



(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) 
1-0022999

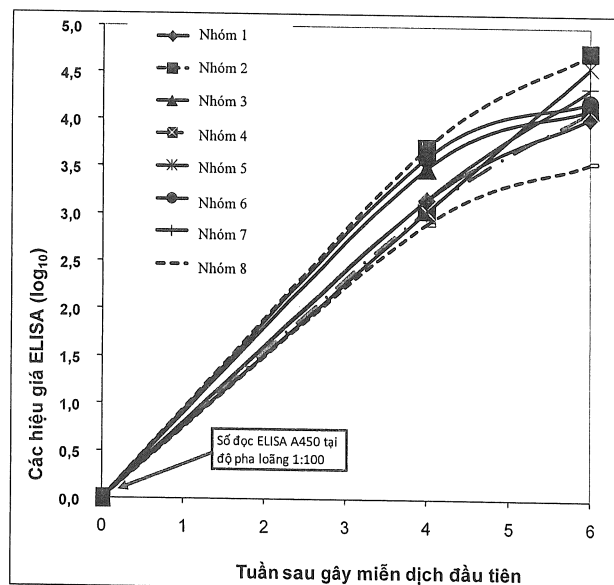
(51)⁷ A61K 39/12

(13) B

(21) 1-2013-00452 (22) 08.07.2010
(86) PCT/US2010/041406 08.07.2010 (87) WO2012/005732 12.01.2012
(45) 25.02.2020 383 (43) 25.06.2013 303
(73) UNITED BIOMEDICAL, INC. (US)
25 Davids Drive, Hauppauge, New York 11788, United States of America
(72) Chang Yi WANG (US), Wen-Jiun PENG (TW)
(74) Công ty TNHH Lê & Lê (LE & LE)

(54) CHẾ PHẨM VAXIN CIRCOVIRUT CỦA LỢN TYP 2 (PCV2) CHỨA KHÁNG NGUYÊN PEPTIT ĐỂ BẢO VỆ LỢN CON CHỐNG LẠI KHẢ NĂNG BỊ LÂY NHIỄM PCV2

(57) Sáng chế đề xuất chế phẩm vaccin circovirut của lợn typ 2 (PCV2) chứa kháng nguyên peptit thu được từ protein capsit PCV2 được mô tả. Theo các phương án khác nhau, kháng nguyên peptit bao gồm các axit amin của protein capsit từ khoảng axit amin 47 đến khoảng axit amin 202. Theo một số phương án, kháng nguyên peptit liên kết tùy ý với epitop nhân tạo tế bào T hỗ trợ và/hoặc được trộn với các epitop tế bào T hỗ trợ thu được từ các protein ORF1 và ORF3 của PCV2. Sáng chế cũng đề xuất các phương pháp sử dụng chế phẩm vaccin PCV2. Theo các phương án khác nhau, chế phẩm vaccin được sử dụng ở các động vật để ngăn chặn lây nhiễm PCV2. Theo các phương án khác, chế phẩm vaccin PCV2 được sử dụng làm kháng nguyên để chẩn đoán lây nhiễm PCV2.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến vaccin dựa trên peptit kháng circovirut của lợn typ 2 (Porcine circovirus type 2 - PCV2) và phương pháp sản xuất vaccin này để bảo vệ lợn con chống lây nhiễm PCV2 ngay cả khi các kháng thể nhận được từ cơ thể mẹ kháng PCV2 có thời gian tồn tại ngắn nhưng có các hiệu giá tương đối cao.

Các chế phẩm vaccin theo các phương án khác nhau của sáng chế chứa peptit thu được từ khung đọc mở 2 (Open reading frame 2, ORF2) - mã hóa cho protein capsit, mà peptit này liên kết tùy ý với epitop tế bào T hỗ trợ nhân tạo để tăng cường tính gây miễn dịch tế bào B của nó, epitop này có thể được bổ sung tùy ý với hỗn hợp các peptit thu được từ ORF1 và ORF3 của PCV2 bao gồm nhóm các epitop tế bào T hỗ trợ của PCV2, được điều chế trong hệ phân phối được chấp nhận trong thú y làm các chế phẩm vaccin.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Circovirut của lợn (Porcine circovirus - PCV) được nhận biết năm 1974 là virut lây nhiễm tương tự picornavirut ở dòng tế bào nuôi cấy mô thận ở lợn (PK15) (1). Năm 1998, PCV khác biệt về mặt kháng nguyên và di truyền được phân lập từ mô lợn và được gọi là *circovirut của lợn typ 2* (Porcine circovirus type 2 - PCV2); PCV2 liên quan đến bệnh lâm sàng ở lợn (2).

Hội chứng suy nhược đa hệ thống sau cai sữa ở lợn con (Postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS), một bệnh nổi cộm và quan trọng về mặt kinh tế ở lợn, gây ra bởi PCV2. Tuy nhiên, bằng chứng cho rằng biểu lộ các triệu chứng PMWS đòi hỏi đồng lây nhiễm với mầm bệnh như *parvovirut của lợn* (Porcine parvovirus - PPV) hoặc chất kích thích miễn dịch tương tự, căng thẳng, hoặc đồng yếu

tổ. Triệu chứng này làm yếu sức lợn có độ tuổi từ 7 đến 15 tuần, với sức bị hao mòn, hô hấp nguy cấp, các hạch bạch huyết bị sưng, tiêu chảy, xanh xao, và bệnh vàng da. Hơn nữa, các tổn thương lớn và tổn thương mô có thể ảnh hưởng đến nhiều hệ cơ quan và liên quan đến viêm phổi mô kẽ, bệnh hạch bạch huyết, viêm gan, viêm thận, viêm cơ tim, viêm ruột, chứng viêm da, và viêm tụy (1,3).

Các kháng thể đặc hiệu đối với PCV2 được phát hiện từ năm 1973 ở huyết thanh lợn (4). Chẩn đoán PMWS dựa trên phát hiện axit nucleic đặc hiệu cho PCV2 hoặc kháng nguyên liên quan đến các thương tổn ở các mô bị ảnh hưởng. Virus được phân lập từ tim, phổi, gan, thận, lá lách, tuyến nước bọt, hạch bạch huyết, tuyến giáp, tuyến ức, ống tiêu hóa, phân, lá lách, tinh hoàn, và não (1,5).

Đường truyền bệnh chủ yếu của PCV2 còn chưa được biết, nhưng bằng chứng cho rằng PCV2 có thể được truyền theo cả chiều ngang và chiều dọc. Nó được phát hiện trong mắt, mũi, và các mẫu phân lợn bị lây nhiễm tự nhiên. Phân lập PCV2 từ mô thai lợn không phát triển cho rằng nó được truyền theo chiều dọc. Việc phát hiện axit nucleic PCV2 trong tinh dịch lợn đực bị lây nhiễm tự nhiên và lây nhiễm thực nghiệm cho rằng truyền bệnh là từ lợn đực đến lợn cái con và các lứa đẻ bị nhiễm PCV2 tự nhiên của chúng (5).

Circovirus của lợn typ 2 (PCV2) là một virus nhỏ không capsit có hệ gen là ADN mạch đơn (single-stranded DNA, ssDNA) vòng. Hệ gen bao gồm sáu khung đọc mở (open reading frames, ORFs) mã hóa cho các protein giả định (2) với bốn ORF có chung độ tương đồng đáng kể với các ORF tương tự ở circovirus của lợn typ 1 không gây bệnh (Porcine circovirus type 1, PCV1) (6). Chỉ các protein được mã hóa bởi ORF1, ORF2, và ORF3 được phát hiện trong các tế bào bị lây nhiễm PCV2. ORF1 mã hóa cho protein replicaza có 312 axit amin và cũng tạo ra biến thể cắt nối có 168 axit amin, cả hai protein này cần cho sao chép PCV2 (7). Protein capsit cấu trúc được mã hóa bởi ORF2 (8); và ORF3 mã hóa cho protein bảo thủ cao mà protein này không cần cho sao chép nhưng đóng vai trò quan trọng quá trình chết theo chương trình gây ra bởi PCV2 và tính gây bệnh (9).

Chỉ protein capsit được mã hóa bởi ORF2 bộc lộ trên bề mặt của PCV2 là có

khả năng kích thích đáp ứng kháng thể bảo vệ bởi các tế bào B của hệ miễn dịch vật chủ (10). Phù hợp với quan sát này, lập bản đồ PEPSCAN nghiên cứu nhóm các epitop tế bào B có tính trội miễn dịch có tính đặc hiệu đối với PCV2 chủ yếu được khu trú tại các vùng trên protein capsit PCV2, tại các gốc 65-87, 113-139, 169-183, và 193-207 (11). Ngoài các epitop tế bào B, các epitop tế bào T có tính trội miễn dịch, bao gồm các epitop tế bào T hỗ trợ, là yếu tố quan trọng khác ảnh hưởng đến tính kháng nguyên của virut. Các epitop tế bào T hỗ trợ kích thích các đáp ứng tế bào T hỗ trợ bảo vệ (T helper cell, Th) mà báo hiệu cho các tế bào B sản xuất kháng thể. Trái với sự khu trú của các epitop tế bào B ở protein capsit (11), lập bản đồ epitop tế bào T của PCV2 với các peptit có 20 đơn phân và các thử nghiệm tăng sinh tế bào lympho biểu lộ các đáp ứng Th có tính trội miễn dịch được khu trú ổn định nhất đối với các epitop trên các protein không cấu trúc của ORF1 và ORF3, trong khi các epitop Th không phải dạng thẳng được mã hóa bởi ORF2 biểu hiện tính trội miễn dịch (12).

Thể hiện các yếu tố quyết định Th đối với hệ miễn dịch bởi peptit tổng hợp là yếu tố then chốt kiểm soát tính gây miễn dịch của peptit tổng hợp. Các epitop Th mà có tính trội miễn dịch và không được phân loại có tính phản ứng cao và rộng trong quần thể các dạng MHC khác nhau (13). Như vậy, hiếm các vị trí Th có tính trội miễn dịch trên protein capsit giúp giải thích tính gây miễn dịch hạn chế của các vaccin tiểu đơn vị ở capsit đối với PCV2. Tính gây miễn dịch của peptit gây miễn dịch tiểu đơn vị có thể trở nên mạnh bằng liên kết cộng hóa trị của epitop đích tế bào B đối với các vị trí Th lạ không phân loại được lựa chọn, bao gồm epitop Th không được phân loại mà mức đáp ứng di truyền của nó được mở rộng qua tổ hợp hóa học (14, 15, 16). Hơn nữa, hiệu lực miễn dịch của vaccin cho lợn và bảo vệ lợn khỏi lây nhiễm virut được tạo ra bởi vaccin có thể bị ảnh hưởng bởi nhiều epitop Th của virut, và các epitop này có thể là bảo vệ chéo khi kết hợp với các epitop tế bào B từ các protein khác (17).

Vaccin có giá thành thấp đặc hiệu cao mà bảo vệ các con lợn con kháng các bệnh liên quan đến PCV2 như PMWS là cần thiết. Các vaccin thông thường cho các con lợn dựa trên toàn bộ virut PCV2 bị bất hoạt. Tuy nhiên, PCV2 không sao chép với các hiệu giá cao trong tế bào nuôi cấy, làm các vaccin thông thường có giá thành cao và hiệu lực thấp. Các vaccin khác dựa trên các kháng nguyên ORF2 tái tổ hợp của

PCV2. Các tiểu đơn vị capsit ORF2 của PCV2 được biểu hiện trong các hệ biểu hiện khác nhau bao gồm hệ biểu hiện baculovirut ở các tế bào côn trùng (3,10). Trong phần lớn các ứng dụng, các tế bào côn trùng sản xuất các protein capsit tái tổ hợp của PCV2 bị dung giải và được bào chế thành các vaccin được sử dụng để tiêm chủng các con lợn con. Các kháng nguyên tái tổ hợp này thường bao gồm tế bào chủ và các vectơ-kháng nguyên được mã hóa, như vậy làm cho vaccin này không đặc hiệu và có thể gây ra các đáp ứng miễn dịch bất lợi nghiêm trọng bao gồm tính quá mẫn.

Cản trở khác đối với các vaccin virut PCV2 bị bất hoạt, và đối với các vaccin capsit tiểu đơn vị như các dịch dung giải virut tái tổ hợp hoặc như protein tinh sạch, là hiệu lực tương đối thấp của chúng khi sử dụng cho các con lợn con bình thường trên cánh đồng. Chúng thường được thử nghiệm ở các con lợn con không có mầm bệnh cụ thể (specific pathogen-free, SPF) hoặc các con lợn con bị lấy mất các nguồn từ sữa non do thủ thuật Xê-da (cesarean-derived colostrum deprived, CDCD) do các con này trên cánh đồng thường có các kháng thể nhận được từ mẹ (maternally derived antibodies, MDA). Các kháng thể này từ mẹ, trong khi thường có các hiệu giá rất thấp và khoảng thời gian cung cấp bảo vệ rất ngắn, là vẫn đủ cao để ảnh hưởng đến tiêm chủng. Ảnh hưởng này bởi MDA có thể được vượt qua một phần bằng cách dùng kháng nguyên capsit ORF2 tái tổ hợp liều cao (18). Kháng nguyên ORF2 tái tổ hợp có chiều dài đầy đủ được tiết vào môi trường bằng hệ biểu hiện baculovirut được bộc lộ trong US2009/0022749A1 (19). Hệ này làm giảm một phần các khó khăn về hiệu suất và độ sạch thấp; tuy nhiên, hệ này và các hệ sinh vật biểu hiện khác chịu tính gây miễn dịch hạn chế vốn có của các chế phẩm kháng nguyên PVC2 có chiều dài đầy đủ, và chúng có các khó khăn về giá thành do tính không lặp lại, hiệu suất thấp, và quy trình kiểm tra chất lượng phức tạp. Như vậy, việc phát triển vaccin PCV2 qua quy trình thiết kế hợp lý là cần thiết, trong suốt quy trình đó các peptit gây miễn dịch được thiết kế và được tổng hợp. Các vaccin dựa trên peptit này có thể được thiết kế để chứa các epitop tế bào B đặc hiệu cho capsit, các epitop Th 1 hiệu lực và các epitop Th 2 PCV2 thu được từ các protein PCV2 khác, và được sử dụng kết hợp như thành phần chính trong chế phẩm vaccin, để kích thích các đáp ứng kháng thể kháng capsit mà chống lại lây nhiễm PCV2 chính xác ở các con lợn con.

Việc thiết kế hợp lý các peptit gây miễn dịch cho vacxin virus bắt đầu bằng việc nhận biết các epitop có tính trội miễn dịch bằng cách lập bản đồ epitop. Lập bản đồ epitop sử dụng dãy các peptit gối nhau tương ứng với các vùng quan tâm trên protein đích của virus để nhận biết các vị trí tham gia như các yếu tố quyết định gây miễn dịch trong các tương tác với hệ miễn dịch. Thông thường nhất là lập bản đồ epitop sử dụng các peptit có chiều dài tương đối ngắn để phát hiện chính xác các yếu tố quyết định dạng thẳng. Phương pháp lập bản đồ epitop nhanh được biết như “PEPSCAN” dựa trên việc tổng hợp đồng thời hàng trăm các peptit gối nhau, được gắn với các giá đỡ ngắn. Các peptit gắn này được thử nghiệm các khả năng của chúng để liên kết với các kháng thể hoặc để kích thích tăng sinh tế bào T. Cách tiếp cận này là hiệu quả trong việc khu trú các yếu tố quyết định dạng thẳng của tế bào B và tế bào T; tuy nhiên, các epitop tế bào B có tính trội miễn dịch của virus hoặc protein đích mà cần để phát triển vacxin thường là các epitop dài gián đoạn có ái lực cao mà khó xác định bằng phương pháp PEPSCAN (20).

Việc nhận biết các peptit PCV2 có tính gây miễn dịch mang các epitop dài gián đoạn có thể được tổng hợp hóa học với các lượng từ miligram đến kilogram bằng tổng hợp peptit pha rắn được kiểm soát và lặp lại. Quy trình quy mô thương mại được kiểm soát này đối với tổng hợp các protein gây miễn dịch capsit của PCV2, cùng với phương thức dễ thực hiện mô tả đặc điểm các sản phẩm peptit như vậy, sẽ cung cấp khuôn khổ để sản xuất ở quy mô thương mại với giá thành thấp và kiểm tra chất lượng các chế phẩm vacxin PCV (21).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến các vacxin circovirus của lợn typ 2 (PCV2) chứa một peptit hoặc chế phẩm peptit trong đó peptit hoặc chế phẩm peptit được tối ưu hóa bằng cách sàng lọc khả năng phản ứng huyết thanh của các peptit capsit ngắn và dài gối nhau của PCV2. Các phát hiện từ thực nghiệm đã tìm ra nhóm các epitop tế bào B có tính trội miễn dịch ở protein capsit PCV2 như được lấy làm ví dụ theo số truy cập Ngân hàng Gen AAN62766. Cụ thể là, nhóm các epitop tế bào B có tính trội miễn dịch được thấy ở peptit có chiều dài là 154 axit amin của protein capsit PCV2 (peptit Cap1, SEQ ID

NO:1, cũng được thể hiện trong Bảng 1). Peptit này được kết hợp trong vacxin dựa trên peptit như chất gây miễn dịch chủ yếu để kích thích kháng thể bảo vệ và các đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào kháng lại lây nhiễm PCV2 và được tăng lên bằng các epitop bổ sung tế bào T lạ và các epitop tế bào T thu được từ PCV2. Các peptit gây miễn dịch này hữu dụng để bào chế các vacxin kháng PCV2.

Theo các phương án khác nhau, sáng chế đề cập đến các phương pháp sản xuất peptit như vậy, chế phẩm peptit và các vacxin kích thích đáp ứng miễn dịch có thể bảo vệ các con lợn con kháng lại lây nhiễm PCV2, và để sản xuất các kit chẩn đoán phát hiện lây nhiễm PCV2.

Theo các phương án khác nhau, sáng chế đề cập đến các chế phẩm vacxin chứa peptit Cap1 PCV2 được thiết kế (SEQ ID NO: 1), và các chất tương đồng và tương tự của nó, thu được từ protein capsit ORF2. Peptit Cap1 PCV2 trong các chế phẩm này ưu tiên là, nhưng tùy ý, liên kết với epitop tế bào T hỗ trợ tổ hợp nhân tạo (SEQ ID NO: 2, cũng được thể hiện trong Bảng 1) để tăng cường tính tạo miễn dịch tế bào B của nó. Peptit Cap1 PCV2 có thể cũng được trộn tùy ý với hỗn hợp các peptit ORF1 (các SEQ ID NO: 3 và 4) và ORF3 (SEQ ID NO: 5) của PCV2, chứa nhóm các epitop Th PCV2 (cũng được thể hiện trong Bảng 1). Các chế phẩm vacxin PCV2 dựa trên peptit như vậy kích thích các đáp ứng kháng thể đặc hiệu PCV2 bảo vệ kháng lại lây nhiễm PCV2 ở các lợn con, bao gồm các đáp ứng có thể có các kháng thể nhận được từ cơ thể mẹ (maternally derived antibodies, MDA) mà các kháng thể này có thể ảnh hưởng đến tiêm chủng. Các vacxin dựa trên peptit được thiết kế như vậy bao gồm các chế phẩm peptit như các chất gây miễn dịch có thể được tổng hợp theo cách hóa học với các quy mô miligram đến kilogram cho ứng dụng công nghiệp, và kiểm soát chất lượng dễ dàng.

Hơn nữa, các phương án khác theo sáng chế cũng đề xuất các tá dược và/hoặc các chất dẫn thuốc và các thành phần khác thường được kết hợp với các chế phẩm vacxin.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1A thể hiện cơ chế để phát hiện các kháng thể đối với protein capsit PCV2 liên kết với capsit phía trong nhân các tế bào dòng tế bào HTK đồng chuyển nhiễm bằng miễn dịch huỳnh quang theo một phương án theo sáng chế. Hình này thể hiện các tế bào HTK bị lây nhiễm với virus bệnh đậu bò tái tổ hợp T7 polymeraza (T7/vac) (22) và đồng chuyển nhiễm với plasmid pCR-orf2 bằng lipofectamin™ (Invitrogen). Protein capsit tái tổ hợp vận chuyển đến nhân sau khi nó được dịch mã (23). Các kháng thể kháng capsit, theo một phương án theo sáng chế, trở nên liên kết với nhân các tế bào chủ HTK bị chuyển nhiễm, trong đó chúng được phát hiện bằng miễn dịch huỳnh quang của kháng thể thứ cấp được đánh dấu. Phương pháp này có khả năng phát hiện các kháng thể đối với protein capsit PCV2 đích thực với độ đặc hiệu cao qua biểu hiện ngắn của protein capsit PCV2 có chiều dài đầy đủ trong các tế bào nhân thực HTK, được thực hiện bởi vùng khởi đầu phiên mã T7 của tế bào nhân sơ.

Fig. 1B thể hiện thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang (IFA) được thực hiện theo cơ chế được mô tả trong Fig. 1A. Các tế bào dòng tế bào HTK đồng chuyển nhiễm với các kháng thể đối với protein capsit PCV2 liên kết với capsit phía trong nhân được phát hiện.

Fig. 2 thể hiện tính gây miễn dịch ở các con lợn con được nuôi trong trang trại thông thường bị bệnh lây nhiễm PCV2 địa phương mà được gây miễn dịch bằng tám chế phẩm vaccin PCV2 dựa trên peptit Cap1 và các liều như được mô tả trong Bảng 5. Tính gây miễn dịch được đánh giá bằng ELISA dựa trên peptit Cap1 PCV2 (hiệu giá Log_{10}).

Fig. 3A là hình ảnh thận của lợn không tiêm chủng bị lây nhiễm PCV2. Các thương tổn được đặt trong dấu ngoặc (*).

Fig. 3B là hình ảnh các thận từ lợn không bị lây nhiễm được tiêm chủng, một thận được cắt (trái), một thận nguyên vẹn (phải). Ánh sáng phản chiếu từ đèn được đặt trong dấu ngoặc (**).

Mô tả chi tiết sáng chế

Các kháng nguyên peptit có thể phát hiện các đáp ứng miễn dịch và các kháng nguyên peptit nhất định có thể cũng kích thích các đáp ứng miễn dịch. Nhiều kháng nguyên peptit có thể được sử dụng để phát hiện các đáp ứng miễn dịch nhạy và đặc hiệu nhưng phần lớn chúng thường không hoạt động bởi chính chúng như các chất gây miễn dịch. Các peptit gây miễn dịch là lớp các kháng nguyên peptit đặc biệt mà có thể được sử dụng để kích thích các đáp ứng miễn dịch cũng như phát hiện chúng. Theo một phương án theo sáng chế, các kháng nguyên peptit trong vacxin PCV2 là các peptit gây miễn dịch có cả các epitop tế bào B và tế bào T hỗ trợ mà cùng hoạt động để kích thích tạo ra các đáp ứng miễn dịch bảo vệ, ngoài khả năng phát hiện các đáp ứng miễn dịch đối với lây nhiễm PCV2.

Một phương pháp để nhận biết các epitop tế bào B dựa trên bộ các peptit có các chiều dài khác nhau lồng và gối nhau, thường nằm trong khoảng từ 20 đến 60 gốc hoặc dài hơn. Các peptit dài hơn này được tổng hợp bằng các chuỗi tổng hợp khó trong tổng hợp độc lập peptit pha rắn, hơn là bằng các tổng hợp PEPSCA nhanh và đồng thời. Sau đó, bộ các peptit lồng và gối nhau tạo ra có thể được sử dụng trong các nghiên cứu liên kết kháng thể và các miễn dịch thực nghiệm để nhận biết các peptit dài mà thể hiện tốt nhất các yếu tố quyết định có tính trội miễn dịch, bao gồm các epitop tế bào B có cấu hình gián đoạn. Phương pháp này được khai thác để chọn lọc yếu tố quyết định không phải dạng thẳng trên CD4 mà được sử dụng trong vacxin để phong bế liên kết bằng glycoprotein gp120 của HIV (24), và để thiết kế kháng nguyên peptit hiệu lực từ vùng vòng G-H của protein VP1 của virus gây bệnh lở mồm long móng (25).

Một phương án theo sáng chế đề xuất các peptit capsit PVC2 được mã hóa bởi ORF2 mà bao gồm 154 đơn phân (SEQ ID NO: 1, cũng được thể hiện trong Bảng 1) có nhóm các epitop tế bào B để nhận biết tốt nhất kháng thể. Các peptit có tính kháng nguyên này được nhận biết từ thực nghiệm và được tối ưu hóa bằng cách sử dụng các mẫu huyết thanh của các con lợn con bị lây nhiễm PCV2 và dạng thử nghiệm miễn dịch ELISA. Dạng thử nghiệm miễn dịch bất kỳ có thể thích hợp với pha bắt giữ kháng thể chứa các kháng nguyên peptit, ví dụ, ELISA, có thể được sử dụng để phát hiện và

định lượng các kháng thể liên kết với đoạn đặc biệt của protein capsit PCV2 trong máu, huyết thanh, hoặc mẫu huyết tương của lợn bị lây nhiễm PCV2.

Theo một phương án cụ thể, peptit có tính kháng nguyên PCV2 được tối ưu hóa có khoảng 154 axit amin (SEQ ID NO: 1), tương ứng các gốc axit amin 47-202 của protein PCV2 có chiều dài đầy đủ, thể hiện các vị trí gây miễn dịch và có tính kháng nguyên của capsit PCV2 mà là hữu dụng nhất cho cả việc tạo ra các kháng thể bảo vệ bằng tiêm chủng và việc phát hiện các kháng thể cho chẩn đoán bằng ELISA. Peptit capsit có tính kháng nguyên và gây miễn dịch cao được nhận biết trong bộ sưu tập gồm hơn 50 peptit gộp nhau có chiều dài từ 20 đến 170 gốc mà được thiết kế, được tổng hợp và được thử nghiệm các tính phản ứng đối với nhóm các huyết thanh dương tính với PCV2 của các con lợn con bị lây nhiễm. Trong số hơn 50 kháng nguyên peptit ứng viên được thử nghiệm, peptit có tính kháng nguyên Cap1 PCV2 (SEQ ID NO. 1), được phát hiện là có nhóm các epitop tế bào B có tính trội miễn dịch và có tính kháng nguyên đáng kể và ổn định nhất đối với nhóm huyết thanh dương tính với PCV2. Peptit Cap1 cũng được chứng minh là có tính gây miễn dịch cao khi được thử nghiệm trong các thử nghiệm vacxin chứa trình tự peptit này. Việc sản xuất và sử dụng các vacxin chứa peptit Cap1 PCV2 có tính kháng nguyên/gây miễn dịch (ví dụ, SEQ ID NO: 1) là trong phạm vi các phương án ví dụ khác nhau theo sáng chế.

Các phương án cụ thể theo sáng chế về peptit Cap1 PCV2 có tính kháng nguyên/gây miễn dịch được xác định thêm như các chất tương đồng chức năng miễn dịch có SEQ ID NO: 1 mà có các trình tự tương ứng và các yếu tố cấu hình từ các chủng PCV2 đột biến và biến thể. Các peptit có tính kháng nguyên tương đồng Cap1 PCV2 có các gốc axit amin tương quan với các vị trí khoảng 47-202 ở protein capsit của các chủng biến thể bắt nguồn từ PCV2. Các chất tương đồng như vậy được dễ dàng chứng minh qua các chương trình sắp xếp thẳng hàng trình tự như ClustalW (được tạo ra bởi Julie D. Thompson, Toby Gibson of European Molecular Biology Laboratory, Germany và Desmond Higgins of European Bioinformatics Institute, Cambridge, UK. Algorithmic). Bảng 2 thể hiện trình tự sắp xếp thẳng hàng bằng ClustalW của mười một trình tự kháng nguyên Cap1 được lấy từ các chủng PCV2 khác nhau được nhận biết bằng các số Truy cập Ngân hàng Gen. Các chủng bắt nguồn

từ PCV2 có các chất tương đồng Cap1 được sắp xếp thẳng hàng trình tự trong Bảng 2 bao gồm các virut có các dạng gen 2a, 2b, 2d, 1/2a, và các chủng khác nhau này được phân lập từ các động vật ở Đài Loan, Trung Quốc, Mỹ, Canada, Brazil, Tây Ban Nha, Đức và Đan mạch. Bảng 2 cũng đưa ra ví dụ về chất tương đồng như trình tự Cap1 bảo thủ trong đó các axit amin được ấn định vào các vị trí có thể thay đổi là các axit amin thường được sử dụng nhiều nhất vào các vị trí này. Theo một phương án, chất tương đồng có trình tự axit amin từ khoảng vị trí axit amin 47 đến khoảng vị trí axit amin 202 của protein capsit PCV2.

Các chất tương đồng theo sáng chế được xác định thêm khi có ít nhất là 80% giống hệt với SEQ ID NO: 1. Theo một phương án, chất tương đồng của chủng biến thể có ít nhất là 85% giống hệt với SEQ ID NO: 1. Theo phương án khác, chất tương đồng của chủng biến thể có ít nhất là 90% giống hệt với SEQ ID NO: 1. Theo phương án khác nữa, chất tương đồng của chủng biến thể có ít nhất là 95% giống hệt với SEQ ID NO: 1.

Các phương án khác theo sáng chế đề xuất các chất tương tự về chức năng miễn dịch của peptit có tính kháng nguyên Cap1 PCV2. Chất tương tự về chức năng miễn dịch của peptit Cap1 bao gồm các biến thể là SEQ ID NO: 1 và các chất tương đồng mà vẫn có cùng tính kháng nguyên và tính gây miễn dịch về căn bản như peptit gốc có tính kháng nguyên. Ví dụ, các biến thể là các chất tương tự về chức năng là SEQ ID NO: 1 hoặc chất tương đồng có thể có vị trí axit amin thế bảo toàn; thay đổi toàn bộ điện tích; liên kết cộng hóa trị với nhóm chức khác; hoặc các bổ sung, thêm vào, loại bỏ không đáng kể hoặc thế bảo toàn và/hoặc kết hợp bất kỳ của nó. Như vậy, các kháng thể liên kết với peptit có tính kháng nguyên Cap1 PCV2 (ví dụ, SEQ ID NO: 1) sẽ cũng liên kết với các chất tương tự về chức năng miễn dịch của peptit có tính kháng nguyên Cap1 PCV2 này với hiệu quả tương tự về căn bản. Theo một phương án, chất tương tự về chức năng có ít nhất là 50% giống hệt với SEQ ID NO: 1 hoặc chất tương đồng. Theo phương án khác, chất tương tự về chức năng có ít nhất là 80% giống hệt với SEQ ID NO: 1 hoặc chất tương đồng. Theo phương án khác nữa, chất tương tự về chức năng có ít nhất là 85% tương đồng đối với SEQ ID NO: 1 hoặc chất tương đồng. Theo phương án vẫn khác nữa, chất tương tự về chức năng có ít nhất là 90% tương

đồng với SEQ ID NO: 1 hoặc chất tương đồng.

Theo một phương án, các chất tương tự về chức năng miễn dịch của peptit có tính kháng nguyên Cap1 PCV2 bao gồm các dạng peptit có tính kháng nguyên Cap1 PCV2 mà được cải biến bằng thể bảo toàn, và bằng cách chèn thêm hoặc loại bỏ. Theo phương án này, các chất tương tự về chức năng miễn dịch có thể được cải biến từ SEQ ID NO: 1 hoặc từ chất tương đồng có SEQ ID NO: 1 bằng các cách thể bảo toàn.

Các thể bảo toàn là khi một axit amin gốc được thế bởi gốc axit amin khác có các tính chất hóa học tương tự. Ví dụ, các axit amin không phân cực (kỵ nước) bao gồm alanin, leuxin, isoleuxin, valin, prolin, phenylalanin, tryptophan và methionin; các axit amin phân cực trung tính bao gồm glyxin, serin, threonin, xystein, tyrosin, asparagin, và glutamin; các axit amin mang điện tích dương (bazo) bao gồm arginin, lysin và histidin; và các axit amin mang điện tích âm (axit) bao gồm axit aspartic và axit glutamic.

Theo phương án khác, các chất tương tự về chức năng miễn dịch có thể được cải biến bằng cách thêm các axit amin vào đầu N, đầu C, và/hoặc bằng cách chèn thêm vào giữa peptit này. Theo các phương án khác nhau theo sáng chế, các bổ sung là vào đầu N hoặc đầu C của peptit. Các bổ sung có thể là bổ sung 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20 gốc axit amin. Các bổ sung như vậy có thể cấu thành các trình tự axit amin mà không tồn tại trong capsit PCV2 và không thay đổi tính gây miễn dịch của peptit ở phần capsit PCV2. Các bổ sung không tồn tại trong capsit PCV2 bao gồm, nhưng bị giới hạn ở, các trình tự tích điện nhỏ (ví dụ, lysin-lysin-lysin), các axit amin có khả năng tạo thành các cấu trúc phân nhánh (ví dụ, εN-lysin) hoặc có khả năng tạo thành các cấu trúc vòng (ví dụ, xystein). Theo một phương án theo sáng chế, các trình tự axit amin bổ sung mà không tồn tại trong Cap1 PCV2 là 5 axit amin hoặc ít hơn. Các axit amin bổ sung có thể là các axit amin kinh điển hoặc không kinh điển hoặc hỗn hợp của nó.

Theo phương án cụ thể khác, các chất tương tự về chức năng miễn dịch có thể được cải biến bằng cách loại bỏ axit amin đầu N, đầu C, và/hoặc phần giữa peptit. Theo các phương án khác nhau, sự loại bỏ là ở đầu N hoặc đầu C của peptit. Loại bỏ

có thể là loại bỏ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20 gốc axit amin. Theo một phương án cụ thể, các trình tự axit amin loại bỏ là 10 axit amin hoặc ít hơn.

Theo phương án khác, các chất tương tự về chức năng miễn dịch của peptit có tính kháng nguyên Cap1 PCV2 bao gồm các peptit có tính kháng nguyên cap PCV2 được cải biến bằng cách thay đổi điện tích. Thay đổi điện tích như vậy có thể là kết quả của việc thế axit amin, bổ sung, hoặc loại bỏ, hoặc liên kết cộng hóa trị phân tử tích điện. Thay đổi điện tích có thể dẫn đến kết quả làm peptit bazơ hơn, axit hơn, hoặc trung tính hơn khi so với peptit này không được cải biến. Theo một phương án cụ thể, peptit được tạo ra có tính bazơ hơn bằng cách bổ sung 1-5 gốc lysin vào đầu N hoặc đầu C. Theo phương án cụ thể hơn, peptit được tạo ra có tính bazơ hơn bằng cách bổ sung 3 gốc lysin vào đầu N.

Bằng ví dụ không giới hạn, các chất tương tự về chức năng miễn dịch của peptit theo sáng chế có thể có từ 1 đến khoảng 5 axit amin bổ sung (kính điển và không kính điển) được bổ sung vào các axit amin đầu cuối. Ví dụ, trình tự Lys-Lys-Lys có thể được bổ sung vào đầu amino của peptit Cap1 PCV2 này để thay đổi điện tích.

Các peptit có thể dễ dàng được tổng hợp bằng cách sử dụng các kỹ thuật chuẩn, như phương pháp tổng hợp pha rắn Merrifield và vô số các cải biến có sẵn đối với quy trình này. Các peptit có thể cũng được tạo ra bằng cách sử dụng công nghệ ADN tái tổ hợp. Như vậy, các phân tử axit nucleic mã hóa cho peptit có tính kháng nguyên Cap1 PCV2 và các chất tương tự về chức năng miễn dịch của peptit có tính kháng nguyên Cap1 PCV2 và các chất hỗ trợ của nó được bao gồm bằng các phương án ví dụ khác nhau theo sáng chế. Các vector, đặc biệt các vector biểu hiện, chứa các phân tử axit nucleic mã hóa cho các peptit có tính kháng nguyên Cap1 PCV2 và các chất tương tự về chức năng miễn dịch cũng được bao gồm theo các phương án ví dụ khác nhau theo sáng chế. Các tế bào chủ chứa các vector cũng được bao gồm theo các phương án ví dụ khác nhau theo sáng chế.

Các phương án ví dụ khác nhau theo sáng chế cũng bao gồm các phương pháp sản xuất peptit có tính kháng nguyên Cap1 PCV2 và các chất tương tự về chức năng

miễn dịch của peptit có tính kháng nguyên Cap1 PCV2. Ví dụ, phương pháp có thể bao gồm việc ủ tế bào chủ chứa vector biểu hiện bao gồm phân tử axit nucleic mã hóa cho peptit có tính kháng nguyên Cap1 PCV2 và/hoặc chất tương tự về chức năng miễn dịch của peptit có tính kháng nguyên Cap1 PCV2 trong các điều kiện như vậy sao cho peptit Cap1 PCV2 và/hoặc chất tương tự về chức năng miễn dịch của peptit Cap1 PCV2 được biểu hiện. Phương án này có thể sử dụng các chất gây miễn dịch được kiểm soát và được xác định rõ, thu được từ các dịch dung giải hoặc các dịch tiết của các tế bào như vậy.

Một phương án theo sáng chế đề xuất các chế phẩm peptit được sản xuất bằng tổng hợp pha rắn. Chất lượng các kháng nguyên được sản xuất bằng quy trình hóa học theo phương án này được kiểm soát và được xác định và, kết quả là, tính kháng nguyên lặp lại, tính gây miễn dịch và hiệu suất có thể được đảm bảo. Hơn nữa, không có các vật liệu sinh học nguy hiểm sử dụng trong sản xuất các kháng nguyên peptit, làm giảm các nguy cơ và loại trừ nhu cầu duy trì tồn kém về mặt sinh học. Khi các chất gây miễn dịch đặc hiệu thể hiện các epitop được chọn có các nồng độ mol cao, cả tính an toàn và hiệu lực miễn dịch của vaccin sử dụng các chế phẩm peptit có tính kháng nguyên Cap1 PCV2 là được đảm bảo.

Theo một phương án, các peptit theo sáng chế được tổng hợp. Sử dụng các peptit tổng hợp Cap1 xác định làm tối thiểu các kết quả dương tính giả khi sử dụng làm kháng nguyên để phát hiện kháng thể và chẩn đoán ở các con lợn con. Sử dụng các peptit tổng hợp xác định, có các epitop tế bào B và Th đã biết, làm các chất gây miễn dịch loại trừ các đáp ứng miễn dịch PCV2 không đặc hiệu không mong muốn gây ra bởi sự có mặt của các nguyên liệu có tính kháng nguyên bắt nguồn từ các tế bào chủ bị lây nhiễm PCV2 hoặc bị lây nhiễm virus tái tổ hợp và từ các hệ biểu hiện protein tái tổ hợp mà có thể được cùng tinh sạch với virus PCV2 và/hoặc các protein tái tổ hợp, khi được sử dụng làm các thành phần gây miễn dịch trong vaccin. Ví dụ, huyết thanh của các con lợn có thể có các kháng thể đối với các tế bào chủ, hoặc đối với *Escherichia coli*, nấm men hoặc baculovirus tái tổ hợp mà sau đó phản ứng chéo với các nguyên liệu có tính kháng nguyên được sử dụng trong các thử nghiệm chẩn đoán dựa trên các kháng nguyên thu được theo cách sinh học, và các đáp ứng miễn

dịch như vậy được tạo ra bởi các vaccin có các thành phần này như chất gây miễn dịch lạ sẽ là các đáp ứng miễn dịch không bảo vệ. Ngược lại, các con lợn nhận vaccin peptit Cap1 PCV2 theo sáng chế sẽ tạo ra các đáp ứng miễn dịch trọng tâm không có các kháng thể không thích hợp và các đáp ứng miễn dịch khác đối với các protein bắt nguồn từ các tế bào chủ hoặc các vector biểu hiện, ví dụ, các protein từ *Escherichia coli*, nấm men hoặc baculovirut tái tổ hợp mà được cùng tinh sạch với các kháng nguyên PCV2 thu được theo cách sinh học.

Phương án này về các peptit tổng hợp cũng làm tối thiểu ảnh hưởng của những tạp chất được tạo ra trong sản xuất. Với các tổng hợp dài, mặc dù kiểm soát nghiêm ngặt về hiệu suất liên kết, các chất tương tự peptit cũng được sản xuất do các khả năng có thể xảy ra trong các chu trình kéo dài, bao gồm chèn thêm axit amin, loại bỏ, thế, và kết thúc sớm, như vậy làm cho nhiều chất tương tự peptit tạo ra cùng với các peptit tổng hợp đích. Tuy nhiên, các chất tương tự peptit như vậy vẫn là thích hợp trong điều chế peptit như các chất góp phần vào tính kháng nguyên và tính gây miễn dịch khi được sử dụng trong ứng dụng miễn dịch làm kháng nguyên pha rắn cho mục đích chẩn đoán miễn dịch hoặc làm chất gây miễn dịch cho mục đích tiêm chủng.

Với 25 năm kinh nghiệm về các ứng dụng miễn dịch của các peptit tổng hợp, chúng tôi thấy rằng mức biến đổi cấu trúc mà cho phép duy trì hoạt tính miễn dịch mong đợi là dễ dàng hơn nhiều mức biến đổi cấu trúc mà cho phép duy trì hoạt tính thuốc đặc hiệu bằng phân tử thuốc nhỏ hoặc các hoạt tính mong muốn và các độc tính không mong muốn thấy ở các phân tử lớn cùng được sản xuất với các thuốc thu được theo cách sinh học. Điều này giải thích tại sao các chất tương tự peptit, được thiết kế có chủ ý hoặc được sản xuất chắt chắt bởi các lỗi trong quy trình tổng hợp như hỗn hợp sản phẩm thứ cấp có trình tự loại bỏ mà có các tính chất sắc ký và miễn dịch tương tự như peptit mong đợi, thường là hiệu quả như chế phẩm peptit tinh sạch mong muốn. Các chất tương tự được thiết kế và các hỗn hợp chất tương tự không mong đợi là hiệu nghiệm miễn là quy trình QC thấy rõ là được phát triển để phát hiện cả quy trình sản xuất và quy trình đánh giá sản phẩm sao cho bảo đảm tính lặp lại và tính hiệu nghiệm các sản phẩm cuối sử dụng các peptit này.

Theo các phương án khác theo sáng chế, các peptit Th được bao gồm trong các chế phẩm vaccin. Sự có mặt của các peptit Th có thể cải thiện tính gây miễn dịch của vaccin peptit Cap1 PCV2. Các peptit Cap1 PCV2 (bao gồm các chất tương đồng và tương tự được mô tả trên đây) có thể liên kết cộng hóa trị với và/hoặc được trộn với các epitop Th.

Theo một phương án, các peptit Th có nhóm các epitop Th có tính trội miễn dịch của PCV2 từ ORF 1 và ORF 3, được mô tả là các SEQ ID NO: 3-5 (cũng được thể hiện trong Bảng 1) và không liên kết với chất gây miễn dịch Cap1, có thể được sử dụng để bổ sung tính gây miễn dịch của các vaccin peptit Cap1 PCV2. Các SEQ ID NO: 3-5 bao gồm như các peptit tự do, không có các liên kết cộng hóa trị, có thể cải thiện tính gây miễn dịch của các chế phẩm vaccin.

Theo phương án khác, các peptit Cap1 PCV2 (bao gồm các chất tương đồng và tương tự được mô tả trên đây) có thể được liên kết cộng hóa trị, có hoặc không có đoạn đệm, với peptit chứa trình tự đã biết để bao gồm epitop Th. Phương án này có thể tạo ra tính gây miễn dịch được tăng cường hơn so với các chất gây miễn dịch tương đương Cap1 không có epitop Th liên kết cộng hóa trị. Theo một phương án cụ thể, peptit bao gồm epitop Th được liên kết cộng hóa trị với đầu N và/hoặc đầu C của peptit PCV2. Theo phương án cụ thể khác, đoạn đệm có trình tự Lys-Lys-Lys-εNLys (SEQ ID NO: 7), cũng được thể hiện trong Bảng 1. Theo một phương án, peptit bao gồm epitop Th được liên kết cộng hóa trị với đầu amino của peptit Cap1 PCV2. Theo một phương án cụ thể, peptit chứa epitop Th là peptit Th tổ hợp nhân tạo có SEQ ID NO:2 (như được thể hiện trong Bảng 1) liên kết với đầu amino qua đoạn đệm Lys-Lys-Lys-εNLys, và được thể hiện là SEQ ID NO: 6 (cũng được thể hiện trong Bảng 1).

Các phương án khác nhau theo sáng chế đề cập đến các chế phẩm vaccin để bảo vệ các con lợn kháng PCV2. Theo các phương án ví dụ, vaccin này chứa kháng nguyên peptit gây miễn dịch và chất dẫn thuốc hoặc tá dược được dùng. Theo các phương án khác nhau, chế phẩm vaccin PCV2, bao gồm kháng nguyên peptit và chất dẫn thuốc hoặc tá dược được dùng trong thú y, trong đó kháng nguyên peptit bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có:

- a) từ khoảng vị trí axit amin 47 đến khoảng vị trí axit amin 202 của protein capsit PCV2;
- b) SEQ ID NO: 1;
- c) chất tương đồng của (b);
- d) chất tương tự về tính kháng nguyên và chức năng miễn dịch của (a), (b), hoặc (c);
- e) (a), (b), (c), hoặc (d) có ít nhất một axit amin thế bảo toàn, bổ sung axit amin, và/hoặc loại bỏ axit amin; và
- f) kết hợp bất kỳ của (a)-(e).

Theo một phương án của vacxin PCV2, điện tích của kháng nguyên peptit bị thay đổi bằng cách thêm vào hoặc loại bỏ 1 đến 5 axit amin. Theo phương án khác của vacxin PCV2, chất tương đồng hoặc chất tương tự về tính kháng nguyên và chức năng miễn dịch có ít nhất là 80% giống hệt với kháng nguyên có trình tự axit amin mà ở các vị trí khoảng 47-202 của protein capsit PCV2. Theo phương án đặc biệt, kháng nguyên peptit có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có các SEQ ID NO 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, và 20.

Theo phương án khác của vacxin PCV2 kháng nguyên peptit còn bao gồm epitop tế bào T hỗ trợ liên kết cộng hóa trị với đầu N hoặc đầu C của kháng nguyên peptit. Theo một phương án cụ thể, epitop tế bào T hỗ trợ liên kết cộng hóa trị với đầu amino của kháng nguyên peptit. Theo phương án cụ thể khác, epitop tế bào T hỗ trợ liên kết cộng hóa trị với kháng nguyên peptit qua đoạn đệm có ít nhất một axit amin. Theo phương án đặc biệt, epitop tế bào T hỗ trợ là SEQ ID NO: 2. Theo phương án đặc biệt khác nữa, đoạn đệm là SEQ ID NO: 7. Theo một phương án cụ thể, kháng nguyên peptit là SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 6.

Theo các phương án ví dụ khác nhau, lượng kháng nguyên peptit gây miễn dịch bất kỳ có thể được sử dụng để kích thích các đáp ứng miễn dịch ở động vật. Theo phương án đặc biệt, lượng kháng nguyên peptit nằm trong khoảng từ 0,100mg đến

100mg. Theo phương án đặc biệt khác, lượng kháng nguyên peptit nằm trong khoảng từ 1µg đến 10mg. Theo phương án khác nữa, lượng kháng nguyên peptit nằm trong khoảng từ 10µg đến 1mg.

Theo các phương án khác nhau của chế phẩm vacxin PCV2 chế phẩm còn bao gồm hỗn hợp đẳng mol của ba peptit epitop tế bào T hỗ trợ của PVC2 là các SEQ ID NO: 3, 4, và 5. Theo một phương án cụ thể, lượng hỗn hợp đẳng mol của các SEQ ID NO: 3, 4, và 5 nằm trong khoảng từ 0,100mg đến 1mg. Theo phương án cụ thể hơn, lượng hỗn hợp đẳng mol của các SEQ ID NO: 3, 4, và 5 nằm trong khoảng từ 1µg đến 100µg.

Theo các phương án ví dụ khác nhau, dạng hoặc lượng bất kỳ của chất dẫn thuốc hoặc tá dược có thể được sử dụng. Theo phương án đặc biệt, chất dẫn thuốc và tá dược là Montanit™ ISA 50V2 (chế phẩm tá dược dầu vacxin bao gồm dầu khoáng và mannit oleat để sản xuất các thể nhũ tương nước-dầu), Tween® 80 (cũng được biết như: Polysorbat 80 hoặc Polyoxyetylen (20) sorbitan monooleat), oligonucleotit CpG, và/hoặc kết hợp bất kỳ của nó.

Theo phương án cụ thể, chế phẩm vacxin PCV2, bao gồm kháng nguyên peptit có SEQ ID NO: 6 và chất dẫn thuốc hoặc tá dược được dùng trong thú y, trong đó lượng kháng nguyên peptit nằm trong khoảng từ 10µg đến 1mg.

Phương án khác theo sáng chế đề cập phương pháp bảo vệ các con lợn con là MDA dương tính PCV2 hoặc không dương tính kháng lại lây nhiễm PCV2, bao gồm dùng vacxin được thực hiện theo phương án ví dụ bất kỳ trong số các phương án như được mô tả trên đây.

Peptit Cap1 PCV2 được điều chế phù hợp với bộc lộ này có thể cũng được sử dụng để phát hiện các kháng thể PCV2 bằng cách sử dụng peptit có lượng kháng nguyên hữu hiệu trong pha bắt giữ ở thử nghiệm miễn dịch, ví dụ, trong hấp thụ miễn dịch pha rắn của các kit thử nghiệm ELISA. Phù hợp với phương án theo sáng chế, dạng thử nghiệm miễn dịch thích hợp bất kỳ có thể được sử dụng cho các đối tượng peptit. Các dạng như vậy được biết rõ bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh vực

kỹ thuật và được mô tả trong nhiều tài liệu và chủ đề miễn dịch học chuẩn, tham khảo ví dụ Harlow et al.1988 (26). Các dạng này bao gồm, trong số các dạng thử nghiệm miễn dịch đã biết rõ khác, thử nghiệm chất hấp phụ miễn dịch liên kết enzym (enzyme-linked immunoadsorbent assay, ELISA), thử nghiệm điểm miễn dịch enzym, thử nghiệm ngưng kết, thử nghiệm dạng kẹp kháng thể-peptit-kháng thể, thử nghiệm dạng kẹp peptit-kháng thể-peptit. Theo một phương án, thử nghiệm miễn dịch là ELISA bằng cách sử dụng pha rắn được phủ bằng chế phẩm peptit Cap1 PVC2.

Theo một phương án theo sáng chế, peptit có khả năng thử nghiệm huyết thanh của các con lợn nái và các con lợn cái con, lợn lợn đực và các con lợn thiến, và các con lợn con đối với lây nhiễm PCV2 bằng sàng lọc ELISA, để đánh giá huyết thanh từ các con lợn con trước tiêm chủng đối với các mức kháng thể kháng PCV2 thu được từ cá thể mẹ, và để xác định các mức các đáp ứng miễn dịch ở các con lợn con được tiêm chủng đối với vacxin sử dụng peptit có tính kháng nguyên Cap1 PCV2, protein capsit có độ dài đầy đủ, hoặc các hạt PCV2 bị bất hoạt.

Theo một phương án cụ thể, thử nghiệm miễn dịch ELISA có thể được sử dụng để thử nghiệm các mẫu máu lợn, huyết thanh hoặc huyết tương đối với sự có mặt của các kháng thể kháng PCV2 bao gồm các bước:

- i. gắn peptit Cap1 PCV2 vào giá đỡ rắn,
- ii. tiếp xúc peptit được gắn vào giá đỡ rắn này với máu lợn, huyết thanh hoặc mẫu huyết tương chứa các kháng thể, trong các điều kiện có lợi cho liên kết của kháng thể vào peptit, và
- iii. phát hiện sự có mặt của các kháng thể liên kết với peptit được gắn vào giá đỡ rắn nói trên.

Theo sử dụng được làm ví dụ của kit ELISA đối tượng, mẫu huyết thanh lợn thử nghiệm được pha loãng trong dịch pha loãng mẫu và sau đó được tiếp xúc với một hoặc nhiều peptit Cap1 PCV2 được mô tả trên đây trong khoảng thời gian và trong các điều kiện đối với các kháng thể bất kỳ, nếu có mặt, liên kết với pha rắn nhạy peptit. Sau khi loại bỏ nguyên liệu không bám (ví dụ, bằng cách rửa với đệm muối phosphat),

phức thứ cấp được tiếp xúc với các kháng thể đánh dấu cho IgG đặc hiệu ở lợn hoặc protein A, protein G, hoặc protein A/G được đánh dấu. Các kháng thể này hoặc các protein A, G hoặc A/G liên kết với phức thứ cấp để tạo phức bậc ba và, do các kháng thể thứ cấp hoặc các protein A, hoặc G hoặc A/G được đánh dấu với phân tử chỉ thị, khi là đối tượng trong các phương pháp phát hiện, phức bậc ba được phát hiện. Phân tử chỉ thị có thể là enzym, đồng vị phóng xạ, nhóm thuốc nhuộm phát quang, phân tử phát quang sinh học, phân tử phát quang hóa học, biotin, avidin, streptavidin hoặc phân tử tương tự. Đối với ELISA phân tử chỉ thị ưu tiên là enzym.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau dùng để minh họa sáng chế và không giới hạn phạm vi của sáng chế.

BẢNG 1

Các trình tự axit amin của các peptit gây miễn dịch PCV2 thu được từ các protein ORF1, ORF2 và ORF3 của PCV2, và peptit Th tổ hợp nhân tạo để tăng tính gây miễn dịch của peptit ORF2 Cap1. Các trình tự tổ hợp được làm đậm.

<u>Nhóm peptit epitop tế bào B thu được từ protein capsit ORF2 của PCV2 (peptit Cap1)</u>	
TRLSRTFGYTVKATTVRTPSWAVDMMRFNISDFVPPGGGTNKISIPFEYYRIRKVKV	(SEQ ID No.1)
EFWPCSPITQGDRGVGSTAVILDDNFVTKATALTYDPYVNYSSRHTIPQFYSHSRYF	
TPKPVLDSTIDYFQPNKRNQLWRLQTSANVDHVGLGT	
<u>Peptit Th tổ hợp nhân tạo (UBITh3)</u>	
<i>ISISEIKGVIVHKIETILF</i>	(SEQ ID No.2)
<i>TRT TR</i>	
<u>Nhóm các peptit epitop tế bào T hỗ trợ thu được từ protein Rep ORF 1 của PCV2</u>	
CHIEKAKGTDQQNKEYCSKE	(SEQ ID No.3)
KWWDGYHGEEVVVIDDFYGW	(SEQ ID No.4)
<u>Nhóm peptit epitop tế bào T hỗ trợ thu được từ protein Apo ORF3 của PCV2</u>	
PRWPHNDVYIGLPITLLHFP	(SEQ ID No.5)
<u>Nhóm peptit epitop tế bào B thu được từ protein capsit ORF2 của PCV2 (peptit Cap1) được liên kết qua đoạn đệm với peptit Th tổ hợp nhân tạo (UBITh3)</u>	
<i>ISISEIKGVIVHKIETILF-KKKεK-TRLSRTFGYTVKATTVRTPSWAVDMMRFNISDFVP</i>	(SEQ ID No.6)
<i>PGGGTNKISIPFEYYRIRKVKVE</i>	
<i>TRT TR</i>	
FWPCSPITQGDRGVGSTAVILDDNFVTKATALTYDPYVNYSSRHTIPQFYSHSRYFT	
PKPVLDSTIDYFQPNKRNQLWRLQTSANVDHVGLGT	

BẢNG 2

Sắp xếp thẳng hàng các trình tự Cap1 tương đồng từ các chủng PCV2 khác nhau và tính bảo thủ. Các vị trí có thể thay đổi được làm đậm.

Số truy cập Quốc gia*	47	130
ACC59783	US	TRLSRTFGYTIKRTTVRTPSWAVDMMRFNINDFLPPGGGSNPRSVPFYYRIRKVKVEFWPCSPITQDGRGVSSAVILDDNFV
ACQ99546	DK	TRLSRTFGYTIKRTTVKTPSWAVDMMRFNINDFLPPGGGSNPRSVPFYYRIRKVKVEFWPCSPITQDGRGVSSAVILDDNFV
ACX47360	DE	TRLSRTFGYTIKRTTVKTPSWAVDMMRFNINDFLPPGGGSNPRSVPFYYRIRKVKVEFWPCSPITQDGRGVSSAVILDDNFV
ACV53396	ES	---RTFGYTVKRTPVRTPSWAVDMMRFNINDFLPPGGGSNHRSPFYYRIRKVKVEFWPCSPITQDGRGVSSAVILDDNFV
ADI44325	CN	TRLSRTIGYTVKKTIVRTPSWAVDMMRFNINDFLPPGGGSNPLTPFYYRIRKVKVEFWPCSPITQDGRGVSSAVILDDNFV
ADD25772	CN	TRLSRTIGYTVKKTIVRTPSWAVDMMRFNINDFLPPGGGSNPLTPFYYRIRKVKVEFWPCSPITQDGRGVSSAVILDDNFV
ADB97547	CN	ARLSRTFGYTVKRTTVTPSWAVDMMRFKLLDFVPPGGGTNKISIPFYYRIRKVKVEFWPCSPITQDGRGVSSAVILDDNFV
ABW76695	BR	TRLSRTFGYTVKRTTVTPSWAVDMMRFKLLDFVPPGGGTNKISIPFYYRIRKVKVEFWPCSPITQDGRGVSSAVILDDNFV
ABI29888	US	ARLSRTFGYTVKATTVSTPSWAVDMMRFNLDLFVPPGGGTNKISIPFYYRIRKVKVEFWPCSPITQDGRGVSSAVILDDNFV
YP_003422531	CA	TRLSRTFGYTVKATTVRTPSWAVDMMRFNIDFVPPGGGTNKISIPFYYRIRKVKVEFWPCSPITQDGRGVSSAVILDDNFV
AA62766	TW	TRLSRTFGYTVKATTVRTPSWAVDMMRFNINDFVPPGGGTNKISIPFYYRIRKVKVEFWPCSPITQDGRGVSSAVILDDNFV
Bảo thủ		TRLSRTFGYTVKRTPVRTPSWAVDMMRFNINDFLPPGGGSNHRSPFYYRIRKVKVEFWPCSPITQDGRGVSSAVILDDNFV

131	200	SEQ ID NO
ACC59783	US	TKATALTYDPYVNYSSRHTITQPFYSHSRYFTPKPVLDSITIDYFQPNKNKNQLWLRLQTAGNVDHVGLGT9
ACQ99546	DK	TKATALTYDPYVNYSSRHTITQPFYSHSRYFTPKPVLDSITIDYFQPNKNKNQLWLRLQTAGNVDHVGLGT10
ACX47360	DE	TKATALTYDPYVNYSSRHTITQPFYSHSRYFTPKPVLDSITIDYFQPNKNKNQLWLRLQTSRNVVDHVGLGT11
ACV53396	ES	TKATALTYDPYVNYSSRHTITQPFYSHSRYFTPKPVLDSITIDYFQPNKNKNQLWLRLQTSRNVVDHVGLGT12
ADI44325	CN	TKANALTYDPYVNYSSRHTITQPFYSHSRYFTPKPVLDSITIDYFQPNKNKNQLWLRLQTSRNVVDHVGLGT13
ADD25772	CN	TKANALTYDPYVNYSSRHTITQPFYSHSRYFTPKPVLDSITIDYFQPNKNKNQLWLRLQTSRNVVDHVGLGT14
ADB97547	CN	PKANALTYDPYVNYSSRHTITQPFYSHSRYFTPKPVLDSITIDYFQPNKNKNQLWLRLQTSRNVVDHVGLGT15
ABW76695	BR	PKANALTYDPYVNYSSRHTITQPFYSHSRYFTPKPVLDSITIDYFQPNKNKNQLWLRLQTSRNVVDHVGLGT16
ABI29888	US	TKATAQTYDPYVNYSSRHTITQPFYSHSRYFTPKPVLDSITIDYFQPNKNKNQLWLRLQTSRNVVDHVGLGT17
YP_003422531	CA	TKATALTYDPYVNYSSRHTITQPFYSHSRYFTPKPVLDSITIDYFQPNKNKNQLWLRLQTSRNVVDHVGLGT18
AA62766	TW	TKATALTYDPYVNYSSRHTITQPFYSHSRYFTPKPVLDSITIDYFQPNKNKNQLWLRLQTSANVDHVGLGT19
Bảo thủ		TKATALTYDPYVNYSSRHTITQPFYSHSRYFTPKPVLDSITIDYFQPNKNKNQLWLRLQTSANVDHVGLGT20

*US- Mỹ, DK- Đan mạch, DE- Đức, ES- Tây ban nha, CN- Trung Quốc, BR- Brazil, CA- Canada, TW- Đài Loan

Ví dụ 1: Thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang bằng cách sử dụng protein capsit phía trong nhân các tế bào HTK đồng chuyển nhiễm để phát hiện các kháng thể đối với PCV2

Các kháng thể hướng đến kháng PCV2 có thể được phát hiện bằng miễn dịch huỳnh quang bằng cách sử dụng các tế bào HTK đồng chuyển nhiễm với protein capsit PCV2. Phương pháp này cung cấp biểu hiện ngắn của kháng nguyên capsit có độ dài đầy đủ ở PCV2 trong các tế bào HTK. Phương pháp thử nghiệm miễn dịch này cũng cung cấp biểu hiện protein capsit qua lây nhiễm virus tái tổ hợp, trong khi bảo đảm duy trì cấu hình protein capsit tự nhiên trong các giai đoạn tổng hợp và trưởng thành, cung cấp các điều kiện để phát hiện kháng thể đặc hiệu và có độ nhạy cao.

Các tế bào dòng tế bào HTK bị lây nhiễm với virus bệnh đậu bò tái tổ hợp T7 polymeraza (T7/vac) (22), và đồng chuyển nhiễm với plasmid pCR-orf2 bằng lipofectamin™ (Invitrogen) (23) theo cơ chế được minh họa trong Fig. 1A. Cụ thể là, cấu trúc plasmid pCR-orf2 biểu hiện protein capsit tự nhiên của PCV2 được điều khiển bởi vùng phiên mã T7 polymeraza được thực hiện như sau: gen ORF2A có chiều dài đầy đủ của PCV2 (từ chủng PCV2 Cyc08 ở Đài Loan; Truy cập số AAN62766 có đột biến N→S tại vị trí 77) được khuếch đại bằng phản ứng chuỗi polymeraza (polymerase chain reaction, PCR) và được nhân dòng trong vector plasmid pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen). Khả năng biểu hiện của plasmid pCR-orf2 được khẳng định bằng trình tự mã thể hiện trình tự nucleotit đầy đủ của ORF2 từ chủng PCV2 Cyc08 (23).

Các tế bào HTK được phát triển đến độ dày 80% trong các đĩa 96 giếng, bị lây nhiễm với virus bệnh đậu bò tái tổ hợp T7 polymeraza (T7/vac) (22), và sau đó đồng chuyển nhiễm với plasmid pCR-orf2 bằng lipofectamin™ (Invitrogen). Các tế bào đồng chuyển nhiễm plasmid pCR-orf2 cho thấy biểu hiện kháng nguyên capsit của PCV một cách đáng tin cậy trong nhân các tế bào HSK và như vậy là thích hợp sử dụng để bắt giữ và phát hiện các kháng thể đối với protein capsit PCV2 qua thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang (IFA).

Hiệu giá kháng thể PCV2 theo thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang (IFA).

Các đĩa có protein capsit tự nhiên của PCV2 như kháng nguyên được chuẩn bị theo đợt bằng cách phủ các tế bào HTK bị chuyển nhiễm, và được lưu giữ tại -80°C . Kháng nguyên phủ các đĩa được điều chế theo các đợt có 100 đĩa mỗi đợt để đảm bảo chất lượng kiểm tra. Các mẫu huyết thanh đầu tiên được pha loãng 50 lần trong PBS theo sau là chuỗi pha loãng 2 lần theo dãy. Đối với mỗi lần chạy thử nghiệm, cả huyết thanh đối chứng dương từ lợn SPF bị lây nhiễm PCV2 và huyết thanh đối chứng âm từ lợn SPF không bị lây nhiễm được bao gồm để công nhận giá trị biểu hiện của protein capsit bằng plasmid pCR-orf2 trong các nhân các tế bào HSK. Các mẫu huyết thanh phát các tín hiệu huỳnh quang được khu trú ở nhân (như được thể hiện trong Fig. 1B) tại các độ pha loãng lớn hơn 1:50 được ghi khi có các hiệu giá IFA >50 ; và các hiệu giá này biểu thị các động vật bị lây nhiễm PCV2 hoặc biểu thị các động vật có các kháng thể phát triển kháng PCV như kết quả tiêm chủng. Quan sát bằng IFA có thể cũng làm phân biệt dễ dàng các tín hiệu kháng thể dương tính thật từ các tín hiệu dương tính giả bằng cách phân biệt liên kết đặc hiệu của kháng thể kháng capsit khu trú trong nhân với liên kết protein không đặc hiệu.

Tất cả các mẫu huyết thanh thử nghiệm được thu từ các con lợn bị lây nhiễm tự nhiên hoặc từ các con lợn được tiêm vaccin dựa trên peptit Cap1 PCV2 được thực hiện dưới mã.

Ví dụ 2: Phương pháp ELISA phát hiện các kháng thể huyết thanh để nhận biết các con lợn bị lây nhiễm PCV2 tự nhiên và các con lợn được tiêm vaccin PCV2 dựa trên peptit Cap1

Các giếng trong các đĩa 96 giếng được phủ riêng biệt trong 1 giờ ở nhiệt độ 37°C với $100\mu\text{L}$ của từng peptit capsit PVC2, ví dụ , peptit có SEQ ID NO.:1 (Peptit Cap1 PCV2), với $2\mu\text{g/mL}$ trong đệm NaHCO_3 10mM, độ pH 9,5 nếu không được chú ý theo cách khác.

Các giếng được phủ peptit được ủ với $250\mu\text{L}$ gelatin 3% theo trọng lượng trong PBS ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ để phong bế các vị trí liên kết protein không đặc hiệu,

theo sau là ba lần rửa với PBS chứa TWEEN® 20 0,05% theo thể tích và làm khô. Huyết thanh lợn dương tính với kháng thể PCV2 theo IFA và huyết thanh đối chứng âm được pha loãng 1:20, nếu không được chú ý theo cách khác, với PBS chứa 20% huyết thanh dê bình thường theo thể tích, 1% gelatin theo trọng lượng và TWEEN® 20 0,05% theo thể tích. Một trăm microlit các mẫu pha loãng được bổ sung vào mỗi giếng trong số các giếng và cho phản ứng trong 60 phút ở nhiệt độ 37°C.

Sau đó các giếng được rửa sáu lần với TWEEN® 20 0,05% theo thể tích trong PBS để loại bỏ các kháng thể không liên kết. IgG của dê được cộng hợp với peroxidaza của cây cải ngựa kháng IgG của lợn được sử dụng như chất phát hiện đánh dấu liên kết với phức kháng thể/kháng nguyên peptit được tạo ra trong các giếng dương tính. Một trăm microlit IgG của dê được đánh dấu với peroxidaza kháng IgG của lợn tại độ pha loãng tối ưu trước đánh giá hiệu giá và trong 1% huyết thanh dê bình thường theo thể tích có TWEEN® 20 0,05% theo thể tích trong PBS, được bổ sung vào mỗi giếng và được ủ ở nhiệt độ 37°C thêm 30 phút. Các giếng được rửa sáu lần với TWEEN® 20 0,05% theo thể tích trong PBS để loại bỏ kháng thể không liên kết và phản ứng với 100µL hỗn hợp cơ chất chứa 3',3',5',5'-Tetramethylbenzidin (TMB) 0,04% theo trọng lượng và 0,12% hydrogen peroxid theo thể tích trong đệm natri xitrat thêm 15 phút. Hỗn hợp cơ chất này được sử dụng để phát hiện đánh dấu peroxidaza do tạo ra sản phẩm có màu. Các phản ứng được dừng lại bằng cách bổ sung 100µL H₂SO₄ 1,0M và mức hấp thụ tại 450 nm (A₄₅₀) được xác định.

Các độ pha loãng huyết thanh được thực hiện phù hợp với mục đích phát hiện các kháng thể PCV2 ở huyết thanh động vật: (a) để nhận biết lây nhiễm tự nhiên tiềm năng, độ pha loãng 1:20 được sử dụng, số đọc A₄₅₀ được ghi, và xây dựng kết hợp đối chứng âm nội chuẩn để tính toán loại bỏ được sử dụng; hoặc (b) để xác định các hiệu giá kháng thể ở các con lợn nhận các chế phẩm vacxin PCV2 dựa trên peptit, các huyết thanh pha loãng 10 lần từ 1:10 đến 1:10.000 được thử nghiệm, và hiệu giá huyết thanh được thử nghiệm, được biểu hiện như Log₁₀, được tính toán bằng phân tích hồi quy tuyến tính của A₄₅₀.

Việc công nhận giá trị huyết thanh ELISA dựa trên Cap1 để phát hiện lây

nhiễm PCV2 được khẳng định bằng hệ số tương quan cao (0,782 được thể hiện trong Bảng 3) giữa các kết quả đối với ELISA và đối với IFA đặc hiệu cao dựa trên capsit tự nhiên (Ví dụ 1).

Ví dụ 3: Huyết thanh đặc hiệu vị trí nhận biết các peptit capsit tối ưu để sử dụng cả trong vacxin và các ứng dụng chẩn đoán

Các trình tự hệ gen PCV2 từ trình tự công bố trước đây của chủng phân lập PCV2 1010-Stoon (2) và từ chủng Cyc08 Đài Loan được sử dụng để suy luận các trình tự protein từ các khung đọc mở, và các dữ liệu thu được từ hai trình tự ORF2 được sử dụng để thiết kế các kháng nguyên peptit ứng viên cho thử nghiệm miễn dịch. Hơn 70 peptit capsit có chiều dài các trình tự gộp nhau từ khoảng 20 đến hơn 170 axit amin được thiết kế và được tổng hợp để công nhận giá trị huyết thanh, với mục đích để nhận biết các peptit có tính kháng nguyên mà là đích để nhận biết tế bào B và tế bào T liên quan đến lây nhiễm PCV2. Sau đó, các peptit capsit có các epitop tế bào B tối ưu được nhận biết bằng quá trình công nhận giá trị huyết thanh. Phương pháp này để lập bản đồ epitop với các peptit dài và ngắn, nhận biết các epitop có cấu hình gián đoạn cũng như các epitop dạng thẳng (24, 25). Nhóm 24 huyết thanh được mô tả đặc điểm liên quan đến các tính phản ứng kháng protein capsit PCV2 bằng thử nghiệm IFA được mô tả trong Ví dụ 1 được sử dụng để công nhận giá trị huyết thanh của các peptit này. Huyết thanh được sử dụng để sàng lọc các tính kháng nguyên mạnh và ổn định của các peptit capsit gộp nhau của PVC2 mà có thể là hữu dụng để chẩn đoán và dự đoán các tính gây miễn dịch bảo vệ qua trung gian kháng thể. Các huyết thanh được sử dụng để kiến tạo nhóm phản ứng PCV2 này được thu từ các con lợn trên cánh đồng được thấy là có lây nhiễm tự nhiên hoặc từ các con lợn bình thường và các con lợn SPF đã biết là không bị lây nhiễm PCV2, mỗi con có mức phản ứng kháng protein capsit PCV2 tương ứng của chúng được xác định hiệu giá bằng IFA như được thể hiện trong Bảng 3.

Bảng 3

Huyết thanh ở các con lợn con bị hoặc không bị lây nhiễm PCV2 được sử dụng để công nhận giá trị huyết thanh theo ELISA peptit Cap1 bằng tương quan với các hiệu giá IFA capsit

Mã huyết thanh lợn	Loại vật chủ	Hiệu giá IFA	ELISA peptit Cap1 (A ₄₅₀)
RS 3	SFP	< 50	0,251
RS 4	SFP	< 50	0,204
RS 6	SFP	< 50	0,134
RS 8	SFP	< 50	0,284
RS 9	SFP	< 50	0,285
RS 10	SFP	< 50	0,192
RS 12	SFP	< 50	0,179
RS 13	SFP	< 50	0,171
RS 15	SFP	< 50	0,233
NS 5	Huyết thanh bình thường	< 50	0,123
NS 6	Huyết thanh bình thường	< 50	0,140
NS 9	Huyết thanh bình thường	< 50	0,245
RS 28	Trên cánh đồng	200	0,259
RS 24	Trên cánh đồng	400	0,354
RS 25	Trên cánh đồng	800	0,528

RS 26	Trên cánh đồng	800	0,479
RS 1	SFP	1600	0,794
RS 39	Trên cánh đồng	1600	0,492
RS 7	SFP	3200	0,633
RS 16	SFP	3200	1,129
RS 42	Bị lây nhiễm PCV2	3200	3,000
RS 43	Bị lây nhiễm PCV2	3200	2,782
RS 41	Bị lây nhiễm PCV2	6400	3,000
RS 45	Bị lây nhiễm PCV2	12800	2,657
Hệ số tương quan		0,782	

Nhóm bao gồm 12 huyết thanh lợn IFA dương tính với PCV2 (hiệu giá IFA>1:50) và 12 huyết thanh lợn IFA âm tính với PCV2 (hiệu giá < 1:50) được sử dụng để công nhận giá trị huyết thanh theo ELISA dựa trên peptit Cap1 PCV2 (SEQ NO: 1). Huyết thanh được pha loãng 1:21 để thử nghiệm ELISA. Hệ số tương quan 0,782 được thấy giữa các hiệu giá IFA và các số đọc A_{450} từ ELISA dựa trên peptit.

Trong số các peptit gộp nhau, các peptit ngắn chứa khoảng 20 axit amin được tổng hợp bởi máy tổng hợp peptit tự động Applied BioSystems Inc. Model 433 (Lexington, KY); và các peptit dài hơn chứa khoảng từ 25 cho đến khoảng 170 axit amin được tổng hợp bằng cách sử dụng Máy tổng hợp Peptit Applied BioSystems các Model 430A, 431 và 433, bằng cách sử dụng hóa học Fmoc.

Mỗi peptit được sản xuất bằng cách tổng hợp độc lập trên giá đỡ pha rắn, với sự bảo vệ Fmoc đối với đầu cuối và các nhóm bảo vệ mạch bên của các axit amin ba chức năng. Các peptit hoàn chỉnh được cắt từ giá đỡ rắn và các nhóm bảo vệ mạch bên

được loại bỏ bằng axit trifluoroacetic 90%. Các điều chế peptit tổng hợp được mô tả đặc điểm đối với chế phẩm chính xác theo sắc ký khối phổ giải hấp lazer được chất nền trợ giúp phụ thuộc thời gian bay (Matrix-Assisted Laser Desorption Time-Of-Flight (MALD-TOF) Mass Spectrometry), và đối với nội dung bao gồm đặc điểm tổng hợp profile, lượng và nồng độ bằng HPLC đảo pha. Với các tổng hợp dài, mặc dù kiểm soát nghiêm ngặt hiệu suất liên kết, các chất tương tự peptit cũng được sản xuất do các khả năng có thể xảy ra trong các chu trình kéo dài, bao gồm chèn thêm, loại bỏ, thế axit amin, và kết thúc sớm, như vậy làm cho nhiều chất tương tự peptit tạo ra cùng với các peptit tổng hợp đích. Tuy nhiên, các chất tương tự peptit như vậy vẫn thích hợp trong các điều chế peptit như các chất góp phần vào tính kháng nguyên và tính gây miễn dịch khi được sử dụng trong ứng dụng miễn dịch làm kháng nguyên pha rắn cho mục đích chẩn đoán miễn dịch hoặc làm chất gây miễn dịch cho mục đích tiêm chủng. Thông thường, các chất tương tự peptit như vậy, được thiết kế có chủ ý hoặc được tạo ra qua quy trình tổng hợp như hỗn hợp các sản phẩm thứ cấp, thường có hiệu lực như chế phẩm peptit tinh sạch mong muốn, miễn là quy trình QC thấy rõ là phát triển để phát hiện cả quy trình sản xuất và quy trình đánh giá sản phẩm để bảo đảm tính lặp lại và tính hiệu quả các sản phẩm cuối sử dụng các peptit này.

Các tính kháng nguyên của các peptit tổng hợp có các chiều dài khác nhau được thử nghiệm đối với các đặc điểm phản ứng đầu tiên với nhóm huyết thanh. Các kháng thể có mặt trong nhóm huyết thanh ở các con lợn bị lây nhiễm PCV2 tự nhiên tiếp sau là xu hướng tăng các tính phản ứng đối với các peptit capsit PVC2 có các chiều dài tăng. Kết quả là các dữ liệu sàng lọc huyết thanh lớn được yêu cầu với huyết thanh ở nhóm thấp hơn trong Bảng 3, peptit capsit dài được chỉ rõ như “Cap1” (SEQ ID NO: 1) có chiều dài là 154 axit amin, cung cấp ELISA nhạy khác thường. Peptit Cap1 cũng truyền tính đặc hiệu cao cho ELISA này như được thể hiện ở nhóm cao hơn của Bảng 3 bởi các tính phản ứng thấp với các huyết thanh lợn IFA âm tính được công nhận giá trị. Thật sự, các khả năng phản ứng huyết thanh nổi bật ở các con lợn bị lây nhiễm PCV chỉ liên quan đến peptit Cap1 có 154 đơn phân (SEQ ID NO. 1). Do vậy có lý để cho là phần lớn các khả năng phản ứng huyết thanh hiện diện ở các con lợn bị lây nhiễm PCV2 là do các kháng thể nhận biết nhóm các epitop tế bào B mà chỉ

có mặt trên peptit dài. Hơn nữa, tính kháng nguyên trội miễn dịch bất ngờ của 154 đơn phân là phù hợp với peptit có chiều dài thể hiện bề mặt tiếp xúc lớn trên protein capsit mà thể hiện sự tiếp tục của các epitop dài liên tiếp và không liên tiếp. Các epitop này bao gồm các epitop tế bào B mà liên kết với các epitop tế bào T hỗ trợ (T helper, Th) cần thiết để kích thích các đáp ứng kháng thể ở tế bào B.

Ví dụ 4: Các chuột lang gây miễn dịch bằng các vacxin được tạo ra với peptit Cap1 PCV2 để đánh giá mức gây miễn dịch đầu tiên và tương quan giữa các hiệu giá kháng thể trong các vacxin theo ELISA dựa trên peptit Cap1 và IFA dựa trên capsit tự nhiên

Gây miễn dịch chuột lang

Theo sử dụng các vacxin theo sáng chế được làm ví dụ, các vacxin có các peptit làm các chất gây miễn dịch chứa peptit Cap1 có tính kháng nguyên không liên kết với epitop Th lạ (ví dụ SEQ ID NO: 1) hoặc liên kết cộng hóa trị qua đầu amino và đoạn đệm Lys-Lys-Lys-εNLys (SEQ ID NO: 7) với epitop tế bào T hỗ trợ lạ như UBITH®3 (SEQ ID NO: 2), ví dụ SEQ ID NO: 6, được tạo thành trong các thể nhũ tương nước-dầu bằng cách sử dụng chất dẫn vacxin dầu thương mại sẵn có, Montanit ISA 50V2. Hai nhóm chuột lang được gây miễn dịch với các vacxin dựa trên peptit như được thể hiện trong Bảng 4.

Đó là nghiên cứu ban đầu được tiến hành ở các động vật nhỏ để đánh giá tính gây miễn dịch của peptit Cap1 (SEQ ID NO: 1) có và không có liên kết cộng hóa trị đối với vị trí T hỗ trợ lạ, UBITH®3 (SEQ ID NO: 2), trong chế phẩm nhũ tương nước-dầu thường được sử dụng để thu nhóm huyết thanh có các mức đáp ứng kháng thể. Peptit Cap1 không liên kết được chỉ rõ là SEQ ID NO: 1 (Bảng 1). Peptit Cap1 được liên kết tại đầu amino với vị trí T hỗ trợ lạ qua đoạn đệm được chỉ rõ là SEQ ID NO: 6 (Bảng 1). Hai nhóm thí nghiệm mỗi nhóm có ba chuột lang Duncan Hartley (chuột cái, 9 tuần tuổi, 450 gam, không có virus) được sử dụng trong nghiên cứu gây miễn dịch này của các chế phẩm vacxin Cap1 PCV2, như được thể hiện trong Bảng 4.

Bảng 4

Đánh giá tính gây miễn dịch của các vaccin Cap1 PCV2 ở các vật chủ bằng cách so sánh các hiệu giá kháng thể kháng capsit được xác định theo ELISA peptit Cap1 (Hiệu giá Log₁₀) và IFA kháng protein capsit

Nhóm	Chất gây miễn dịch	Liều	Động vật ID #	ELISA		Hiệu giá IFA
				0 tuần sau gây miễn dịch đầu tiên	4 tuần sau gây miễn dịch đầu tiên	4 tuần sau gây miễn dịch đầu tiên
				A ₄₅₀ tại 1/100	Hiệu giá Log ₁₀	
A	Cap1 PCV2 (SEQ ID NO: 1)	Đầu tiên: 25µg/0,25ml/Trong cơ Tăng cường: 25µg/0,25 ml/Trong cơ (trong ISA 50V2 1:1 thể tích/thể tích)	3963	0,050	4,108	100
			3964	0,055	3,280	
			3965	0,051	3,347	
			Trung bình	0,052	3,578	
			Độ lệch chuẩn	0,002	0,376	
B	UBIth3-KK K-εK-Cap1 PCV2 (SEQ ID NO: 6)	Đầu tiên: 25µg/0,25ml/Trong cơ Tăng cường: 25µg/0,25 ml/Trong cơ (trong ISA 50V2 1:1 thể tích/thể tích)	3957	0,053	4,349	400
			3958	0,056	4,404	
			3959	0,053	4,051	
			Trung bình	0,054	4,268	
			Độ lệch chuẩn	0,001	0,155	

Mỗi động vật được gây miễn dịch trong cơ. Đối với nhóm A, peptit Cap1 PCV2 (SEQ ID NO: 1) được sử dụng như chất gây miễn dịch tạo ra trong dạng nhũ tương nước-dầu có Montanit™ ISA 50V2 (Seppic, Paris Pháp), chế phẩm tá được dầu của mannit oleat và dầu khoáng thường được sử dụng đối với các vacxin cho lợn, được làm nhũ hóa với các thể tích bằng nhau của dung dịch peptit pha nước trong PBS. Đối với vacxin được tiêm cho nhóm B, peptit Cap1 được liên kết cộng hóa trị tại đầu amino với epitop tế bào T hỗ trợ tổ hợp nhân tạo UBITH®3 (SEQ ID NO: 2) qua đoạn đệm có trình tự Lys-Lys-Lys-εNLys (SEQ ID NO: 7) để vượt qua các epitop đích tế bào B của Cap1 PCV và epitop tế bào T UBITH®3, tạo ra peptit gây miễn dịch được chỉ rõ là SEQ ID NO: 6 (Bảng 1), và được tạo thành trong dạng nhũ tương nước-dầu như được sử dụng đối với nhóm A. Các chuột lang nhóm A và B được cho dùng các liều 25µg bằng đường trong cơ vào các tuần 0 (đầu tiên) và 2 (tăng cường). Các chuột lang được lấy máu vào tuần 0 và 4 sau gây miễn dịch đầu tiên (weeks post-initial immunization, wpi) để thử nghiệm tính gây miễn dịch ở huyết thanh bằng cả ELISA và IFA. Như được thảo luận dưới đây, vacxin có peptit gây miễn dịch không có liên kết cộng hóa trị với đoạn đệm và UBITH®3 nhân tạo (SEQ ID No:1) kích thích các đáp ứng kháng thể kháng Cap1; và, sử dụng epitop tế bào T hỗ trợ được liên kết UBITH®3, như trong SEQ ID No: 6, dẫn đến các hiệu giá kháng capsit ấn tượng hơn cho bằng chứng về tính gây miễn dịch được cải thiện, như được đánh giá bởi phương pháp thử nghiệm (Bảng 4).

Đánh giá tính gây miễn dịch

Thử nghiệm tính gây miễn dịch của các chế phẩm vacxin peptit Cap1 PCV2 thiết kế được thực hiện bằng ELISA dựa trên peptit đích bằng cách sử dụng peptit Cap1 PCV2 (SEQ ID NO: 1) như kháng nguyên pha rắn được phủ trên các giếng với 2µg/mL trong 100µL mỗi giếng. Các huyết thanh động vật thí nghiệm pha loãng theo dãy từ 1:10 đến 1:10.000 được thử nghiệm và các hiệu giá dương tính được biểu hiện như Log₁₀ của độ pha loãng tương hỗ. Các mẫu huyết thanh dương tính được dồn chung theo nhóm và các kết quả tính gây miễn dịch đối với các phần dồn chung được xác định bằng ELISA Cap1 và bằng phương pháp IFA (thử nghiệm miễn dịch huỳnh

quang). Bằng cách này, các tính gây miễn dịch theo ELISA được đánh giá bởi mức phản ứng với peptit Cap1 được so với các hiệu giá IFA được đánh giá bởi mức phản ứng đối với protein capsit PCV2 có chiều dài đầy đủ và có cấu hình tự nhiên được biểu hiện phía trong các tế bào dòng tế bào HTK (các Fig. 1A và 1B).

Kết quả

Các kết quả đối với nhóm A thể hiện là peptit Cap1 PCV2 (SEQ ID NO: 1) trong dạng nhũ tương nước-dầu là chất gây miễn dịch dựa trên chính nó, không liên kết với epitop Th nhân tạo (SEQ ID NO: 2) tại liều 25 μ g. Bổ sung epitop Th tổ hợp nhân tạo qua đoạn đệm đa lysin ước đoán là tăng năm lần tính gây miễn dịch ($4,268-3,578=0,69$ hiệu giá Log_{10}) như được phát hiện bằng ELISA. Theo tương quan dương tính với các kết quả ELISA dựa trên Cap1 mà sử dụng để công nhận giá trị ELISA Cap1, phương pháp IFA dựa trên capsit tự nhiên để xác định tính gây miễn dịch đối với các nhóm A và B cũng biểu lộ đáp ứng cải thiện của peptit PCV2 được liên kết với epitop Th nhân tạo (SEQ ID NO: 6) vượt qua đáp ứng của chính peptit Cap1 (SEQ ID NO: 1), mặc dù thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang kém chính xác hơn chỉ biểu lộ bốn lần cao hơn, 100 đối với 400, đối với chất gây miễn dịch thể khảm SEQ ID NO: 6. Tương tự, các con lợn con được gây miễn dịch với peptit Cap1 không có (SEQ ID NO: 1) hoặc có (SEQ ID NO: 6) liên kết với epitop Tế bào T hỗ trợ UBITH®3 (SEQ ID NO: 2) cũng thể hiện các đáp ứng kháng thể mạnh kháng Cap1 với các đáp ứng được cải thiện rõ rệt bằng liên kết với epitop tế bào T hỗ trợ SEQ ID NO: 2 (Ví dụ 5, Bảng 5).

Sau đó, peptit khảm SEQ ID NO: 6 gây miễn dịch hơn được thử nghiệm ở chuột lang với tính gây miễn dịch cao hơn của nó bằng cách dùng liều lượng cao hơn với tá được bổ sung. Liều ban đầu là 400 μ g, trong đó peptit gây miễn dịch được kết hợp với tá được oligonucleotit CpG (SEQ ID No: 8) (27) với lượng được mô tả trong Bảng 5, được tiêm theo sau bằng liều tăng cường là 100 μ g chất gây miễn dịch được tăng CpG vào 2 tuần sau gây miễn dịch ban đầu. Tính gây miễn dịch được thực hiện bằng quy trình tiêm chủng được tăng CpG liều cao hơn bất ngờ tạo ra tính gây miễn dịch tăng mười lần theo ELISA, và, phù hợp với mức tăng trong hiệu giá ELISA, tăng

16 lần theo IFA. Như vậy, so sánh với hiệu giá IFA của nhóm B dồn chung là 400 được thể hiện trong Bảng 4, nhóm chuột lang được gây miễn dịch bằng quy trình vacxin được tăng CpG liều cao hơn đạt đến hiệu giá IFA ấn tượng là 1600.

Ví dụ 5: Đánh giá tính gây miễn dịch của các chế phẩm vacxin peptit Cap1 PVC2 với các liều khác nhau ở các con lợn con nuôi trong trang trại thông thường

Gây miễn dịch ở lợn con

Như được thể hiện trong Bảng 5, 80 con lợn con 4 tuần tuổi, ở trang trại bình thường không có nguồn bệnh cụ thể (specific pathogen-free, SPF), được chia thành tám nhóm (mười lợn con/nhóm). Các nhóm này được gây miễn dịch trong cơ vào các tuần 0 và 4 với các vacxin được làm đồng nhất trong Montanit ISA 50V2 như các thể nhũ tương nước-dầu 1:1 (thể tích/thể tích) bao gồm 50µg peptit Cap1 (SEQ ID NO:1) và Tween® 80; hoặc 50 đến 400µg peptit Cap1 liên kết với epitop Th nhân tạo UBITH®3 (SEQ ID NO: 6). Các liều chất gây miễn dịch SEQ ID NO: 6 khác nhau được kết hợp (27) hoặc không được kết hợp với oligonucleotit CpG (SEQ ID NO: 7), trước khi được tạo thành trong các thể nhũ tương nước-dầu, khi có hoặc không có Tween® 80 (Bảng 5).

Các mẫu máu cho phân tích ELISA được thu tại thời điểm tiêm chủng đầu tiên, và tại 4 và 6 tuần sau gây miễn dịch đầu tiên. Các huyết thanh riêng được chuẩn bị và các kháng thể PCV2 được đánh giá bằng ELISA như được mô tả trong các ví dụ 2 và 3. Các huyết thanh từ mỗi nhóm được dồn chung và là đối tượng để thử nghiệm thêm ELISA.

Kết quả

Các kết quả gây miễn dịch bằng ELISA đối với các huyết thanh dồn chung được thể hiện theo nhóm trong Bảng 5 và Fig. 2. Tất cả các chế phẩm vacxin là chất gây miễn dịch thậm chí tại liều thấp là 50µg. Mỗi con lợn con trong mỗi nhóm trong số các nhóm cho các đáp ứng miễn dịch riêng có các hiệu giá ELISA là 1:1.000 hoặc cao hơn trước các tuần 4 và 6, và vượt qua 1:10.000 trước tuần 6 đối với các phần dồn chung của nhóm, với ngoại lệ là các con lợn con nhóm 8 được dùng peptit gây miễn

dịch Cap1 (SEQ ID NO: 1) không tăng tại các liều thấp là 50µg đối với cả liều đầu tiên và tăng cường.

Bảng 5

Đánh giá tính gây miễn dịch của các vacxin peptit Cap1 PCV2. Các vacxin được làm cho khác nhau bằng epitop tế bào T hỗ trợ, liều peptit, và chế phẩm tá được, được dùng cho các con lợn con nuôi trong tang trại thông thường, đánh giá bằng ELISA Cap1

Nhóm No. #	Loại Chất gây miễn dịch	Lượng chất gây miễn dịch (µg/mL)	Tá được bổ sung ^s	0 tuần sau gây miễn dịch đầu tiên (A_{450nm} tại độ pha loãng 1/100)	Các hiệu giá ELISA(Log ₁₀)	
					4 tuần sau gây miễn dịch đầu tiên	6 tuần sau gây miễn dịch đầu tiên
1	UBITh3-KKK-εK-Cap1*	Đầu tiên: 400µg/1,0mL Tăng cường: 100µg/0,25mL	CpG1 tại 1,2:1 [‡]	0,168	3,154	4,036
2	UBITh3-KKK-εK-Cap1*	Đầu tiên: 200µg/2mL Tăng cường: 200µg/2mL	0,1% Tween 80	0,104	3,705	4,734
3	UBITh3-KKK-εK-Cap1*	Đầu tiên: 200µg/2mL Tăng cường: 200µg/2mL	không	0,134	3,488	4,128
4	UBITh3-KKK-εK-Cap1*	Đầu tiên: 100µg/1mL Tăng cường: 100µg/1mL	CpG1 tại 1,2:1 [‡] và 0,1% Tween 80	0,096	3,045	4,116
5	UBITh3-KKK-εK-Cap1*	Đầu tiên: 100µg/1mL Tăng cường: 100ug/1mL	0,1% Tween 80	0,120	3,027	4,576
6	UBITh3-KKK-εK-Cap1*	Đầu tiên: 50µg/0,5mL Tăng cường: 50µg/0,5mL	0,1% Tween 80	0,090	3,603	4,203
7	UBITh3-KKK-εK-Cap1*	Đầu tiên: 50µg /0,5mL Tăng cường: 50µg/0,5mL	không	0,153	3,157	4,350

8	Cap1 [†]	Đầu tiên: 50µg /0,5mL Tăng cường: 50µg /0.5mL	0,1% Tween 80	0,104	2,901	3,554
---	-------------------	--	------------------	-------	-------	-------

[#] Huyết thanh đôn chung được sử dụng đối với mỗi nhóm

* SEQ ID NO: 6

[†] SEQ ID NO: 1

§ Tất cả các vaccin là các thể nhũ tương nước-dầu 1:1 thể tích/thể tích có peptit được hòa tan trong PBS hoặc các phức peptit/CpG được tạo thể huyền phù trong PBS như pha nước, Montanit™ ISA 50V2 như pha dầu và tá được chủ yếu, và tá được bổ sung được biểu thị.

[‡] Tỷ lệ điện tích của peptit điện tích dương:oligonucleotit điện tích âm.

Các huyết thanh của từng con lợn từ các tuần 0, 4, 6, và 10 cũng được đánh giá các kháng thể kháng capsit bằng IFA như được mô tả trong Ví dụ 1. Các hiệu giá IFA được thấy là nằm trong khoảng từ 400 đến 1600 ở phần lớn các động vật trước tuần 10 với không nhiều huyết thanh ở nhóm 3 có các hiệu giá IFA cao bất ngờ như 6400 sau khi nhận hai lần tiêm vaccin. Không có phản ứng kháng nguyên tại vị trí tiêm được thấy ở con lợn bất kỳ trong số các con lợn này.

Trong số 80 con lợn con được gây miễn dịch, tám con thấy có các kháng thể nhận được từ cơ thể mẹ (MDA) như được phát hiện bằng IFA trước khi gây miễn dịch đầu tiên vào tuần 0, như được thể hiện trong Bảng 6. MDA thường có trong các con lợn con được nuôi trong trang trại thông thường ở Đài Loan và chúng thường hoạt động ức chế các đáp ứng kháng capsit PCV. Trong tất cả tám con lợn con có MDA, các kháng thể kháng Cap1 có các hiệu giá tăng được phát hiện bằng ELISA giữa các tuần 4 và 6 bất kể các liều và các chế phẩm được dùng (Bảng 6). Như vậy, tất cả tám động vật có MDA dùng các chế phẩm vaccin Cap1 PCV2, có vaccin thành công mặc dù bị ảnh hưởng bởi sự có mặt của các kháng thể nhận được từ mẹ. Điều này được dùng như bằng chứng về bản chất được chú trọng của đáp ứng với vaccin theo sáng chế.

Các hiệu giá IFA đối với các huyết thanh miễn dịch được thu 10 tuần sau khi gây miễn dịch đầu tiên từ các động vật dương tính MDA là 26, 27, 86, và 87 có các

hiệu giá IFA không tiền lệ là 6400, 3200, 3200 và 3200, tương ứng. Các con lợn con có MDA có thể được so sánh bao gồm trong nghiên cứu vaccin PCV2 với vaccin Ft. Dodge/Wyeth (bây giờ là Pfizer Animal Health) Suvaxyn® đối với PCV2, vaccin virut bị bất hoạt, và với vaccin Boehringer Ingleheim Inglevac® CircoFLEX®, vaccin protein capsit ORF2 tái tổ hợp có độ dài đầy đủ của PCV2. Các con lợn con đáp ứng với các vaccin này có các hiệu giá IFA không phát triển vượt quá phạm vi thông thường là 50 – 100, chỉ có 5 – 10% đạt các hiệu giá IFA cho đến 400. Như vậy bản chất “chú trọng” của các đáp ứng đối với peptit gây miễn dịch Cap1 PCV2 được thiết kế để phân biệt các vaccin dựa trên peptit từ các dạng vaccin PCV2 đã có sẵn.

Bảng 6

Vaccin dùng cho các con lợn con có các kháng thể nhận được từ cơ thể mẹ (MDA) trước khi gây miễn dịch bằng các vaccin dựa trên peptit Cap1 PCV2 với các liều khác nhau.

Nhãn tai Mỗi Động vật No.	Hiệu giá IFA * 0 tuần sau gây miễn dịch đầu tiên	Liều (µg mỗi Liều)		Hiệu giá ELISA (Log ₁₀) đối với Vaccin sử dụng	
		Đầu tiên	Tăng cường	4 tuần sau gây miễn dịch đầu tiên	6 tuần sau gây miễn dịch đầu tiên
7	200	400	100	3,039	3,750
26	100	200	200	2,948	3,812
27	200	200	200	2,988	3,982
29	50	200	200	3,749	4,081
68	400	50	50	2,446	3,939
85	50	100	100	3,690	4,608
86	50	100	100	2,720	3,939
87	100	100	100	3,090	4,499

* MDA

Trong suốt thời gian nghiên cứu, tỷ lệ sống sót của 80 lợn được tiêm chủng hai lần tiêm các vaccin peptit Cap1 PCV2 khác nhau là 93% trong khi tỷ lệ sống sót của 400 lợn không tiêm chủng được ở cùng chuồng trong trang trại thông thường này là 82%. Tỷ lệ sống sót 93% đối với các vaccin là sự cải thiện lớn vượt qua tỷ lệ sống sót trung bình là 80% đối với 5000 con lợn được nuôi trong điều kiện ở khác trong trang trại thông thường này. Thiết hại dự định được giảm đáng kể này, một kết quả bất ngờ trong nghiên cứu tính gây miễn dịch này, chứng minh thêm tính hiệu lực của các vaccin PCV2 dựa trên peptit Cap1.

Tóm lại, các vaccin PCV2 peptit Cap1 thể hiện các tính gây miễn dịch rõ rệt chỉ từ liều đơn như được thể hiện bằng các hiệu giá ELISA vào tuần 4, và thể hiện các tính gây miễn dịch xuất sắc trước tuần 6 sau hai lần tiêm, với các hiệu giá IFA đạt cao như 6400 ở các động vật trong nhóm 3. Tất cả tám động vật được thấy có trước các kháng thể nhận được từ cơ thể mẹ có các đáp ứng gây miễn dịch đối với các vaccin Cap1 bất kể liều và chế phẩm chúng nhận được. Các vaccin PCV2 dựa trên peptit được thiết kế cung cấp tỷ lệ sống sót trong số các con lợn con bình thường được tiêm chủng (không có nguồn gây bệnh cụ thể) là 93% so sánh với tỷ lệ sống sót là 82% của 400 con lợn con không được tiêm chủng được ở trong cùng chuồng và so sánh với 80% sống sót của 5000 con lợn khác được ở trong các điều kiện khác trong trang trại thông thường này, như vậy cung cấp bằng chứng lợi nhuận kinh tế rõ rệt.

Ví dụ 6: Vaccin PCV2 peptit Cap1 được cải thiện cho một lần tiêm bảo vệ bằng cách bổ sung vào chế phẩm các peptit tế bào T hỗ trợ được tạo nhóm từ các protein ORF1 và ORF3 của PCV2

Tính gây miễn dịch của vaccin PCV2 peptit Cap1 được cải thiện thêm bằng cách kết hợp các peptit epitop tế bào T của PCV2 được mã hóa bởi ORF 1 và ORF 3 và được thể hiện trong Bảng 1. Các epitop này ban đầu được thử nghiệm theo Stevenson et al (12) để tạo tăng sinh tế bào T của chúng ở lợn. Peptit Cap1 PCV2 (ví dụ các SEQ ID NO: 1 hoặc 6) được trộn với tổ hợp đẳng mol của ba peptit Th ngắn của PCV2 (các SEQ ID NO.: 3, 4 và 5) với các tỷ lệ mol từ 1:1 thấp đến 1:0,1 đến 1:0,05 được tạo ra trong pha nước trước điều chế thể nhũ tương. Chế phẩm vaccin

Cap1 PCV2 được bổ sung bằng các epitop Th có tính trội miễn dịch này của PCV2 được thử nghiệm ở các con lợn con để xác định tác dụng đối với đáp ứng miễn dịch qua kích thích các đáp ứng tế bào T liên quan đến PCV2, bao gồm sản sinh xytokin, sau khi một lần tiêm vaccin.

Kết quả

Như được thể hiện trong Bảng 7, các hiệu giá IFA tăng rõ rệt được quan sát thấy ở các con lợn con được tiêm liều thấp hơn của chế phẩm vaccin Cap1 PCV2 có các peptit Th PCV2 bổ sung. Các hiệu giá IFA từ 50 đến 400 được phát triển trước tuần 4 trong nhóm 10 con lợn con được tiêm liều vaccin đơn có 50µg peptit gây miễn dịch Cap1 với UBITH®3 liên kết (SEQ ID NO: 6) được trộn với 20µg ba peptit gây miễn dịch tế bào T hỗ trợ PCV2 (các SEQ ID NO: 3, 4, 5), so sánh với các hiệu giá IFA <50 đến 50 được thấy ở các con lợn con nhóm 9 vào tuần 4 mà nhận liều vaccin đơn có 200µg chất gây miễn dịch Cap1 có SEQ ID NO: 6 không có ba peptit bổ sung gây miễn dịch Th PCV2.

Do vậy, chế phẩm vaccin bao gồm epitop tế bào B trội-peptit capsit PCV2 được tạo nhóm (SEQ ID NO: 6) khi kết hợp với hỗn hợp đẳng mol của các peptit Th có tính trội miễn dịch từ các protein PCV2 khác (các SEQ ID NO.: 3, 4 và 5) cung cấp chất gây miễn dịch dư thừa bằng cách cho phép tổng liều hàm lượng chất gây miễn dịch thấp hơn trong khi duy trì cân bằng các đáp ứng kháng thể ở tế bào B và các đáp ứng tế bào T, và bằng cách đó thực hiện các đáp ứng miễn dịch bảo vệ hiệu nghiệm chống lây nhiễm với các liều peptit gây miễn dịch thấp hơn. Các kết quả dư thừa chất gây miễn dịch rõ rệt bởi ba peptit bổ sung Th PCV cũng thu được khi chất gây miễn dịch Cap1 không có UBITH®3 liên kết (SEQ ID NO: 1) là peptit gây miễn dịch nhắm đích tế bào B trong các chế phẩm vaccin có thể so sánh khi có và không có các chất gây miễn dịch Th bổ sung (Bảng 8). Trong kết quả này, liều SEQ ID NO: 1 là 50µg với 10µg các peptit bổ sung Th có hiệu lực hơn các liều SEQ ID NO: 1 là 100 và 200µg không có ba peptit bổ sung Th. Như vậy các chế phẩm vaccin kết hợp Cap1 có hiệu lực đặc biệt khi được cung cấp như một lần tiêm vaccin liều thấp có giá thành không đắt được dự định để sử dụng khẩn cấp.

Bảng 7

Tạo các hiệu giá kháng thể IFA kháng capsit PCV2 sau khi gây miễn dịch một lần ở các con lợn con bằng các vaccin peptit Cap1 không có hoặc có các peptit epitop Th ORF1 và ORF3 của PCV2

Nhóm số	Chế phẩm vaccin	Nhận biết động vật	Hiệu giá IFA		
			0 tuần sau gây miễn dịch đầu tiên	2 tuần sau gây miễn dịch đầu tiên	4 tuần sau gây miễn dịch đầu tiên
9	200 μ g SEQ ID NO: 6 trong 2mL (thể huyền phù với ISA 50V2 1:1 thể tích/thể tích)	154-03	<50	<50	<50
		154-07	<50	50	50
		152-03	<50	<50	<50
		152-10	<50	<50	<50
		152-04	<50	<50	<50
10	50 μ g SEQ ID NO: 6 + 20 μ g các SEQ ID NOS: 3, 4 và 5 với các trọng lượng bằng nhau trong 1mL (thể huyền phù với ISA 50V2 1:1 thể tích/thể tích)	139-01	<50	<50	200
		139-02	<50	<50	50
		139-05	<50	<50	200
		139-13	<50	<50	200
		139-15	<50	<50	200
		139-03	<50	<50	400
		139-04	<50	50	200
		139-10	<50	<50	400
		139-12	<50	<50	200
		139-14	<50	<50	400

Ví dụ 7: Vaccin PCV2 peptit Cap1 được thử nghiệm khả năng tạo sự bảo vệ lợn con không bị truyền virus và gây bệnh do phơi nhiễm với lợn bị lây nhiễm PCV2

Thử nghiệm trên cánh đồng được thiết kế để đánh giá khả năng các vaccin PCV2 peptit Cap1 kích thích miễn dịch bảo vệ với các liều và các chế phẩm khác nhau. Các con lợn con không có nguồn gây bệnh cụ thể (specific pathogen-free, SPF) được phơi nhiễm với PCV2 bằng cách ở cùng các con lợn con mang lây nhiễm PCV2 mà không có nguồn gây bệnh khác được tiêm chủng với các vaccin Cap1. Các điều kiện này, được thiết kế để thử nghiệm tính dễ lây nhiễm của các con lợn chuyển gen

được nuôi đặc biệt đối với lây nhiễm bằng cách truyền PCV2 tự nhiên, là thích hợp lý tưởng để đánh giá miễn dịch bảo vệ được cung cấp bởi vacxin PCV2.

Các điều kiện chuồng đối với các động vật bị lây nhiễm PCV2 và các động vật không có mầm bệnh

Điều kiện được sử dụng cho thử nghiệm trên cánh đồng là “Trạm Động vật Chuyển gen Thử nghiệm (Transgenic Animal Testing Station, TATS)” tại Xiang Hill Ranch ở miền bắc Đài Loan. TATS được sử dụng để thử nghiệm tính an toàn ở các con lợn chuyển gen được giữ cách ly trước khi chủ tâm giải phóng vào cánh đồng. Việc này được quản lý bởi Bộ môn Thú y Động vật của Viện Công nghệ Động vật (Animal Technology Institute of Taiwan, ATIT) (23). Các phòng thí nghiệm, chuồng động vật, và thực tiễn quản lý động vật được làm đúng nguyên tắc chỉ đạo theo ISO/IEC 17025:2005 và ISO9001 (SGS TW07/03565). Các con lợn chuyển gen trong trang trại được phát hiện thường xuyên đối với tình trạng SPF bằng quan sát và các thử nghiệm thường quy đối với bệnh sốt Kinh điển Lợn, virus giả dại, hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn, bệnh dịch tả lợn cổ điển, viêm mũi teo, viêm phổi địa phương, virus gây bệnh lở mồm long móng, bệnh hồng lỵ ở lợn, bệnh ghẻ, toxoplasma và *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Phát hiện thường xuyên không thấy có bằng chứng về sự có mặt của các bệnh và các tác nhân lây nhiễm này.

Hơn nữa, thử nghiệm lây nhiễm PCV2 bằng thử nghiệm IFA phát triển gần đây được mô tả trong Ví dụ 1 đã và đang được sử dụng trong vòng hai năm vừa qua, và quần thể lợn này được thấy có lây nhiễm PCV2 lan rộng. Tỷ lệ dương tính PCV2 trong trang trại này, như được xác định bằng đánh giá huyết thanh, đạt cao đến 89,4% (47/52). Các động vật SPF khác có PCV2 chỉ như mầm bệnh trong hệ tuần hoàn.

Các điều kiện tiêm chủng và phơi nhiễm PCV2

Chọn lọc các con lợn con không có mầm bệnh từ môi trường “chỉ có PCV2” này bắt đầu bằng việc nhận biết các con lợn nái theo dõi mà đầu tiên là âm tính đối với các kháng thể PCV2 trong huyết thanh và muộn hơn trong sữa non, bằng hiệu giá IFA PCV2. Các con lợn con từ các con lợn nái có cả huyết thanh và sữa non âm tính là

thành viên thử nghiệm vào khoảng bốn tuần tuổi. Tại thời điểm này, các con lợn con không có mầm bệnh được chia ngẫu nhiên thành năm nhóm, năm con lợn con mỗi nhóm đối với các nhóm vacxin 11-13, 15 con lợn con đối với nhóm vacxin 14, và sáu con lợn con đối với nhóm đối chứng 15. Các nhóm vacxin sau đó được cho dùng các liều vacxin đầu tiên Cap1 PCV2 được mô tả trong Bảng 8 (100 hoặc 200 μ g SEQ ID NO: 1, hoặc 50 μ g SEQ ID NO: 1 + 50 μ g các SEQ ID NO: 3, 4, và 5 với các trọng lượng bằng nhau hoặc 50 μ g SEQ ID NO: 1 + 10 μ g các SEQ ID NO: 3, 4, và 5 với các trọng lượng bằng nhau) bằng cách tiêm trong cơ (intramuscular, i.m.). Vào 4 tuần sau gây miễn dịch đầu tiên (week post-initial immunization, wpi), các nhóm được tiêm các vacxin như nhau với liều tăng cường. Các đáp ứng kháng thể được phát hiện bằng IFA vào 2, 6, và 10 tuần sau gây miễn dịch đầu tiên. Các hiệu giá IFA, được thấy trong Bảng 8, là tại mức đường nền đối với tất cả các nhóm vào 2 tuần sau gây miễn dịch đầu tiên. Các đáp ứng kháng thể cao đạt được ở tất cả các nhóm tiêm chủng trước tuần 6 mặc dù tính gây miễn dịch khác nhau đối với các nhóm vào 6 và 10 tuần sau gây miễn dịch đầu tiên. Các hiệu giá đối với nhóm đối chứng giữ nguyên tại đường nền trong suốt thời gian thử nghiệm huyết thanh.

Các con lợn con không có mầm bệnh, trong cả nhóm được tiêm chủng và nhóm kiểm soát, được ở cùng trong chuồng với quần thể chung các con lợn chuyển gen “chỉ có PCV2” trong khoảng hai tháng, đặt chúng vào nguy cơ bị truyền PCV2. Vào cuối giai đoạn này, khi trọng lượng của tất cả các con lợn thí nghiệm đạt đến khoảng 120kg trọng lượng sống (tại 5 - 6 tháng tuổi), các động vật bị giết và được đánh giá bằng chứng lây nhiễm PCV2 bằng cách mổ xác.

Các triệu chứng lây nhiễm PCV2 không dễ phát hiện và nhiều thương tổn bệnh lý xuất hiện khi lây nhiễm PCV2 trong thời gian hai tháng phơi nhiễm không được phát hiện sau khi bình phục. Do vậy, quy trình mổ xác, một quy trình cung cấp chẩn đoán nhạy hơn các phương pháp thông thường trực tiếp hơn được sử dụng để đánh giá các động vật được tiêm chủng vacxin/nghiên cứu thử thách hoặc thử nghiệm trên cánh đồng đối với các triệu chứng lây nhiễm bằng mầm bệnh được truyền, được sử dụng như phương pháp để phát hiện lây nhiễm ở các động vật được tiêm chủng/được phơi nhiễm. Các đánh giá mổ xác bao gồm các quan sát các hạch bạch huyết, phổi và thận.

Bằng chứng nhỏ đối với lây nhiễm là được thấy ngoại trừ triệu chứng các thương tổn trên các thận ở các động vật đối chứng. Các nốt và vết trắng vẫn có như các triệu chứng của chứng xơ hóa trên các bề mặt thận ở các động vật không được tiêm chủng, bị lây nhiễm, như được thể hiện trong Fig. 3A (*), trong khi các triệu chứng như vậy, tạo lịch sử các thương tổn, là không có mặt trong các thận ở các con lợn được tiêm chủng mà được ghi là không có các thương tổn như được thể hiện trong Fig. 3B (vết trắng đục được thấy trong Fig. 3B là ánh sáng phản chiếu (**)).

Các kết quả bệnh học được ghi từ việc mổ xác các con lợn thí nghiệm, được thể hiện trong Bảng 9, các chấm trắng được quan sát thấy trên nang thận là dấu hiệu nổi bật của lây nhiễm trước. Thử nghiệm này được tiến hành với các chế phẩm vaccin peptit PCV2 dưới mã.

Kết quả và kết luận

Các kết quả về các hiệu giá kháng thể PCV2 theo IFA PCV2 cho cả nhóm đối chứng và nhóm thử nghiệm vaccin, Bảng 8, thể hiện các đáp ứng kháng thể tăng trong suốt thời gian ở các động vật được tiêm chủng, có các đáp ứng cao hơn trước 10 tuần sau gây miễn dịch đầu tiên. Tính gây miễn dịch của các chế phẩm vaccin PCV2 dựa trên peptit Cap1 khác nhau và tính gây miễn dịch nhất là chế phẩm được tiêm cho nhóm lớn nhất, nhóm 14.

Ba trong số sáu con lợn trong nhóm đối chứng (50%) thấy có các chấm trắng trên nang thận như các thương tổn đặc trưng tạo lịch sử lây nhiễm PCV2 (Fig. 3A), một con trong số các con lợn đối chứng có các thương tổn nhẹ và hai con có các thương tổn vừa phải. Ngược lại, chỉ hai trong số 30 con lợn được tiêm chủng (6,7%) biểu hiện các bệnh lý thay đổi, và các con này được ghi là có cả vết tích nhẹ của bệnh lý thận (Bảng 9). Hai con này chỉ được thấy trong nhóm lớn nhất các con lợn được tiêm chủng, nhóm 14 có 15 con lợn. Không hề có các thay đổi bệnh lý được chú ý đối với các hạch bạch huyết và phổi ở các con lợn được tiêm chủng, chỉ có các thương tổn thận nhẹ được chú ý đối với hai trong số các lợn tiêm vaccin. Như vậy, hiệu lực bảo vệ được chứng minh đối với nhiều chế phẩm và các liều vaccin PCV2 dựa trên peptit theo sáng chế này.

Theo bản mô tả, các tác giả không cố gắng liệt kê tường tận tất cả các biến đổi có thể. Các phương án biến đổi mà có thể không được thể hiện ở các phần cụ thể theo sáng chế, và có thể dẫn đến từ việc kết hợp các phần được mô tả khác, hoặc các phương án biến đổi không được mô tả khác đó có thể là có sẵn một phần, không được cho là sự chối bỏ các phương án thay đổi đó. Được đánh giá là nhiều phương án trong số các phương án khác không được mô tả thuộc phạm vi nguyên văn của các yêu cầu bảo hộ sau, và các phương án khác là tương đương. Hơn nữa, tất cả các tài liệu tham khảo, các công bố, các Patent Mỹ, và các công bố đơn Patent Mỹ được trích dẫn trong suốt bản mô tả này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn như chúng được trình bày đầy đủ trong bản mô tả này.

Bảng 8

Các hiệu giá kháng thể trung bình nhân theo IFA ở mỗi nhóm lợn sau khi gây miễn dịch với các vaccin peptit Cap1 có hoặc không có các peptit epitop T ORF1 và ORF2 của PCV2

Nhóm số	Loại Vaccin *†	Số động vật	Hiệu giá IFA		
			2 tuần sau gây miễn dịch đầu tiên	6 tuần sau gây miễn dịch đầu tiên	10 tuần sau gây miễn dịch đầu tiên
11	SEQ ID NO:1 200µg/2mL	5	10	48	66
12	SEQ ID NO:1 100µg/1 mL	5	10	60	105
13	50µg SEQ ID No: 1 + 50µg các SEQ ID NO: 3, 4, 5 với tỷ lệ bằng nhau/1mL	5	10	100	100
14	50µg SEQ ID No: 1 + 10µg các SEQ ID NO: 3, 4, 5 với tỷ lệ bằng nhau/1mL	15	10	127	174
15	Đối chứng	6	10	10	10

* Tất cả các chế phẩm là các thể nhũ tương nước-dầu 1:1 thể tích/thể tích với Montanit™ ISA 50V2 như tá được.

† Vaccin được tiêm hai lần trong cơ với liều đầu tiên được tiêm vào tuần 0 sau gây miễn dịch đầu tiên và liều tăng cường vào 4 tuần sau gây miễn dịch đầu tiên.

Bảng 9

Các quan sát bệnh lý PCV2 ở các con lợn thí nghiệm

Nhóm số	Loại Vaccin*	Số động vật	Động vật số	Điểm [†]
11	SEQ ID NO:1 (200µg/2mL)	5	154-03	0
			154-07	0
			152-03	0
			152-10	0
			152-04	0
12	SEQ ID NO:1 (100µg/1mL)	5	135-01	0
			135-02	0
			135-03	0
			135-10	0
			135-14	0
13	50µg SEQ ID No: 1 + 50µg các SEQ ID NO: 3, 4, 5 với tỷ lệ bằng nhau/1mL	5	135-04	0
			135-11	0
			135-12	0
			135-13	0
			135-15	0
14	50µg SEQ ID No: 1 + 10µg các SEQ ID NO: 3, 4, 5 với tỷ lệ bằng nhau/1mL	15	141-04	0
			140-11	0
			140-01	0
			140-02	1
			140-10	0
			140-12	0
			141-01	0
			141-05	0
			140-14	0
			140-03	0
			154-02	0
			154-06	0
			154-05	0
			152-02	0
			152-01	1
1-4 Tổng số		30	2/30=6,7% bị lây nhiễm	
15	Đối chứng	6	140-04	0
			139-11	2
			146-03	2
			146-11	1
			146-12	0
			146-10	0
5 Tổng số		6	3/6=50% bị lây nhiễm	

* Hai liều tiêm chủng giống nhau như được mô tả trong Bảng 8.

†Điểm: 0 = không có các thương tổn, 1 = thương tổn nhẹ, 2 = thương tổn vừa phải, 3 = thương tổn nghiêm trọng

Tài liệu tham khảo:

1. Allan GM, and Ellis JA. Porcine circoviruses: A review. J Vet Diagn Invest 2000; 12:3-14.
2. Meehan BM, McNeilly F, Todd D, Kennedy S, Jewhurst VA, Ellis JA, Hassard LE, Clark EG, Haines DM, and Allan GM. Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. J Gen Virol 1998; 79:2171-2179.
3. Roof M, Hayes P, Eichmeyer M, Nitzel G, and Schaeffer M. Use of a PCV2 immunogenic composition for lessening clinical symptoms in pigs. US 2008/0267995A1.
4. Walker IW, Konoby CA, Jewhurst VA, McNair I, McNeilly F, Meehan BM, Cottrell TS, Ellis JA, and Allan GM: Development and application of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of serum antibodies to porcine circovirus type 2. J Vet Diagn Invest 2000; 12:400-405.
5. McIntosh KA, Harding JCS, Parker S, Krakowka S, Allan G, and Ellis JA. Quantitative polymerase chain reaction for Porcine circovirus-2 in swine feces in a Porcine circovirus disease-affected commercial herd and a nonaffected commercial herd. Can Vet J 2008; 49:1189-1194.
6. Mankertz A, Caliskan R, Hattermann K, Hillenbrand B, Kurzendoerfer P, Mueller B, Schmitt C, Steinfeldt T, and Finsterbusch T. Molecular biology of Porcine circovirus: Analyses of gene expression and viral replication. Vet Microbiol 2004; 98:81-88.
7. Cheung AK. Transcriptional analysis of porcine circovirus type 2. Virology

2003; 305:168-180.

8. Nawagitgul P, Morozov I, Bolin SR, Harms PA, Sorden SD, and Paul PS. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. *J Gen Virol* 2000; 81:2281-2287.
9. Liu J, Chen I, Du Q, Chua H, and Kwang J. The ORF3 protein of porcine circovirus type 2 is involved in viral pathogenesis in vivo. *J Virol* 2006; 80:5065-5073.
10. Blanchard P, Mahé D, Cariolet R, Keranflec'h A, Baudouard MA, Cordoli P, Albina E, and Jestin A. Protection of swine against post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) by porcine circovirus type 2 (PCV2) proteins. *Vaccine* 2003; 21:4565-4575.
11. Mahé D, Blanchard P, Truong C, Arnauld C, Le Cann P, Cariolet R, Madec F, Albina E, and Jestin A. Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circoviruses and identification of immunorelevant epitopes. *J Gen Virol* 2000; 81:1815-1824.
12. Stevenson LS, Gilpin DF, Douglas A, McNeilly F, McNair I, Adair BM, and Allan GM. T lymphocyte epitope mapping of porcine circovirus type 2. *Viral Immunology*, 2007; 20:389-397.
13. Partidos CD, Stanley CM, and Steward MW. Immune responses in mice following immunization with chimeric peptides representing B and T cell epitopes of measles virus protein. *J Gen Virol* 1991; 72:1293-1299.
14. Wang CY. Artificial T helper cell epitopes as immune stimulators for synthetic peptide immunogens including immunogenic LHRH peptides. US 6,025,468.
15. Wang CY. Artificial T helper cell epitopes as immune stimulators for synthetic peptide immunogens. US 6,713,301.
16. Wang CY. Immunogenic peptide composition comprising measles virus F

protein T helper cell epitope (MVFThL-16) and N-terminus of β -amyloid peptide. US 6,906,169.

17. Sáiz JC, Rodriguez A, González M, Alonso F, and Sobrino F. Heterotypic lymphoproliferative response in pigs vaccinated with foot-and-mouth disease virus. Involvement of isolated capsit proteins. J Gen Virol 1992; 73:2601-2607.
18. Roerink F, and van Woensel P. PCV2 Vaccine. US2008/0248061A1.
19. Eichmeyer M, Nitzel G, and Schaeffer M. PCV2 immunogenic compositions and methods of producing such compositions. US2009/0022749A1.
20. Meloen RH, Amerongen AV, Hage-Van Noort M, Langedijk JPM, Posthumus WPA, Puyk WC, Plasman H, Lenstra JA, Langeveld JPM. The use of peptides to reconstruct conformational determinants; a brief review. Ann Biol Clin 1991; 49:231-242.
21. Wang CY and Walfield AM. Site-specific peptide vaccines for immunotherapy and immunization against chronic diseases, cancer, infectious diseases, and for veterinary applications. Vaccine 2005; 23:2049-2056.
22. Fuerst TR, Niles EG, Studier FW, and Moss B. Eukaryotic transient-expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1986; 83:8122-8126.
23. Chen C-M., Liu H-T, Tu C-F. Effects of PCV2 infection in a transgenic SPF pig farm in Taiwan. 13th AAAP Anim. Sci. Congr. September 22-26, 2008 Hanoi, Vietnam. Proceedings, p. 420.
24. Wang CY, Shen M, Tam G, Fang XD, Ye J, Shen F, Walfield AM, Wang JIG, Li ML, Li XM, Salas M, Shearer MH, Kennedy RC, and Hanson CV. Synthetic AIDS vaccine by targeting HIV receptor. Vaccine 2002; 21:89-97.
25. Wang CY, Shen M. Synthetic peptide vaccines for foot-and-mouth disease. US 6,107,021.

26. Harlow E and Lane D. Antibodies: A Laboratory Manual. Chapter 14 Immunoassays, pp 555-612. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY. 1988.
27. Sokoll KK. Stabilized synthetic immunogen delivery system. United States Patent Application Publication No. US 2003/0165478.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm vaccin circovirut của lợn typ 2 (PCV2) chứa kháng nguyên peptit và chất dẫn thuốc hoặc tá dược được dùng trong thú y, trong đó kháng nguyên peptit chủ yếu gồm có a) trình tự axit amin có khoảng 154 gốc có ít nhất 85% trình tự giống với SEQ ID NO: 1; b) epitop tế bào T hỗ trợ tổ hợp nhân tạo; và c) đoạn đệm khác loại tùy ý, trong đó trình tự amit amin (a) được liên kết cộng hóa trị với epitop tế bào T hỗ trợ tổ hợp nhân tạo (b) trực tiếp hoặc qua đoạn đệm khác loại tùy ý (c).
2. Chế phẩm vaccin PCV2 theo điểm 1, trong đó trình tự axit amin (a) là SEQ ID NO:1.
3. Chế phẩm vaccin PCV2 theo điểm 1, trong đó trình tự axit amin (a) được chọn từ nhóm gồm có các SEQ ID NO: 9-19 và 20.
4. Chế phẩm vaccin PCV2 theo điểm 1, trong đó điện tích của kháng nguyên peptit bị thay đổi bằng cách thêm vào hoặc loại bỏ 1 đến 5 axit amin.
5. Chế phẩm vaccin PCV2 theo điểm 1, trong đó epitop tế bào T hỗ trợ tổ hợp nhân tạo (b) liên kết cộng hóa trị với đầu amino của trình tự axit amin (a).
6. Chế phẩm vaccin PCV2 theo điểm 5, trong đó epitop tế bào T hỗ trợ tổ hợp nhân tạo (b) được liên kết cộng hóa trị với đầu amino của trình tự axit amin (a) qua đoạn đệm khác loại tùy ý (c), trong đó đoạn đệm khác loại tùy ý chứa ít nhất một axit amin.
7. Chế phẩm vaccin PCV2 theo điểm 5, trong đó epitop tế bào T hỗ trợ tổ hợp nhân tạo (b) là SEQ ID NO:2.
8. Chế phẩm vaccin PCV2 theo điểm 6, trong đó đoạn đệm khác loại tùy ý (c) là SEQ ID NO:7.
9. Chế phẩm vaccin PCV2 theo điểm 1, trong đó chế phẩm này còn chứa hỗn hợp

đẳng mol của ba peptit epitop tế bào T hỗ trợ của PCV2 là các SEQ ID NO: 3, 4, và 5.

10. Chế phẩm vaccin PCV2 theo điểm 9, trong đó tổng lượng hỗn hợp đẳng mol của các SEQ ID NO: 3, 4, và 5 nằm trong khoảng từ 1 μ g đến 100 μ g.

11. Chế phẩm vaccin PCV2 theo điểm 1, trong đó tổng lượng kháng nguyên peptit nằm trong khoảng từ 10 μ g đến 1mg.

12. Chế phẩm vaccin PCV2 theo điểm 1, trong đó chất dẫn thuốc hoặc tá dược được chọn từ nhóm gồm có thành phần tá dược dạng dầu của mannua oleat và dầu khoáng để sản xuất nhũ tương nước-trong-dầu, polyoxyetylen (20) sorbitan monooleat, và oligonucleotit CpG.

13. Chế phẩm vaccin PCV2 theo điểm 1, trong đó kháng nguyên peptit là SEQ ID NO: 6.

14. Chế phẩm vaccin PCV2 theo điểm 1, trong đó trình tự axit amin (a) có ít nhất 90% trình tự giống với SEQ ID NO: 1.

15. Chế phẩm vaccin PCV2 theo điểm 1, trong đó trình tự axit amin (a) có ít nhất 95% trình tự giống với SEQ ID NO: 1.

16. Chế phẩm vaccin PCV2 theo điểm 1, trong đó epitop tế bào T hỗ trợ tổ hợp nhân tạo (b) là SEQ ID NO: 2.

17. Chế phẩm vaccin circovirut của lợn typ 2 (PCV2) chứa: a) kháng nguyên peptit được chọn từ nhóm gồm: i) peptit nhóm epitop tế bào B có khoảng 154 gốc tương ứng với khoảng vị trí axit amin 47 đến vị trí axit amin 202 của protein capsit PCV2 có độ dài đầy đủ; và ii) peptit nhóm epitop tế bào B trong (i) được liên kết cộng hóa trị với epitop tế bào T hỗ trợ tổ hợp nhân tạo trực tiếp hoặc qua đoạn đệm khác loại tùy ý; b) hỗn hợp gồm ba peptit epitop tế bào T hỗ trợ PCV2 là SEQ ID NO: 3, 4, và 5; và c) chất dẫn thuốc hoặc tá dược được dụng trong thú y.

18. Chế phẩm vacxin PCV2 chứa kháng nguyên peptit có SEQ ID NO: 6 và chất dẫn thuốc hoặc tá dược được dụng trong thú y, trong đó lượng kháng nguyên peptit nằm trong khoảng từ 10 μ g đến 1mg.

Fig.1

Fig.1A

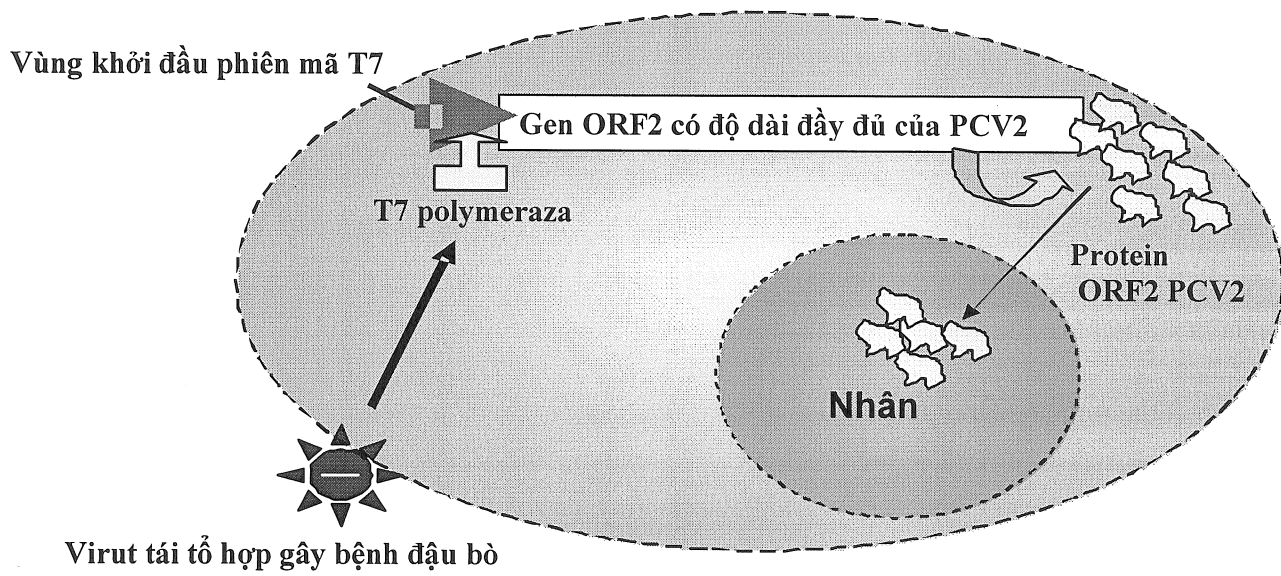


Fig.1B

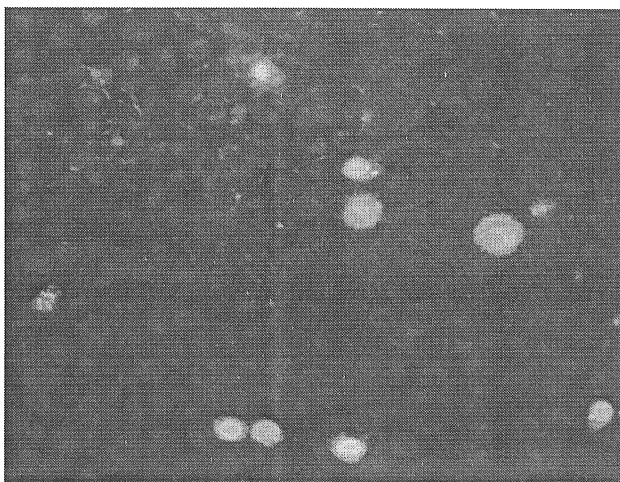


Fig.2

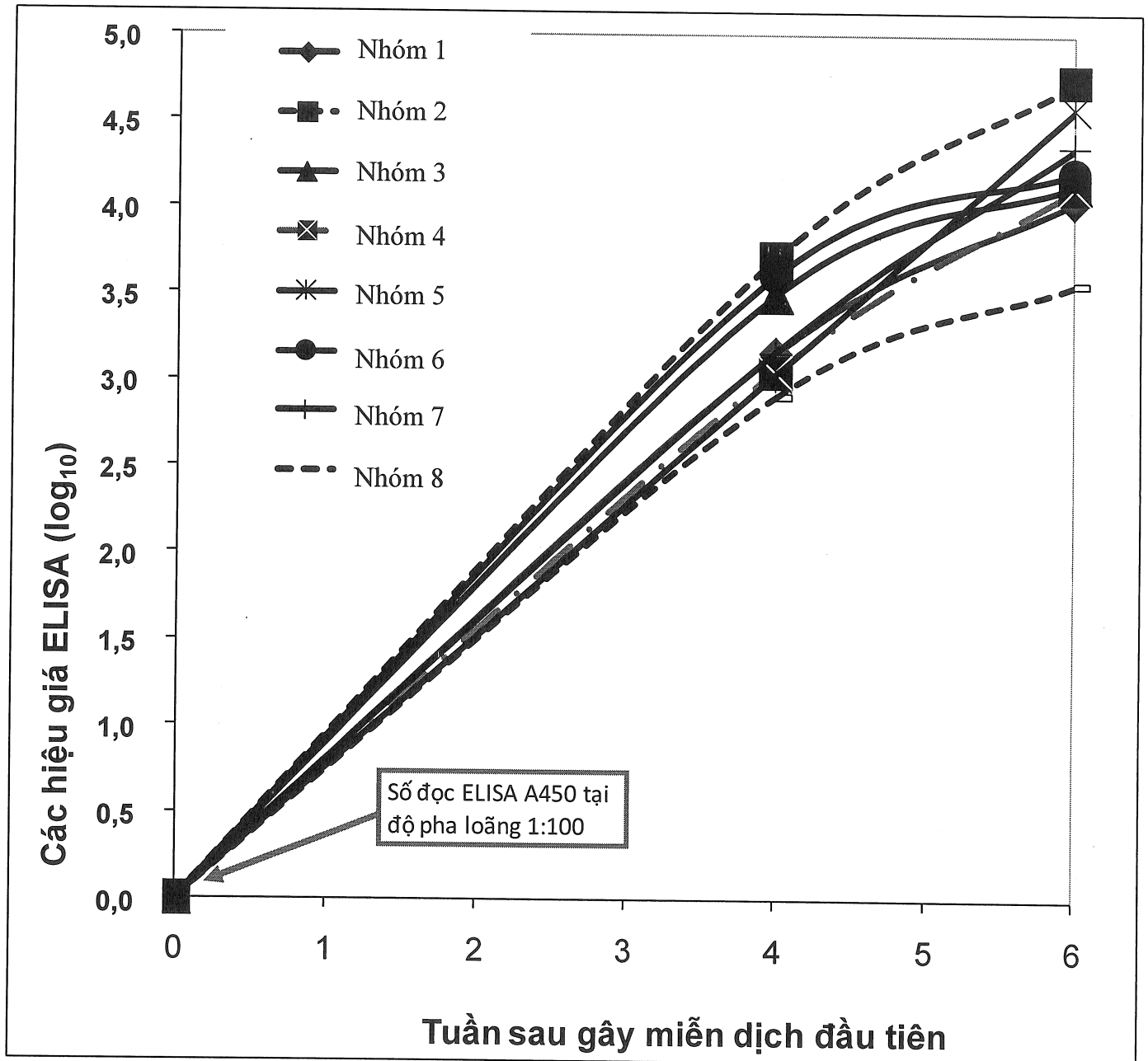


Fig.3

Fig.3A

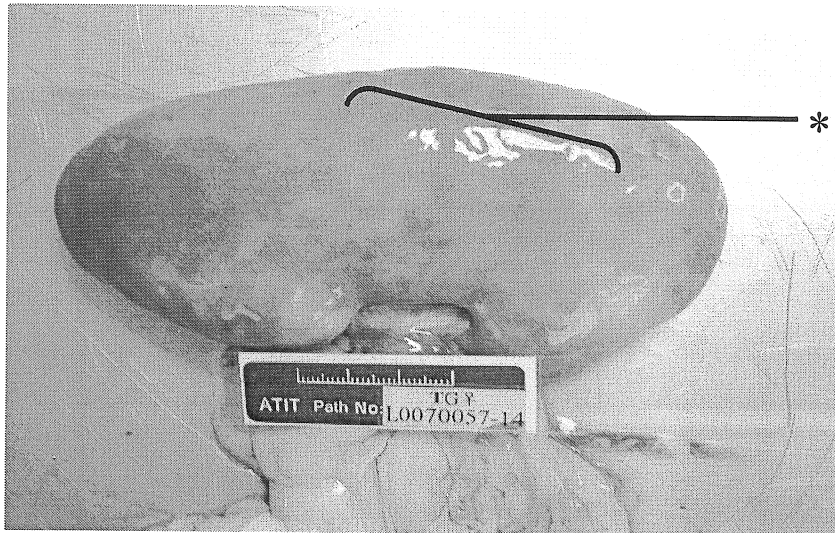
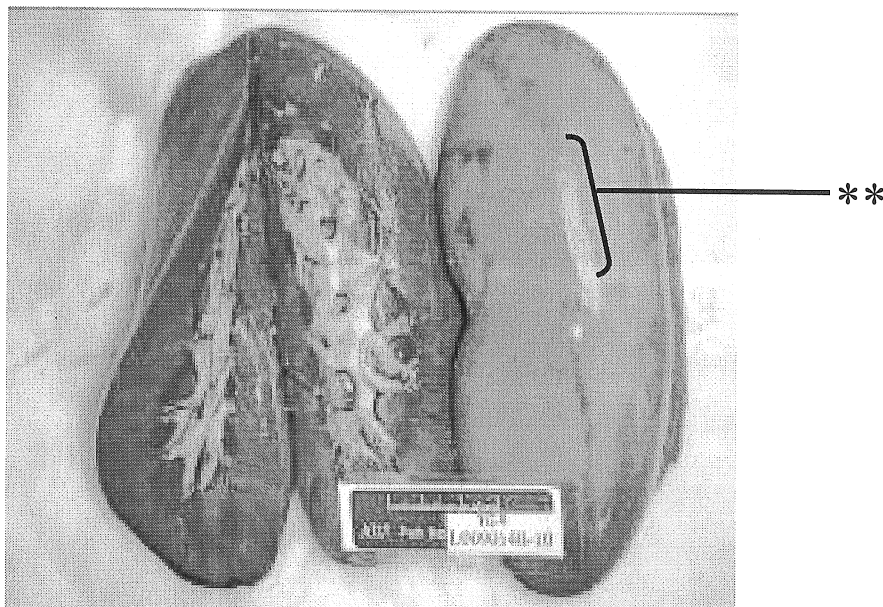


Fig.3B



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> United Biomedical Inc
Wang, Chang Yi
Wen-Jiun, Peng

<120> Chế phẩm vacxin circovirut của lợn typ 2 (PCV2) chứa kháng nguyên peptit để bảo vệ lợn con chống lại khả năng bị lây nhiễm PCV2

<130> 1004263.204WO (2029-WO)

<140> PCT/US2010/041406
<141> 2010-07-08

<160> 20

<170> Dạng Patent 3.5

<210> 1
<211> 154
<212> PRT
<213> Circovirut của lợn

<220>
<221> ĐẶC ĐIỂM KHÁC NHAU
<222> (1)..(154)
<223> Chủng Cyc08 Typ 2 từ Đài Loan

<400> 1

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

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

Phe Val Pro Pro Gly Gly Gly Thr Asn Lys Ile Ser Ile Pro Phe Glu
35 40 45

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

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

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

Asn Tyr Ser Ser Arg His Thr Ile Pro Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser

100	105	110
Arg Tyr Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Phe		
115	120	125
Gln Pro Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Ser		
130	135	140
Ala Asn Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr		
145	150	

<210> 2
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Virut sởi

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM KHÁC NHAU
 <222> (1)..(19)
 <223> Vị trí T hỗ trợ cải biến

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM KHÁC NHAU
 <222> (4)..(4)
 <223> S hoặc T

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM KHÁC NHAU
 <222> (7)..(7)
 <223> K hoặc R

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM KHÁC NHAU
 <222> (8)..(8)
 <223> G hoặc T

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM KHÁC NHAU
 <222> (12)..(12)
 <223> H hoặc T

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM KHÁC NHAU
 <222> (13)..(13)
 <223> K hoặc R

<400> 2

Ile Ser Ile Xaa Glu Ile Xaa Xaa Val Ile Val Xaa Xaa Ile Glu Thr
1 5 10 15

Ile Leu Phe

<210> 3
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Circovirut của lợn

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM KHÁC NHAU
 <222> (1)..(20)
 <223> Epitop 1 T hỗ trợ từ ORF1 của PCV2

<400> 3

Cys His Ile Glu Lys Ala Lys Gly Thr Asp Gln Gln Asn Lys Glu Tyr
 1 5 10 15

Cys Ser Lys Glu
 20

<210> 4
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Circovirut của lợn

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM KHÁC NHAU
 <222> (1)..(20)
 <223> Epitop 2 T hỗ trợ từ ORF1 của PCV2

<400> 4

Lys Trp Trp Asp Gly Tyr His Gly Glu Glu Val Val Val Ile Asp Asp
 1 5 10 15

Phe Tyr Gly Trp
 20

<210> 5
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Circovirut của lợn

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM KHÁC NHAU
 <222> (1)..(20)
 <223> Epitop 1 T hỗ trợ từ ORF3 của PCV2

<400> 5

Pro Arg Trp Pro His Asn Asp Val Tyr Ile Gly Leu Pro Ile Thr Leu
1 5 10 15

Leu His Phe Pro
20

<210> 6

<211> 177

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Nhóm peptit epitop tế bào B thu được từ protein capsit ORF2 của PCV2 (peptit Cap1) được liên kết qua đoạn đệm với peptit Th tổ hợp nhân tạo (UBITh3)

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM KHÁC NHAU

<222> (4)..(4)

<223> S hoặc T

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM KHÁC NHAU

<222> (7)..(7)

<223> K hoặc R

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM KHÁC NHAU

<222> (8)..(8)

<223> G hoặc T

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM KHÁC NHAU

<222> (12)..(12)

<223> H hoặc T

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM KHÁC NHAU

<222> (13)..(13)

<223> K hoặc R

<220>

<221> GỐC BIẾN ĐỔI

<222> (23)..(23)

<223> AMIT HÓA, (epsilonN)Lys

<400> 6

Ile Ser Ile Xaa Glu Ile Xaa Xaa Val Ile Val Xaa Xaa Ile Glu Thr
1 5 10 15

Ile Leu Phe Lys Lys Lys Lys Thr Arg Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr
20 25 30

Thr Val Lys Ala Thr Thr Val Arg Thr Pro Ser Trp Ala Val Asp Met
35 40 45

Met Arg Phe Asn Ile Ser Asp Phe Val Pro Pro Gly Gly Gly Thr Asn
50 55 60

Lys Ile Ser Ile Pro Phe Glu Tyr Tyr Arg Ile Arg Lys Val Lys Val
65 70 75 80

Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly
85 90 95

Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala
100 105 110

Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr Ser Ser Arg His Thr Ile Pro
115 120 125

Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu
130 135 140

Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu
145 150 155 160

Trp Leu Arg Leu Gln Thr Ser Ala Asn Val Asp His Val Gly Leu Gly
165 170 175

Thr

<210> 7
<211> 4
<212> PRT
<213> nhân tạo

<220>
<223> trình tự đệm nhân tạo

<220>
<221> GỐC BIẾN ĐỔI
<222> (4)..(4)
<223> AMIT HÓA, (epsilonN)Lys

<400> 7

Lys Lys Lys Lys
1

<210> 8

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligo nucleotit CpG

<400> 8

tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt

24

<210> 9

<211> 154

<212> PRT

<213> Circovirut của lợn

<300>

<308> Ngân hàng Gen/ACC59783

<309> 2008-04-21

<313> (1)..(154)

<400> 9

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

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

Phe Leu Pro Pro Gly Gly Gly Ser Asn Pro Arg Ser Val Pro Phe Glu
35 40 45

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

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

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

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

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

Gln Pro Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Ala
 130 135 140

Gly Asn Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr
 145 150

<210> 10
 <211> 154
 <212> PRT
 <213> Circovirut của lợn

<300>
 <308> Ngân hàng Gen/ACQ99546
 <309> 2010-06-28
 <313> (1)..(154)

<400> 10

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

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

Phe Leu Pro Pro Gly Gly Gly Ser Asn Pro Arg Ser Val Pro Phe Glu
 35 40 45

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

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

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

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

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

Gln Pro Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Ala
 130 135 140

Gly Asn Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr
 145 150

<210> 11
 <211> 154
 <212> PRT
 <213> Circovirut của lợn

<300>
 <308> Ngân hàng Gen/ACX47360
 <309> 2010-02-03
 <313> (1)..(154)

<400> 11

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

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

Phe Leu Pro Pro Gly Gly Gly Ser Asn Pro Arg Ser Val Pro Phe Glu
 35 40 45

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

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

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

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

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

Gln Pro Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Met Arg Leu Gln Thr Ser
 130 135 140

Arg Asn Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr
145 150

<210> 12
<211> 150
<212> PRT
<213> Circovirut của lợn

<300>
<308> Ngân hàng Gen/ACV53396
<309> 2010-03-17
<313> (1)..(150)

<400> 12

Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Val Lys Arg Thr Pro Val Arg Thr Pro Ser
1 5 10 15

Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asn Asp Phe Leu Pro Pro
20 25 30

Gly Gly Gly Ser Asn His Arg Ser Val Pro Phe Glu Tyr Tyr Arg Ile
35 40 45

Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr Gln Gly
50 55 60

Asp Arg Gly Val Gly Ser Ser Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn Phe Val
65 70 75 80

Thr Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr Ser Ser
85 90 95

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

Pro Lys Pro Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro Asn Asn
115 120 125

Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Ala Gly Asn Val Asp
130 135 140

His Val Gly Leu Gly Thr
145 150

<210> 13

<211> 154
 <212> PRT
 <213> Circovirut của lợn

<300>
 <308> Ngân hàng Gen/ADI44325
 <309> 2010-06-14
 <313> (1)..(154)

<400> 13

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

Arg Thr Pro Ser Trp Asn Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asn Asp
 20 25 30

Phe Leu Pro Pro Gly Gly Gly Ser Asn Pro Leu Thr Val Pro Phe Glu
 35 40 45

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

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

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

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

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

Gln Pro Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Thr
 130 135 140

Gly Asn Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr
 145 150

<210> 14
 <211> 154
 <212> PRT
 <213> Circovirut của lợn

<300>

<308> Ngân hàng Gen/ADD25772

<309> 2010-03-08

<313> (1)..(154)

<400> 14

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

Arg Thr Pro Ser Trp Asn Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asn Asp
20 25 30

Phe Leu Pro Pro Gly Gly Gly Ser Asn Pro Leu Thr Met Pro Phe Glu
35 40 45

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

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

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

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

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

Gln Pro Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Thr
130 135 140

Gly Asn Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr
145 150

<210> 15

<211> 154

<212> PRT

<213> Circovirut của lợn

<300>

<308> Ngân hàng Gen/ADB97547

<309> 2010-08-18

<313> (1)..(154)

<400> 15

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

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

Phe Val Pro Pro Gly Gly Gly Thr Asn Lys Ile Ser Ile Pro Phe Glu
35 40 45

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

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

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

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

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

Gln Pro Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Met Arg Ile Gln Thr Ser
130 135 140

Arg Asn Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr
145 150

<210> 16
<211> 154
<212> PRT
<213> Circovirut của lợn

<300>
<308> Ngân hàng Gen/ABW76695
<309> 2008-08-01
<313> (1)..(154)

<400> 16

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

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

Phe Val Pro Pro Gly Gly Gly Thr Asn Lys Ile Ser Ile Pro Phe Glu
 35 40 45

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

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

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

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

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

Gln Pro Asn Asn Lys Lys Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Ser
 130 135 140

Arg Asn Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr
 145 150

<210> 17
 <211> 154
 <212> PRT
 <213> Circovirut của lợn

<300>
 <308> Ngân hàng Gen/ABI29888
 <309> 2007-06-14
 <313> (1)..(154)

<400> 17

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

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

Phe Val Pro Pro Gly Gly Gly Thr Asn Lys Ile Ser Ile Pro Phe Glu
 35 40 45
 Tyr Tyr Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro
 50 55 60
 Ile Thr Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Ser Ala Ile Ile Leu Asp
 65 70 75 80
 Asp Asn Phe Val Ile Lys Ala Thr Ala Gln Thr Tyr Asp Pro Tyr Val
 85 90 95
 Asn Tyr Ser Ser Arg His Thr Ile Pro Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser
 100 105 110
 Arg Tyr Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Phe
 115 120 125
 Gln Pro Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Met Arg Leu Gln Thr Ser
 130 135 140
 Arg Asn Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr
 145 150
 <210> 18
 <211> 154
 <212> PRT
 <213> Circovirut của lợn
 <300>
 <308> Ngân hàng Gen/YP_003422531
 <309> 2010-06-28
 <313> (1)..(154)
 <400> 18
 Thr Arg Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Val Lys Ala Thr Thr Val
 1 5 10 15
 Arg Thr Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asp Asp
 20 25 30
 Phe Val Pro Pro Gly Gly Gly Thr Asn Lys Ile Ser Ile Pro Phe Glu
 35 40 45

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

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

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

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

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

Gln Pro Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Met Arg Leu Gln Thr Ser
130 135 140

Arg Asn Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr
145 150

<210> 19
<211> 154
<212> PRT
<213> Circovirut của lợn

<300>
<308> Ngân hàng Gen/AAN62766
<309> 2002-11-06
<313> (1)..(154)

<400> 19

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

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

Phe Val Pro Pro Gly Gly Gly Thr Asn Lys Ile Ser Ile Pro Phe Glu
35 40 45

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

Ile Thr Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp

[illegible]

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

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

Gln Pro Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Ser
130 135 140

Ala Asn Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr
145 150