgaggtcga 14280
 aggtcatctg atcgacctca aaagagttgt gcttgatggt tccgtggcaa cccctttaac 14340
 cagagtttca gcggaacaat ggggtcgtct ctagacgact tttgcatga tagcactgct 14400
 ccacaaaagg tgcttttggc gttttccatt acctacacgc cagtaatgat atatgctcta 14460
 aaggtaagtc gcggccgact gctagggctt ctgcaccttt tgatctttct gaattgtgct 14520

```

tttaccttcg ggtacatgac attcgcgcac tttcagagca caaatagggc cgcgctcgct 14580
atgggagcag tagttgcact tctttggggg gtgtactcag ccatagaaac ctggaaattc 14640
atcacctcca gatgccgttt gtgcttgcta ggccgcaagt acattctggc ccctgcccac 14700
cacgtcgaaa gtgccgcggg ctttcacccg attgcggcaa atgataacca cgcatttgct 14760
gtccggcgct ccggctccat tacggttaac ggcacattgg tgcccgggtt gaaaagcctc 14820
gtgttggggtg gcagaaaagc tgttaaacag ggagtggtaa accttgctaa atatgccaaa 14880
taacaacggc aagcagcaaa agaaaaagaa ggggaatggc cagccagtca accagctgtg 14940
ccagatgctg ggtaaaatca tcgccagca aaaccagtcc agaggcaagg gaccgggcaa 15000
gaaaagtaag aagaaaaacc cggagaagcc catttttcct ctagcgaccg aagatgacgt 15060
caggcatcac ttaccccctg gtgagcggca attgtgtctg tcgtcgatcc agactgcctt 15120
taaccagggc gctggaactt gtaccctgtc agattcaggg aggataagtt acactgtgga 15180
gtttagtttg ccgacgcac atactgtgcg cctgatccgc gtcacagcat caccctcagc 15240
atgatgggct ggcattcttt aggcacctca gtgtcagaat tggaagaatg tgtggtggat 15300
ggcactgatt gacattgtgc ctctaagtca cctattcaat tagggcgacc gtgtgggggt 15360
aaaatttaat tggcgagAAC catgcggccg caattaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 15420
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 15450

```

<210> 17

<211> 2352

<212> ADN

<213> Virut gây hội chứng hô hấp và sinh sản ở lợn

<400> 17

```

cctatcattg aaccaacttt aggcctgaat tgaaatgaaa tggggcttat gcaaagcctt 60
tttgacaaaa ttggccaact tttcgtggat gctttcacgg agttcttggg gtccattgtt 120
gatatcatta ttttttggc cttttgttt ggcttcacca tcgccggttg gctggtggct 180
ttttgcatca gattggtttg ctccgcgata ctccgtgcgc gccctgccat tcaactctgag 240
caattacaga agatcctatg aggcctttct ttctcagtgc cagggtggaca ttcccacctg 300
gggaattaaa catccttttg ggatgctttg gcaccataag gtgtcaaccc tgattgatga 360
aatggtgtcg cgtcgaatgt accgcatcat ggaaaaagca ggacaggctg cctggaaaca 420
gggtgtgagc gaggtacgc tgtctcgcat tagtagtttg gatgtggtgg ctcactttca 480
gcatcttgcc gccattgaag ccgagacctg taaatatattg gcctctcggc tgcccatgct 540
acacaacctg cgcattgacag ggtcaaatgt aaccatagt tataatagta ctttgaatca 600
gggtgcttgct attttcccaa cccctgggtc ccggccaaag cttcatgatt ttcagcaatg 660
gctaatagct gtacattcct ctatatattc ctctgttgca gcttcttgta ctctttttgt 720
tgtgctgtgg ttgcgggttc caatgctacg tattgctttt ggtttccgct ggtaggggc 780
aatttttctt tcgaactcac agtgaactac acggtgtgtc caccttgctt caccggcaa 840

```

gcagccacag aggcctacga acctggcagg tctctttggt gcaggatagg gtatgatcgc 900
 tgtggggagg acgatcatga tgaactaggg tttgtggtgc cgtctggcct ctccagcgaa 960
 ggccacttga ccagtgttta cgcctgggtg gcgttcctgt ctttcagtta cacagcccag 1020
 ttccatcctg agatattcgg gatagggaat gtgagtcagg tttatgttga catcaggcat 1080
 caattcattt gcgccgttca cgacgggcag aacgccactt tgccctcgcca tgacaatatt 1140
 tcagccgtgt tccagactta ttaccaacat caagtcgacg gcggcaattg gtttcaccta 1200
 gaatggctgc gtcccttctt ttcctcttgg ttggttttaa atgtctcttg gtttctcagg 1260
 cgttcgctg caagccatgt ttcagttcga gtcttgcaga cattaagacc aacaccaccg 1320
 cagcggcagg ctttgctgtc ctccaagaca tcagttgcct taggtatcgc aactcggcct 1380
 ctgaggcggt tcgcaaaatc cctcagtgtc gtacggcgat agggacaccc atgtatatta 1440
 ctgtcacagc caatgtaacc gatgagaatt atttgcattc ctctgacctt ctcatgcttt 1500
 cttcttgctt tttctacgct tctgagatga gtgaaaaggg atttaaagtg gtatttggca 1560
 atgtgtcagg catcgtggct gtgtgctgca actttaccag ctacgtccaa catgtcaagg 1620
 aatttaccca acgctccttg gtagtcgacc atgtgctggc gctccatttc atgacacctg 1680
 agaccatgag gtgggcaact gttttagcct gtctttttgc cattctgttg gccatttgaa 1740
 tgtttaagta tgttggggaa atgcttgacc gcgggctatt gctcgtcatt gctttttttg 1800
 tgggtgatcg tgccgtcttg gtttgttgcg ctcgccagcg ccaacagcag caacagctct 1860
 catttacagt tgatttataa cttgacgcta tgtgagctga atggcacaga ttggttagct 1920
 ggtgaatttg actgggcagt ggagtgtttt gtcatttttc ctgtgttgac tcacattgtc 1980
 tcctatggtg ccctcaccac cagccatttc cttgacacag tcgggtctggt cactgtgtct 2040
 accgccggct tttcccacgg gcggtatgtt ctgagtagca tctacgcggc ctgtgccctg 2100
 gctgcgttga tttgcttcgt cattaggttt acgaagaatt gcatgtcctg gcgctactca 2160
 tgtaccagat ataccaactt tcttctggac actaagggca gactctatcg ttggcggtcg 2220
 cctgtcatca tagagaaaag gggtaaagt ttgagtcgaag gtcattctgat cgacctcaag 2280
 agagttgtgc ttgatggttc cgcggcaacc cctataacca aagtttcagc ggagcaatgg 2340
 ggtcgtcctt ag 2352

<210> 18

<211> 886

<212> ADN

<213> Virus gây hội chứng hô hấp và sinh sản ở lợn

<400> 18

atggggctcg ccttagatga cttctgccat gatagcacgg ctccacaaaa ggtgcttttg 60

gcgttctcta ttacctacac gccagtgatg atatatgccc taaaagtaag tcgcgggccga 120

ctgctagggc ttctgcacct tttgatcttc ctaaattgtg ctttcacctt cgggtacatg 180

acattcgtgc actttcagag cacaacaag gtcgcgctca ctatgggagc agtagttgca 240

ctcctttggg ggggtgtactc agccatagaa acctggaaat tcatcacctc cagatgccgt	300
ttgtgcttgc taggccgcaa gtacattttg gccctgccc accacgttga aagtgccgca	360
ggctttcatc cgatagcggc aaatgataac cacgcatttg tcgtccggcg tcccggctcc	420
actacggtta acggcacatt ggtgcccggg ttgaaaagcc tcgtgttggg tggcagaaaa	480
gctgtcaaac agggagtggg aaaccttggt aaatatgcca aataacaacg gcaagcagca	540
gaagaaaaag aagggggatg gccagccagt caatcagctg tgccagatgc tgggtaagat	600
catcgctcag caaaaccagt ccagaggcaa gggaccggga aagaaaaaca agaagaaaaa	660
cccggagaag ccccatthttc ctctagcgac tgaagatgat gtcagacatc acttcacctc	720
tggtgagcgg caattgtgtc tgtcgtcaat ccagacagcc tttaatcaag gcgctggaac	780
ttgtaccctg tcagattcag ggaggataag ttacactgtg gagtttagtt tgccgacgca	840
tcatactgtg cgcctgatcc gcgtcacagc gtcaccctca gcatga	886