



(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)



1-0023177

(51)⁷ **A61K 39/12**

(13) **B**

-
- | | | | | | |
|------|--|------------|------------|---------------|------------|
| (21) | 1-2012-00845 | (22) | 02.09.2010 | | |
| (86) | PCT/US2010/047654 | 02.09.2010 | (87) | WO2011/028888 | 10.03.2011 |
| (30) | 61/239,192 | 02.09.2009 | US | | |
| | 61/309,408 | 01.03.2010 | US | | |
| (45) | 25.02.2020 | 383 | (43) | 25.07.2012 | 292 |
| (73) | BOEHRINGER INGELHEIM ANIMAL HEALTH USA, INC. (US)
3239 Satellite Blvd., Duluth, Georgia 30096, United States of America. | | | | |
| (72) | KOHLER, Caroline Ann (US), ZHAO, Guosong (US), KHAZRAEINAZMPOUR, Ali (US), EICHENMUELLER, Bernd Colin (DE), EICHMEYER, Marc (US), HAIWICK, Gregory (US), SCHAEFFER, Merrill (US) | | | | |
| (74) | Công ty Luật TNHH T&G (TGVN) | | | | |
-

(54) **PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT CHẾ PHẨM KHÁNG NGUYÊN PCV-2**

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm kháng nguyên PCV-2, phương pháp sản xuất và chế phẩm sinh miễn dịch chứa chế phẩm này. Chế phẩm theo sáng chế có hoạt tính diệt virus được làm giảm.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp và chế phẩm, để làm giảm hoạt tính diệt virus của các chế phẩm mà thông thường thể hiện mức độ nào đó của hoạt tính diệt virus. Bằng cách sử dụng phương pháp theo sáng chế, hoạt tính diệt virus của các chế phẩm này có thể được làm giảm so với hoạt tính diệt virus của chế phẩm mà không bao gồm các bước theo sáng chế. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất chế phẩm kháng nguyên circovirus typ II ở lợn (Porcine Circovirus Type II - PCV-2) khác biệt ở chỗ chúng không thể hiện hoặc thể hiện tương đối ít hoạt tính diệt virus so với các chế phẩm đã biết trong tình trạng kỹ thuật bằng cách sử dụng các phương pháp phát hiện hiện có, và cụ thể, so với các chế phẩm không được sản xuất bằng phương pháp theo sáng chế. Sáng chế còn đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch mới, ưu tiên chế phẩm chứa PCV-2 được sản xuất theo phương pháp theo sáng chế, ưu tiên được đặc trưng bởi hoạt tính giảm hoặc không có hoạt tính diệt virus so với các chế phẩm so sánh được được mô tả trong tình trạng kỹ thuật. Theo một khía cạnh khác, sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch chứa kháng nguyên PCV-2 tinh chế, ưu tiên kháng nguyên PCV-2 tinh chế có tính sinh miễn dịch cải thiện.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Circovirus typ 2 ở lợn (PCV-2) là virus ADN nhỏ (đường kính 17-22nm), hai mươi mặt, không vỏ, mà chứa hệ gen dạng vòng sợi đơn. PCV-2 có mức độ đồng nhất trình tự xấp xỉ 80% so với circovirus typ 1 ở lợn (PCV-1). Tuy nhiên, ngược lại với PCV-1 mà thường không độc hại, lợn bị nhiễm PCV-2 thể hiện hội chứng được gọi chung là Hội chứng suy giảm đa hệ thống sau khi cai sữa (Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome - PMWS). PMWS có đặc điểm lâm sàng là suy mòn, da xanh xao, không phát triển, suy hô hấp, tiêu chảy và vàng da. Ở một số lợn bị nhiễm, sự kết hợp của tất cả các triệu chứng sẽ rõ ràng trong khi một số khác sẽ chỉ có một hoặc hai trong số các triệu chứng này. Trong quá trình mổ tử thi để khám nghiệm, những tổn thương vi mô và vĩ mô cũng xuất hiện trên nhiều mô và cơ quan, với các cơ quan bạch huyết là vị trí tổn thương nhiều nhất. Sự liên hệ chặt chẽ đã được quan sát thấy giữa lượng axit nucleic PCV-2 hoặc kháng nguyên và mức độ nghiêm trọng của các tổn thương

bạch huyết vi mô. Tỷ lệ chết ở lợn bị nhiễm PCV-2 có thể đạt tới 80%. Ngoài PMWS, PCV-2 liên quan đến nhiều lây nhiễm khác bao gồm bệnh đại giả, hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRS), bệnh Glasser, bệnh viêm màng não liên cầu khuẩn, bệnh nhiễm Salmonella, bệnh trực khuẩn coli sau cai sữa, rối loạn chức năng gan do tiểu đường và bệnh viêm phổi phế quản nhiễm trùng.

Hiện có nhiều vaccin làm giảm tác động của sự lây nhiễm PCV-2 ở lợn. Patent Mỹ số 6,703,023 cung cấp vaccin chứa ADN để phòng ngừa PMWS ở lợn. Trong WO 03/049703, sự sản xuất vaccin khả năng sống được mô tả, bao gồm virus PCV-1 không gây bệnh trong đó, tuy nhiên, protein ORF2 được thay thế bởi protein ORF2 của PCV-2 gây bệnh. WO 99/18214 và WO 99/29717 cung cấp nhiều chủng PCV-2 và các quy trình để điều chế vaccin PCV-2 chết. Sự điều chế các vaccin tiểu đơn vị cũng được mô tả trong WO 99/18214 và WO 99/2971. Vaccin tiểu đơn vị chứa ORF2 hiệu quả được bộc lộ trong WO 06/072065. Vaccin tiểu đơn vị chứa ORF-2 cũng được mô tả trong WO 07/28823. Tuy nhiên, không vaccin nào được mô tả trong tình trạng kỹ thuật chứa kháng nguyên PCV-2 không diệt virus và/hoặc tinh chế, ưu tiên kháng nguyên PCV-2 ORF2 được tinh chế tốt.

Các chế phẩm sinh miễn dịch chống lại PCV-2 và các chế phẩm sinh miễn dịch khác nhau chống lại các thể sinh bệnh khác thường có tác dụng diệt virus đối với các kháng nguyên khác. Các tiêu chuẩn đăng ký hiện nay (9 CFR 113.35) cho phép một số hoạt tính diệt virus ở các chế phẩm đa giá, nhưng hoạt tính diệt virus này không thể dẫn đến sự hao hụt lớn hơn 0,7log/ml của virus sống hoặc nhỏ hơn 0,7log/ml CFU (đơn vị hình thành khuẩn lạc) của vi khuẩn sống khi được kết hợp với các thành phần khác của chế phẩm sinh miễn dịch. Các chế phẩm mà có hoạt tính diệt virus lớn hơn cho phép không thể được kết hợp với các kháng nguyên khác để tạo ra vaccin đa giá.

Protein khung đọc mở 2 (open reading frame 2 - ORF2) của PCV-2, có trọng lượng phân tử xấp xỉ 30kDa khi chạy trên gel SDS-PAGE, đã được sử dụng trước đây làm thành phần kháng nguyên trong các vaccin và các chế phẩm sinh miễn dịch đối với PCV-2. Các phương pháp điển hình để thu ORF2 để sử dụng trong vaccin và chế phẩm này thường bao gồm khuếch đại PCV-2 ADN mã hóa ORF2, biểu hiện protein ORF2 bên trong tế bào chủ, và chiết protein ORF2 từ tế bào chủ thông qua sự phân giải tế bào. Dịch thủy phân tế bào ORF2 đã thu hồi sau đó được sử dụng làm phần

kháng nguyên của chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin. Trong một số trường hợp, dịch thủy phân tế bào chứa ORF2 được tách ra khỏi mảnh vụn tế bào.

Theo WO2006/072065 và WO2007/076520, việc thu nhận chất lỏng chứa kháng nguyên PCV-2 trong đó được mô tả, trong đó dịch nổi của tế bào nhiễm baculovirus biểu hiện protein ORF2 của PCV-2, được tách ra khỏi các tế bào bằng cách ly tâm và vi lọc qua màng có cỡ lỗ 0,45-1,0 μm .

Trong tài liệu Liu et al. J Vet Med Sci. 66(3): 237-42 (2004), có đề cập đến việc phát triển kháng nguyên là protein vỏ capsit của circovirus typ 2 ở lợn biểu hiện bởi baculovirus dựa trên ELISA (nhan đề tài liệu của Liu và các đồng tác giả), quy trình tinh chế protein ORF-2 bằng epitop V5 được bổ sung đầu C và trình tự gắn histidin trong điều kiện biến tính được mô tả. Quy trình này bắt đầu bằng bước phân giải các tế bào đã thu hoạch trong đệm phân giải biến tính, tiếp theo là bước sắc ký ái lực trong điều kiện biến tính và giải phóng protein bằng đệm rửa giải biến tính, và kết thúc bằng bước thẩm tách các phân đoạn đã rửa giải để loại bỏ ure và tái gấp cuộn protein (trang 238, cột phải, đoạn 2 trong tài liệu của Liu và các đồng tác giả)

Điều cần ở đây là phương pháp sản xuất làm giảm hoạt tính diệt virus của các chế phẩm sinh miễn dịch chứa PCV-2 và các kháng nguyên trong đó để các yêu cầu về đăng ký thuốc có thể được đáp ứng và các chế phẩm đa giá hiệu quả có thể được sử dụng. Điều cần nữa là các phương pháp làm hạ hoặc làm giảm hoạt tính diệt virus và tác dụng của các chế phẩm chứa PCV-2 đối với virus gây hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRSV). Điều cần nữa là các chế phẩm sinh miễn dịch mà trải qua các phương pháp theo sáng chế để hoạt tính diệt virus của chúng được giảm tới các tiêu chuẩn chấp nhận được và có thể được kết hợp với các kháng nguyên khác để tạo ra các chế phẩm sinh miễn dịch đa giá.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế giải quyết các vấn đề vốn có trong phân tình trạng kỹ thuật và đề xuất sự cải tiến xa so với tình trạng kỹ thuật. Nói chung, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất chế phẩm kháng nguyên PCV-2 bao gồm các bước: i) thu chất lỏng thứ nhất chứa kháng nguyên PCV-2, và ii) loại bỏ ít nhất một phần chất lỏng thứ nhất ra khỏi kháng nguyên PCV-2 đã nói.

Sáng chế đề xuất:

[1]. Phương pháp sản xuất chế phẩm kháng nguyên PCV-2 bao gồm các bước:

- i) thu chất lỏng thứ nhất chứa kháng nguyên PCV-2 chứa các hạt tương tự virus của protein ORF-2; và
- ii) loại bỏ ít nhất một phần chất lỏng thứ nhất ra khỏi kháng nguyên PCV-2 chứa các hạt tương tự virus của protein ORF-2 bằng bước lọc bằng cách sử dụng bộ lọc, trong đó bộ lọc này bao gồm màng bán thấm có cỡ lỗ trung bình nhỏ hơn kích thước của kháng nguyên PCV-2 để nhờ đó ngăn ít nhất 90% kháng nguyên PCV-2 đi qua các lỗ của màng bán thấm và giữ kháng nguyên PCV-2 trong bộ lọc này, trong đó phần chất lỏng thứ nhất được loại bỏ ra khỏi kháng nguyên PCV-2 nhờ sự trao đổi của phần chất lỏng thứ nhất với chất lỏng thứ hai, trong đó chất lỏng thứ hai khác với chất lỏng thứ nhất, và trong đó sự trao đổi của phần chất lỏng thứ nhất với chất lỏng thứ hai bao gồm các bước:
 - a) bổ sung chất lỏng gồm bổ sung chất lỏng thứ hai vào chất lỏng thứ nhất mà chứa kháng nguyên PCV-2; và
 - b) cô đặc kháng nguyên PCV-2 từ 3 đến 50 lần so với thể tích chất lỏng thứ nhất bằng cách loại bỏ một phần chất lỏng thứ nhất và thứ hai; và
- iii) trộn kháng nguyên PCV-2 còn lại sau bước ii) với thành phần khác được chọn từ nhóm bao gồm chất mang, chất phụ trợ, chất pha loãng, tá dược được dùng và hỗn hợp của các chất này.

[2]. Phương pháp theo mục [1], trong đó bước cô đặc và bước bổ sung chất lỏng được thực hiện về cơ bản đồng thời.

[3]. Phương pháp theo mục [1] hoặc [2], trong đó bước cô đặc và bước bổ sung chất lỏng được thực hiện ít nhất hai lần.

[4]. Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [3], trong đó bộ lọc có kích thước lỗ trung bình mà ngăn ít nhất 90% protein có kích thước từ 50kDa đến 500kDa đi qua.

[5]. Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [4], trong đó hoạt tính diệt virus của chế phẩm kháng nguyên PCV-2 được giảm đi ít nhất 10% so với chất lỏng mà không trải qua phương pháp này.

[6]. Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [5], trong đó chế phẩm kháng nguyên PCV-2 được sản xuất bởi các bước từ i) đến ii) gây ra sự hao hụt nhỏ hơn 1log TCID₅₀ trên ml của virus sống hoặc nhỏ hơn 1log CFU trên ml của vi khuẩn sống, khi virus sống hoặc vi khuẩn sống được trộn với chế phẩm kháng nguyên PCV-2 trong khoảng thời gian 2 giờ hoặc lâu hơn.

[7]. Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [6], trong đó chế phẩm kháng nguyên PCV-2 được sản xuất bởi các bước từ i) đến ii) gây ra sự hao hụt nhỏ hơn 0,7log TCID₅₀ trên ml của virus sống hoặc nhỏ hơn 0,7log CFU trên ml của vi khuẩn sống, khi virus sống hoặc vi khuẩn sống được trộn với chế phẩm kháng nguyên PCV-2 trong khoảng thời gian 2 giờ hoặc lâu hơn.

[8]. Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [7], trong đó phương pháp này bao gồm thêm bước thu kháng nguyên PCV-2 còn lại sau bước ii).

[9]. Phương pháp theo mục [8], trong đó phương pháp này bao gồm thêm bước tinh chế sản phẩm thu được ở bước ii) chứa kháng nguyên PCV-2 bằng quy trình sắc ký.

[10]. Phương pháp theo mục [9], trong đó kháng nguyên PCV-2 được tinh chế tới độ tinh khiết của kháng nguyên PCV-2 lớn hơn 50% (trọng lượng/trọng lượng) so với tổng lượng protein.

[11]. Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [10], trong đó thành phần khác là chất phụ trợ.

[12]. Phương pháp theo mục [11], trong đó chất phụ trợ là Carbomer.

[13]. Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [12], trong đó phương pháp này bao gồm thêm bước kết hợp chế phẩm kháng nguyên PCV-2 với ít nhất một kháng nguyên khác.

[14]. Phương pháp theo điểm mục [13], trong đó ít nhất một kháng nguyên khác bao gồm kháng nguyên virus gây hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn và/hoặc kháng nguyên *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Hình vẽ sau tạo nên một phần của sáng chế và được bao gồm để minh họa thêm các khía cạnh nhất định của sáng chế. Sáng chế có thể được hiểu rõ hơn nhờ dựa vào hình vẽ này kết hợp với phần mô tả chi tiết các phương án cụ thể được nêu trong bản mô tả này.

Fig.1 minh họa kết quả của cấu hình siêu lọc ở quy mô thử nghiệm sử dụng gel Bis-Tris/MOPS 10% thể hiện sự có mặt của ORF2 sau quy trình lọc. Các dải được tải như sau: (1) chất đánh dấu; (2) n/a; (3) n/a; (4) 24 - 180/181 trước cô đặc – 20µl; (5) 25 - 180/181 1x kháng nguyên – 20µl; (6) 26 - 180/181 nước rửa bộ lọc – 20µl; (7) 27 - PCV 504 trước cô đặc – 8µl; (8) 28 - PCV 504 Perm – 20µl; (9) 29 - PCV 504 1X – 20µl; (10) 092704PD – 20µl; (11) chất đánh dấu.

Mô tả chi tiết sáng chế

Trừ khi được quy định khác, việc thực hành sáng chế sẽ sử dụng các kỹ thuật truyền thống về sinh học phân tử, vi trùng học, công nghệ ADN tái tổ hợp, hóa học protein và miễn dịch học, tất cả đều nằm trong sự hiểu biết của người có trình độ trung bình trong lĩnh vực. Những kỹ thuật này được giải thích đầy đủ trong tài liệu kỹ thuật. Xem, ví dụ, Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Vols. I, II and III, Second Edition (1989); *DNA Cloning*, Vols. I and II (D. N. Glover ed. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait ed. 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); *Animal Cell Culture* (R. K. Freshney ed. 1986); *Immobilized Cells and Enzymes* (IRL press, 1986); Perbal, B., *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); the series, *Methods In Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); *Protein purification methods – a practical approach* (E.L.V. Harris and S. Angal, eds., IRL Press at Oxford University Press); and *Handbook of Experimental Immunology*, Vols. I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell eds., 1986, Blackwell Scientific Publications).

Trước khi mô tả chi tiết sáng chế, cần phải hiểu rằng sáng chế không bị giới hạn ở ADN, các trình tự polypeptit hoặc các thông số của quy trình cụ thể do các yếu tố này tất nhiên có thể thay đổi. Ngoài ra, cần phải hiểu rằng thuật ngữ được dùng ở đây cho mục đích mô tả các phương án cụ thể của sáng chế và không nhằm giới hạn chúng. Lưu ý rằng, như được sử dụng trong bản mô tả và yêu cầu bảo hộ kèm theo, dạng số ít gồm cả dạng số nhiều trừ khi được quy định khác trong ngữ cảnh. Do đó, ví dụ, đề cập đến “kháng nguyên” bao gồm hỗn hợp hai hoặc nhiều kháng nguyên, đề cập đến “tá được” bao gồm các hỗn hợp của hai hoặc nhiều tá được, và tương tự.

Sáng chế giải quyết các vấn đề vốn có trong phần tình trạng kỹ thuật và đề xuất sự cải tiến xa so với tình trạng kỹ thuật. Nói chung, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất chế phẩm kháng nguyên PCV-2 bao gồm các bước: i) thu chất lỏng thứ nhất chứa kháng nguyên PCV-2, và ii) loại bỏ ít nhất một phần chất lỏng thứ nhất ra khỏi kháng nguyên PCV-2 đã nói. Ưu tiên, kháng nguyên PCV-2 được sử dụng dưới dạng hoặc trong chế phẩm kháng nguyên PCV-2.

Nhằm mục đích của sáng chế, "chất lỏng thứ nhất" chỉ môi trường lỏng, chứa nước hoặc chất lưu thường được sử dụng trong tổ hợp với các tế bào, kháng nguyên, chế phẩm sinh miễn dịch, vacxin hoặc tương tự. Ưu tiên, chất lỏng thứ nhất bao gồm môi trường từ chế phẩm kháng nguyên, ưu tiên hơn, chất lỏng thứ nhất bao gồm hoặc ưu tiên được cấu thành từ môi trường nuôi cấy tế bào được sử dụng để sản xuất các protein tái tổ hợp trong các tế bào chủ được nuôi cấy. Tế bào chủ được nuôi cấy này có thể là vi khuẩn, men, tế bào côn trùng, tế bào động vật và tế bào của động vật có vú, với các tế bào côn trùng và động vật có vú được ưu tiên sử dụng. Do đó, chất lưu thứ nhất có thể bao gồm hoặc được cấu thành từ môi trường để nuôi cấy vi khuẩn, men, tế bào côn trùng, tế bào động vật hoặc tế bào của động vật có vú. Ưu tiên, môi trường tế bào là môi trường tế bào không chứa huyết thanh và ưu tiên nhất môi trường nuôi cấy là môi trường không chứa huyết thanh EX-CELL® 420, khi các tế bào côn trùng được sử dụng. EX-CELL® 420 là môi trường đầy đủ không chứa protein và chứa L-glutamin, và được phát triển và tối ưu hóa cho sự sinh trưởng không huyết thanh của các dòng tế bào côn trùng Sf9 và Sf21.

"Chất lỏng thứ hai" nhằm mục đích của sáng chế, chỉ chất lỏng bất kỳ thường được sử dụng kết hợp với các tế bào, kháng nguyên, chế phẩm sinh miễn dịch, vacxin

và loại tương tự, mà khác với chất lỏng thứ nhất. Ưu tiên, chất lỏng thứ hai là dung dịch chứa nước, thậm chí ưu tiên hơn nữa dung dịch được dụng và thậm chí ưu tiên hơn nữa là dung dịch đậm, chẳng hạn nước muối hoặc dung dịch đậm phosphat và tương tự. Ưu tiên hơn, chất lỏng thứ hai có đặc điểm là không diệt virus đối với virus sống hoặc vi khuẩn sống bất kỳ (trong bản mô tả này, trừ khi có chỉ dẫn cụ thể hoặc là hiển nhiên từ ngữ cảnh, thuật ngữ "diệt virus" bao gồm cả hoạt tính diệt vi khuẩn), khi virus sống hoặc vi khuẩn sống được nuôi cấy trong hoặc bảo quản trong chất lỏng này.

"Phần", nhằm mục đích của sáng chế, chỉ lượng bất kỳ mà không bao gồm toàn bộ số lượng. Ví dụ, một phần chất lỏng là lượng nhỏ hơn 100% thể tích của chất lỏng, chẳng hạn 90% chất lỏng, 80% chất lỏng, 70% chất lỏng, và tất cả các lượng nằm trong khoảng lớn hơn 0% và nhỏ hơn 100%.

"Kháng nguyên PCV-2" chỉ thành phần bất kỳ của chất mà bao gồm ít nhất một kháng nguyên mà có thể gây ra, kích thích hoặc tăng cường đáp ứng miễn dịch chống lại sự nhiễm PCV-2, khi được đưa vào động vật, ưu tiên lợn. Ưu tiên, kháng nguyên PCV-2 này là toàn bộ virus PCV-2, ưu tiên ở dạng bất hoạt, virus biến đổi sống hoặc virus PCV-2 giảm độc, virus thể khảm mà chứa ít nhất một trình tự axit amin sinh miễn dịch của PCV-2, polypeptit khác bất kỳ hoặc thành phần mà chứa ít nhất một trình tự axit amin sinh miễn dịch của PCV-2, ưu tiên ORF2. Thuật ngữ "protein sinh miễn dịch", "polypeptit sinh miễn dịch" hoặc "trình tự axit amin sinh miễn dịch" như được sử dụng ở đây chỉ trình tự axit amin bất kỳ của PCV-2, mà gây ra đáp ứng miễn dịch trong vật chủ chống lại PCV-2. Ưu tiên, protein sinh miễn dịch này, polypeptit sinh miễn dịch hoặc axit amin sinh miễn dịch của PCV-2 là loại bất kỳ được bộc lộ hoặc đề xuất trong WO2006/072065, hoặc loại polypeptit PCV-2 bất kỳ khác đã biết trong phần tình trạng kỹ thuật. Ví dụ, trình tự tiêu biểu của PCV-2 ORF2 ADN bao gồm trình tự nucleotit với số hiệu lưu giữ trong ngân hàng gen AF086834 (SEQ ID NO: 3) và SEQ ID NO: 4.

Tuy nhiên, người có trình độ trung bình trong lĩnh vực hiểu rằng trình tự này có thể thay đổi càng nhiều càng tốt từ 1 đến 10% về sự đồng nhất trình tự và vẫn giữ đặc tính kháng nguyên mà khiến nó hữu ích trong các chế phẩm sinh miễn dịch. Đặc tính kháng nguyên của chế phẩm miễn dịch có thể, ví dụ, được đánh giá bởi thử nghiệm thử thách như được đưa ra trong Ví dụ 4 của WO 06/072065. Hơn thế nữa, đặc tính

kháng nguyên của kháng nguyên biến đổi vẫn được giữ nguyên, khi kháng nguyên biến đổi đem lại ít nhất 70%, ưu tiên 80%, ưu tiên hơn 90% tính miễn dịch bảo vệ so với protein PCV-2 ORF2, được mã hóa bởi trình tự polynucleotit của SEQ ID NO:3 hoặc SEQ ID NO:4 như được đề xuất trong WO 06/072065. Các kháng nguyên PCV-2 ORF2 ưu tiên khác là các kháng nguyên được mô tả dưới đây:

- i) polypeptit bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11 của WO 06/07065;
- ii) polypeptit bất kỳ mà tương đồng 80% và/hoặc giống hệt polypeptit của i),
- iii) phần sinh miễn dịch bất kỳ của các polypeptit của i) và/hoặc ii)
- iv) phần sinh miễn dịch của iii), chứa ít nhất 5, ưu tiên 8, ưu tiên hơn, thậm chí ưu tiên hơn nữa 10 axit amin liên kề của trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11 của WO 06/072065;
- v) polypeptit mà được mã hóa bởi ADN chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 4 của WO 06/072065.;
- vi) polypeptit bất kỳ mà được mã hóa bởi polynucleotit mà ít nhất tương đồng 80% và/hoặc giống hệt polypeptit của v),
- vii) phần sinh miễn dịch bất kỳ của các polypeptit được mã hóa bởi polynucleotit của v) và/hoặc vi),
- viii) phần sinh miễn dịch của vii), trong đó polynucleotit mã hóa phần sinh miễn dịch chứa ít nhất 30 nucleotit liên kề được bao gồm trong các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 4 của WO 06/072065.

Danh mục trình tự của WO 06/072065 giống hệt với danh mục trình tự kèm theo đơn này.

Ưu tiên, phần bất kỳ trong số các phần sinh miễn dịch mô tả ở trên có đặc tính kháng nguyên của kháng nguyên PCV-2 ORF2 mà được mã hóa bởi trình tự nêu trong SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 4 của WO 06/07065.

"Sự tương đồng trình tự" như đã biết trong lĩnh vực này chỉ mối quan hệ giữa hai hoặc nhiều trình tự polypeptit hoặc hai hoặc nhiều trình tự polynucleotit, cụ thể là trình tự tham chiếu và trình tự đưa ra để so sánh với trình tự tham chiếu. Sự tương đồng trình tự được xác định bằng cách so sánh trình tự đưa ra với trình tự tham chiếu sau khi các trình tự được sắp hàng tối ưu để tạo ra mức độ tương tự trình tự cao nhất, như được xác định bởi sự ăn khớp giữa các chuỗi của các trình tự này. Nhờ sự sắp hàng này, sự tương đồng trình tự được xác định trên cơ sở vị trí trên vị trí, ví dụ, các trình tự "giống hệt" tại một vị trí cụ thể nếu tại vị trí đó, các nucleotit hoặc các gốc axit amin giống hệt nhau. Tổng số tương đồng vị trí này được chia cho tổng số nucleotit hoặc gốc trong trình tự tham chiếu để cho ra tỷ lệ % tương đồng trình tự. Ví dụ, trong polynucleotit có trình tự nucleotit có mức độ tương đồng ít nhất 85%, ưu tiên 90%, thậm chí ưu tiên hơn nữa là 95% so với trình tự nucleotit tham chiếu, dự định rằng trình tự nucleotit của polynucleotit đưa ra là giống với trình tự tham chiếu ngoại trừ rằng trình tự polynucleotit đưa ra có thể chứa lên đến 15, ưu tiên lên đến 10, thậm chí ưu tiên hơn nữa là lên đến 5 đột biến điểm trên mỗi 100 nucleotit của trình tự nucleotit tham chiếu. Nói cách khác, trong polynucleotit có trình tự nucleotit có mức độ tương đồng ít nhất 85%, ưu tiên 90%, thậm chí ưu tiên hơn nữa là 95% so với trình tự nucleotit tham chiếu, thì lên tới 15%, ưu tiên 10%, thậm chí ưu tiên hơn nữa là 5% các nucleotit trong trình tự tham chiếu có thể được xóa hoặc thay thế bằng nucleotit khác, hoặc số nucleotit lên tới 15%, ưu tiên 10%, thậm chí ưu tiên hơn là 5% của tổng nucleotit trong trình tự tham chiếu có thể được chèn vào trình tự tham chiếu. Những đột biến này của trình tự tham chiếu có thể xảy ra tại vị trí tận cùng 5' hoặc 3' của trình tự nucleotit tham chiếu hoặc vị trí bất kỳ giữa các vị trí tận cùng, đặt rải rác hoặc ra riêng trong số các nucleotit trong trình tự tham chiếu hoặc trong một hoặc nhiều nhóm liên kề bên trong trình tự tham chiếu. Tương tự, trình tự polypeptit có trình tự axit amin đưa ra có ít nhất 85%, ưu tiên 90%, thậm chí ưu tiên hơn nữa là 95% tương đồng trình tự đối với trình tự axit amin tham chiếu, dự định rằng trình tự axit amin đưa ra của polypeptit là giống với trình tự tham chiếu ngoại trừ rằng trình tự polypeptit đưa ra có thể chứa lên đến 15, ưu tiên lên đến 10, thậm chí ưu tiên hơn nữa là lên đến 5 thay thế axit amin trên mỗi 100 axit amin của trình tự nucleotit tham chiếu. Nói cách khác, để thu được trình tự polypeptit đưa ra có mức độ tương đồng trình tự ít nhất 85%, ưu tiên 90%, thậm chí ưu tiên hơn nữa là 95% so với trình tự axit amin tham chiếu, thì lên

tới 15%, ưu tiên lên tới 10%, thậm chí ưu tiên hơn nữa lên tới 5% các gốc axit amin trong trình tự tham chiếu có thể được xóa hoặc thay thế bằng axit amin khác, hoặc số axit amin lên tới 15%, ưu tiên lên tới 10%, thậm chí ưu tiên hơn nữa lên tới 5% của tổng số gốc axit amin trong trình tự tham chiếu có thể được chèn vào trình tự tham chiếu. Những thay đổi này của trình tự tham chiếu có thể xảy ra tại vị trí tận cùng amino hoặc carboxy của trình tự axit amin tham chiếu hoặc vị trí bất kỳ giữa các vị trí tận cùng này, đặt rải rác hoặc là riêng rẽ trong số các gốc trong trình tự tham chiếu hoặc trong một hoặc nhiều nhóm liên kề bên trong trình tự tham chiếu. Ưu tiên, các vị trí của gốc mà không giống nhau là khác nhau bởi sự thể axit amin bảo tồn. Tuy nhiên, sự thể bảo tồn này không được coi là sự phù hợp khi xác định tính tương đồng trình tự.

Virut hoặc vi khuẩn "sống" , nhằm mục đích của sáng chế, chỉ virut hoặc vi khuẩn mà có khả năng tái bản ở vật chủ. Virut sống ưu tiên và vi khuẩn sống ưu tiên của sáng chế là virut PRRS và vi khuẩn *Mycoplasma hyopneumonia* tương ứng. Tuy nhiên, thuật ngữ virut hoặc vi khuẩn sống không bị giới hạn ở PRRS và *Mycoplasma hyopneumoniae* tương ứng.

Phần chất lỏng thứ nhất có thể được loại bỏ ra khỏi kháng nguyên PCV-2 bởi sự trao đổi của phần chất lỏng thứ nhất đối với chất lỏng thứ hai, trong đó chất lỏng thứ hai khác chất lỏng thứ nhất (xem định nghĩa về chất lỏng thứ hai). Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất chế phẩm kháng nguyên PCV-2 bao gồm các bước: i) thu chất lỏng thứ nhất chứa kháng nguyên PCV-2, ii) loại bỏ ít nhất một phần chất lỏng thứ nhất ra khỏi kháng nguyên PCV-2 này, trong đó phần của chất lỏng thứ nhất được loại bỏ ra khỏi kháng nguyên PCV-2 bằng sự trao đổi của phần chất lỏng thứ nhất đối với chất lỏng thứ hai, và trong đó chất lỏng thứ hai khác với chất lỏng thứ nhất. Ưu tiên, sự trao đổi của phần chất lỏng thứ nhất với chất lỏng thứ hai bao gồm các bước: a) bổ sung chất lỏng thứ hai vào chất lỏng thứ nhất mà chứa kháng nguyên PCV-2 và b) cô đặc kháng nguyên PCV-2 bằng cách loại bỏ một phần chất lỏng thứ nhất và thứ hai ra khỏi kháng nguyên PCV-2. Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất chế phẩm kháng nguyên PCV-2 bao gồm các bước: i) thu chất lỏng thứ nhất chứa kháng nguyên PCV-2, ii) loại bỏ ít nhất một phần chất lỏng thứ nhất ra khỏi kháng nguyên PCV-2 này bằng sự trao đổi của phần chất lỏng thứ nhất đối với chất lỏng thứ hai bao gồm các bước a) bổ sung chất lỏng thứ

hai vào chất lỏng thứ nhất mà chứa kháng nguyên PCV-2 và b) cô đặc kháng nguyên PCV-2 bằng cách loại bỏ một phần chất lỏng thứ nhất và thứ hai ra khỏi kháng nguyên PCV-2.

Phần chất lỏng thứ nhất có thể được loại bỏ ra khỏi kháng nguyên PCV-2 bằng bước lọc sử dụng máy lọc. Tuy nhiên, phương pháp bất kỳ đã biết đối với người có trình độ trong lĩnh vực có thể được sử dụng để loại bỏ phần chất lưu bất kỳ, bao gồm phần chất lưu thứ nhất, và khi có thể, phần chất lưu thứ hai ra khỏi kháng nguyên PCV-2. Phương pháp này, ví dụ bao gồm nhưng không giới hạn ở ly tâm và/hoặc sắc ký. Tuy nhiên, ưu tiên nhất là phương pháp lọc. Phương pháp lọc ưu tiên để loại bỏ phần chất lưu thứ nhất, hoặc chất lưu bất kỳ khác, khi có thể, bao gồm siêu lọc và/hoặc lọc màng. Siêu lọc và lọc màng là các phương pháp chuẩn đã biết đối với người có trình độ trong lĩnh vực, được mô tả ví dụ chi tiết trong *Protein Purification Methods - A Practical Approach* – editors: E.L.V. Harris and S. Angel, Oxford University Press 1995. Cụ thể, trong Chương 3 của quyển sách, một số phương pháp và loại thiết bị được mô tả, tất cả đều có thể được sử dụng bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh vực theo cách ví dụ nhằm mục đích của sáng chế. Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập phương pháp sản xuất chế phẩm kháng nguyên PCV-2 bao gồm các bước: i) thu chất lỏng thứ nhất chứa kháng nguyên PCV-2, ii) loại bỏ ít nhất một phần chất lỏng thứ nhất ra khỏi kháng nguyên PCV-2 này, trong đó phần chất lỏng thứ nhất được loại bỏ ra khỏi kháng nguyên PCV-2 bằng cách lọc, ưu tiên bằng phương pháp siêu lọc hoặc lọc màng. Ưu tiên, phần chất lỏng thứ nhất được loại bỏ ra khỏi kháng nguyên PCV-2 bởi sự trao đổi của ít nhất một phần chất lỏng thứ nhất đối với chất lỏng thứ hai bao gồm các bước a) bổ sung chất lỏng thứ hai vào chất lỏng thứ nhất mà chứa kháng nguyên PCV-2 và b) cô đặc kháng nguyên PCV-2 bằng cách loại bỏ phần chất lỏng thứ nhất và thứ hai ra khỏi kháng nguyên PCV-2.

Như đã xác định ở trên, chất lỏng thứ hai ưu tiên được sử dụng trong phương pháp bất kỳ đã mô tả là dung dịch đậm, ưu tiên dung dịch đậm được chấp nhận về mặt sinh lý với nước muối được đặc biệt ưu tiên. Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất chế phẩm kháng nguyên PCV-2 bao gồm các bước: i) thu chất lỏng thứ nhất chứa kháng nguyên PCV-2, ii) loại bỏ ít nhất một phần chất lỏng thứ nhất ra khỏi kháng nguyên PCV-2 này, bởi sự trao đổi đối với dung dịch đậm,

ưu tiên dung dịch đệm được chấp nhận về mặt sinh lý như nước muối hoặc dung dịch đệm phosphat hoặc tương tự. Ưu tiên phần chất lỏng thứ nhất được loại bỏ ra khỏi kháng nguyên PCV-2 bằng cách lọc, ưu tiên lọc màng và/hoặc siêu lọc. Ưu tiên hơn, sự trao đổi của ít nhất một phần của chất lỏng thứ nhất so với đệm, ưu tiên dung dịch đệm được chấp nhận về mặt sinh lý chẳng hạn nước muối hoặc dung dịch đệm phosphat hoặc tương tự, bao gồm các bước a) bổ sung dung dịch đệm, ưu tiên dung dịch đệm được chấp nhận về mặt sinh lý chẳng hạn nước muối hoặc dung dịch đệm phosphat hoặc tương tự vào chất lỏng thứ nhất chứa kháng nguyên PCV-2 và b) cô đặc kháng nguyên PCV-2 bằng cách loại bỏ phần chất lưu thứ nhất và chất lưu này mà là dung dịch đệm, ưu tiên dung dịch đệm được chấp nhận về mặt sinh lý, chẳng hạn nước muối hoặc dung dịch đệm phosphat hoặc tương tự, ra khỏi kháng nguyên PCV-2, ưu tiên bằng cách lọc, thậm chí ưu tiên hơn nữa bằng phương pháp siêu lọc và/hoặc lọc màng.

Khi bước cô đặc và bước bổ sung chất lỏng của phương pháp như được mô tả ở đây có thể được thực hiện về cơ bản đồng thời hoặc tuần tự, bước cô đặc và bước bổ sung chất lỏng được thực hiện tuần tự. Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất chế phẩm kháng nguyên PCV-2 bao gồm các bước: i) thu chất lỏng thứ nhất chứa kháng nguyên PCV-2, ii) loại bỏ ít nhất một phần chất lỏng thứ nhất ra khỏi kháng nguyên PCV-2 này bằng sự trao đổi của phần chất lỏng thứ nhất đối với chất lỏng thứ hai bao gồm các bước a) bổ sung chất lỏng thứ hai vào chất lỏng thứ nhất mà chứa kháng nguyên PCV-2 và b) cô đặc kháng nguyên PCV-2 bằng cách loại bỏ phần chất lỏng thứ nhất và thứ hai ra khỏi kháng nguyên PCV-2, trong đó bước bổ sung chất lỏng được thực hiện về cơ bản đồng thời hoặc tuần tự. Ưu tiên, phần chất lỏng thứ nhất và trong trường hợp bổ sung chất lỏng thứ hai, hỗn hợp của chất lưu thứ nhất và thứ hai được loại bỏ ra khỏi kháng nguyên PCV-2 bằng cách lọc, ưu tiên bằng cách lọc màng và/hoặc siêu lọc.

Khi bước cô đặc và bước bổ sung chất lỏng được thực hiện tuần tự, trình tự các bước không quan trọng. Ví dụ, theo khía cạnh khác, bước bổ sung chất lỏng xảy ra trước bước cô đặc và theo khía cạnh khác, bước cô đặc xảy ra trước bước bổ sung chất lỏng. Bước bổ sung chất lỏng và bước cô đặc có thể được thực hiện nhiều lần, không quan tâm đến trình tự thực hiện chúng. Ví dụ, mỗi bước tương ứng này có thể được

thực hiện ít nhất hai, ít nhất ba, ít nhất bốn, ít nhất năm, ít nhất 10, lên tới nhiều lần nếu muốn. Theo một khía cạnh, bước cô đặc và bước bổ sung chất lỏng mỗi chúng được thực hiện ít nhất hai lần. Theo một khía cạnh khác, bước cô đặc và bước bổ sung chất lỏng mỗi chúng được thực hiện ít nhất ba lần. Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất chế phẩm kháng nguyên PCV-2, trong đó phương pháp này thường bao gồm các bước: i) thu chất lỏng thứ nhất chứa kháng nguyên PCV-2, ii) loại bỏ ít nhất một phần chất lỏng thứ nhất ra khỏi kháng nguyên PCV-2 này bằng sự trao đổi của phần chất lỏng thứ nhất đối với chất lỏng thứ hai, và trong đó sự trao đổi này được thực hiện nhiều lần. Ưu tiên, sự trao đổi phần chất lưu thứ nhất với phần chất lưu thứ hai bao gồm các bước a) bổ sung chất lỏng thứ hai vào chất lỏng thứ nhất mà chứa kháng nguyên PCV-2 và b) cô đặc kháng nguyên PCV-2 bằng cách loại bỏ phần chất lỏng thứ nhất và thứ hai ra khỏi kháng nguyên PCV-2, trong đó bước bổ sung chất lỏng và bước cô đặc được thực hiện nhiều lần, ví dụ, hai lần, ba lần, năm lần, 10 lần, v.v.. Ưu tiên, bước bổ sung chất lỏng và bước cô đặc được thực hiện hai lần, ưu tiên nhất ba lần. Như đã mô tả ở trên, lọc là phương pháp ưu tiên để loại bỏ phần của chất lỏng thứ nhất, hoặc trong trường hợp có nhiều bước loại bỏ, như đã mô tả ở trên, để loại bỏ phần của hỗn hợp chứa chất lưu thứ nhất và chất lưu thứ hai, từ kháng nguyên PCV-2.

Bộ lọc có thể là bộ lọc truyền thống trong lĩnh vực. Ưu tiên, bộ lọc bao gồm màng bán thấm. Ở dạng ưu tiên hơn, màng bán thấm có kích thước lỗ trung bình nhỏ hơn kháng nguyên PCV-2 để ngăn đường đi của ít nhất 90% kháng nguyên PCV-2 qua các lỗ của màng bán thấm và giữ kháng nguyên PCV-2 lại bằng bộ lọc. Theo khía cạnh khác, bộ lọc có kích thước lỗ trung bình ngăn đường đi của ít nhất 90% protein có kích thước từ 50kDa đến 500kDa, ưu tiên hơn, bộ lọc có kích thước lỗ trung bình ngăn đường đi của ít nhất 90% protein có kích thước từ 75kDa đến 400kDa, và ưu tiên nhất, bộ lọc có kích thước lỗ trung bình mà ngăn đường đi của ít nhất 90% protein có kích thước từ 100kDa đến 300kDa. Lỗ này được ưu tiên, khi kháng nguyên PCV-2 được sản xuất ở dạng virus hoàn toàn hoặc hạt tương tự virus. Vẫn trong khía cạnh khác, màng bán thấm bao gồm vật liệu được chọn từ nhóm bao gồm polysulfon, polyetesulfon và xenluloza tái tạo. Tuy nhiên, vật liệu khác bất kỳ mà cho phép loại bỏ một phần của chất lưu thứ nhất, và trong trường hợp nhiều bước xử lý, loại bỏ hỗn hợp của chất lưu thứ nhất và thứ hai ra khỏi kháng nguyên PCV-2 có thể được sử dụng. Bộ

lọc có thể được chọn từ nhóm bao gồm màng hộp siêu lọc, màng sợi rỗng, các tấm phẳng, hoặc băng cát sét, với hộp siêu lọc màng sợi rỗng được đặc biệt ưu tiên. Do đó, theo khía cạnh khác của sáng chế, phương pháp sản xuất chế phẩm kháng nguyên PCV-2 được đề xuất như đã mô tả ở trên. Phương pháp này thường bao gồm các bước: i) thu chất lỏng thứ nhất chứa kháng nguyên PCV-2, ii) loại bỏ ít nhất phần của chất lỏng thứ nhất từ kháng nguyên PCV-2 bởi bước lọc, trong đó bộ lọc ưu tiên là hoặc gồm màng bán thấm. Ưu tiên, màng bán thấm có kích thước lỗ trung bình nhỏ hơn kháng nguyên PCV-2 để ngăn đường đi của ít nhất 90% kháng nguyên PCV-2 qua các lỗ của màng bán thấm. Ưu tiên, kích thước lỗ trung bình của màng bán thấm ngăn đường đi của ít nhất 90% protein có kích thước từ 50kDa đến 500kDa, ưu tiên hơn, ít nhất 90% protein có kích thước từ 75kDa đến 400kDa, và ưu tiên nhất ít nhất 90% protein có kích thước từ 100kDa đến 300kDa. Lỗ này được ưu tiên, khi kháng nguyên PCV-2 được sản xuất ở dạng virus hoàn toàn hoặc hạt tương tự virus. Như đã mô tả ở trên, bước loại bỏ nhìn chung bao gồm sự trao đổi của phần chất lưu thứ nhất với phần chất lưu thứ hai bao gồm các bước a) bổ sung chất lỏng thứ hai vào chất lỏng thứ nhất mà chứa kháng nguyên PCV-2 và b) cô đặc kháng nguyên PCV-2 bằng cách loại bỏ phần chất lỏng thứ nhất và thứ hai ra khỏi kháng nguyên PCV-2, trong đó bước bổ sung chất lỏng và bước cô đặc được thực hiện nhiều lần, ví dụ, hai lần, ba lần, năm lần, 10 lần, v.v.. Ưu tiên, bước bổ sung chất lỏng và bước cô đặc được thực hiện hai lần, ưu tiên nhất ba lần.

Bước cô đặc của phương pháp được đề xuất ở đây được thực hiện để kháng nguyên PCV-2 được cô đặc từ 3 lần đến 50 lần so với thể tích của chất lỏng thứ nhất. Ưu tiên hơn, bước cô đặc được thực hiện để kháng nguyên PCV-2 được cô đặc từ 4 lần đến 20 lần so với thể tích của chất lỏng thứ nhất. Ưu tiên hơn, bước cô đặc được thực hiện để kháng nguyên PCV-2 được cô đặc từ 7 lần đến 10 lần so với thể tích của chất lỏng thứ nhất. Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất chế phẩm kháng nguyên PCV-2 bao gồm các bước: i) thu chất lỏng thứ nhất chứa kháng nguyên PCV-2, ii) loại bỏ ít nhất một phần chất lỏng thứ nhất ra khỏi kháng nguyên PCV-2, trong đó phần của chất lỏng thứ nhất được loại bỏ ra khỏi kháng nguyên PCV-2, và trong đó kháng nguyên PCV-2 được cô đặc từ 3 lần đến 50 lần, ưu tiên từ 4 lần đến 20 lần, và thậm chí ưu tiên hơn từ 7 lần đến 10 lần so với thể tích của chất lỏng thứ nhất. Ưu tiên, phần chất lỏng thứ nhất được loại bỏ ra khỏi kháng

nguyên PCV-2 bởi sự trao đổi của phần chất lỏng thứ nhất đối với chất lỏng thứ hai bao gồm các bước a) bổ sung chất lỏng thứ hai vào chất lỏng thứ nhất mà chứa kháng nguyên PCV-2 và b) cô đặc kháng nguyên PCV-2 từ 3 lần đến 50 lần, ưu tiên từ 4 lần đến 20 lần, và thậm chí ưu tiên hơn là từ 7 đến 10 lần so với thể tích của chất lỏng thứ nhất bằng cách loại bỏ phần chất lỏng thứ nhất và thứ hai ra khỏi kháng nguyên PCV-2. Ưu tiên, bước bổ sung chất lỏng và bước cô đặc được thực hiện nhiều lần, ưu tiên hai lần, thậm chí ưu tiên hơn nữa ba lần. Trong trường hợp này, không chỉ chất lỏng thứ nhất mà cả hỗn hợp của chất lỏng thứ nhất và thứ hai cũng được loại bỏ. Ưu tiên, mỗi bước bổ sung chất lỏng được thực hiện về cơ bản đồng thời hoặc tuần tự. Khi bước cô đặc và bước bổ sung chất lỏng được thực hiện tuần tự, trình tự các bước không ảnh hưởng. Hơn thế nữa, bước cô đặc ưu tiên được thực hiện bằng cách lọc - ưu tiên lọc màng và/hoặc siêu lọc, sử dụng bộ lọc, mà ưu tiên chứa màng bán thấm. Màng bán thấm ưu tiên có kích thước lỗ trung bình nhỏ hơn kháng nguyên PCV-2 và ngăn đường đi của ít nhất 90% kháng nguyên PCV-2 qua các lỗ của màng bán thấm. Ưu tiên, kích thước lỗ trung bình của màng bán thấm ngăn đường đi của ít nhất 90% protein có kích thước từ 50kDa đến 500kDa, ưu tiên hơn, ít nhất 90% protein có kích thước từ 75kDa đến 400kDa, và ưu tiên nhất ít nhất 90% protein có kích thước từ 100kDa đến 300kDa. Lỗ này được ưu tiên, khi kháng nguyên PCV-2 được sản xuất là virus hoàn toàn hoặc hạt tương tự virus.

Theo phương án khác, hoạt tính diệt virus của chế phẩm kháng nguyên PCV-2 được sản xuất bằng phương pháp ở đây được giảm đi ít nhất 10% so với chất lỏng mà không trải qua phương pháp này. Ưu tiên hơn nữa, hoạt tính diệt virus của chế phẩm kháng nguyên PCV-2 được giảm đi ít nhất 50% so với chất lỏng mà không trải qua phương pháp này. Ưu tiên hơn nữa, hoạt tính diệt virus của chế phẩm kháng nguyên PCV-2 được giảm đi ít nhất 70% so với chất lỏng mà không trải qua phương pháp này.

Nhằm mục đích của sáng chế, thuật ngữ "hoạt tính diệt virus" có nghĩa là, chất lưu, dung dịch hoặc chế phẩm đó bất hoạt hoặc giết chết virus sống hoặc vi khuẩn sống tới mức nhất định, khi chất lưu, dung dịch hoặc chế phẩm đó được trộn với virus sống hoặc vi khuẩn sống. Do đó, sự giảm hoạt tính diệt virus của chất lưu, dung dịch hoặc chế phẩm đi ít nhất 10% có nghĩa là, tỷ lệ sống sót của virus sống hoặc vi khuẩn sống cao hơn 90% ở chất lưu, dung dịch hoặc chế phẩm mà trải qua phương pháp bất kỳ

được mô tả ở đây, so với chất lưu, dung dịch hoặc chế phẩm không trải qua phương pháp bất kỳ được mô tả ở đây. Theo sáng chế, virus PRRS, ưu tiên PRRS có số hiệu lưu giữ ATCC số VR 2332, là virus tham chiếu để xác định hoạt tính diệt virus. Để xác định hoạt tính diệt virus đối với vi khuẩn, nên sử dụng vi khuẩn *Mycoplasma hyopneumonia*, ưu tiên chủng J của *Mycoplasma hyopneumonia*.

Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất chế phẩm kháng nguyên PCV-2 bao gồm các bước: i) thu chất lỏng thứ nhất chứa kháng nguyên PCV-2, ii) loại bỏ ít nhất một phần chất lỏng thứ nhất ra khỏi kháng nguyên PCV-2, trong đó hoạt tính diệt virus - ưu tiên đối với virus PRRS của chế phẩm kháng nguyên PCV-2 thu được sau bước ii) được giảm đi ít nhất 10%, ưu tiên ít nhất 50%, ưu tiên hơn ít nhất 70%, ưu tiên hơn nữa ít nhất 90% so với thể tích của chất lỏng thứ nhất. Ưu tiên, phần của chất lỏng thứ nhất có hoạt tính diệt virus được loại bỏ ra khỏi kháng nguyên PCV-2 bằng sự trao đổi một phần chất lỏng thứ nhất với chất lỏng thứ hai. Sự trao đổi ưu tiên được thực hiện theo cách bao gồm bước a) bổ sung chất lỏng thứ hai vào chất lỏng thứ nhất mà chứa kháng nguyên PCV-2 và b) cô đặc kháng nguyên PCV-2, ưu tiên từ 3 lần đến 50 lần, ưu tiên hơn nữa từ 4 lần đến 20 lần, và thậm chí ưu tiên hơn nữa từ 7 lần đến 10 lần so với thể tích của chất lỏng thứ nhất bằng cách loại bỏ phần chất lỏng thứ nhất và thứ hai ra khỏi kháng nguyên PCV-2. Ưu tiên, bước bổ sung chất lỏng và bước cô đặc được thực hiện nhiều lần, ưu tiên hai lần, thậm chí ưu tiên hơn nữa ba lần. Trong trường hợp này, không chỉ chất lỏng thứ nhất mà cả hỗn hợp của chất lỏng thứ nhất và thứ hai cũng được loại bỏ. Ưu tiên, mỗi bước bổ sung chất lỏng được thực hiện về cơ bản đồng thời hoặc tuần tự như mô tả ở trên. Khi bước cô đặc và bước bổ sung chất lỏng được thực hiện liên tục, trình tự các bước không quan trọng. Hơn thế nữa, bước cô đặc ưu tiên được thực hiện bằng cách lọc - ưu tiên lọc màng và/hoặc siêu lọc, sử dụng bộ lọc, mà ưu tiên chứa màng bán thấm. Màng bán thấm ưu tiên có kích thước lỗ trung bình nhỏ hơn kháng nguyên PCV-2 và ngăn đường đi của ít nhất 90% kháng nguyên PCV-2 qua các lỗ của màng bán thấm. Ưu tiên, kích thước lỗ trung bình của màng bán thấm hoặc của bộ lọc bất kỳ mà được sử dụng ở đây, ngăn đường đi của ít nhất 90% protein có kích thước từ 50kDa đến 500kDa, ưu tiên hơn, ít nhất 90% protein có kích thước từ 75kDa đến 400kDa, và ưu tiên nhất ít nhất 90% protein có kích thước từ 100kDa đến 300kDa. Lỗ này được ưu tiên, khi kháng nguyên PCV-2 được sản xuất virus hoàn toàn hoặc hạt tương tự virus.

Theo khía cạnh khác, phương pháp còn bao gồm bước thu kháng nguyên PCV-2 thu được sau khi ít nhất một phần chất lỏng thứ nhất được loại bỏ ra khỏi kháng nguyên PCV-2.

Như được sử dụng ở đây, "thu" chỉ sự thu gom hoặc thu hồi kháng nguyên PCV-2. Phương pháp truyền thống bất kỳ đã biết trong lĩnh vực có thể được sử dụng để thu hồi kháng nguyên PCV-2 hoặc là khi kháng nguyên được sản xuất để sử dụng với các phương pháp và chế phẩm theo sáng chế, hoặc là khi kháng nguyên PCV-2 trải qua các phương pháp đã mô tả ở đây. Theo cách thu hồi đặc biệt ưu tiên, phần của chất lỏng thứ nhất được loại bỏ ra khỏi kháng nguyên PCV-2 thông qua bước lọc và kháng nguyên PCV-2 được thu hồi từ sự làm chậm lọc của bộ lọc. Ở dạng ưu tiên hơn, kháng nguyên PCV-2 được thu hoặc thu gom, hoặc thu hồi từ sự làm chậm lọc của màng bán thấm có kích thước lỗ đã mô tả ở đây. Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất chế phẩm kháng nguyên PCV-2 bao gồm các bước: i) thu chất lỏng thứ nhất chứa kháng nguyên PCV-2, ii) loại bỏ ít nhất một phần chất lỏng thứ nhất ra khỏi kháng nguyên PCV-2, trong đó kháng nguyên PCV-2 thu được sau bước ii) được thu lại. Ưu tiên, phần của chất lỏng thứ nhất loại bỏ ra khỏi kháng nguyên PCV-2 bằng sự trao đổi một phần chất lỏng thứ nhất với chất lỏng thứ hai. Sự trao đổi ưu tiên được thực hiện sao cho bao gồm bước a) bổ sung chất lỏng thứ hai vào chất lỏng thứ nhất mà chứa kháng nguyên PCV-2 và b) cô đặc kháng nguyên PCV-2, ưu tiên từ 3 lần đến 50 lần, ưu tiên hơn nữa từ 4 lần đến 20 lần, và thậm chí ưu tiên hơn nữa từ 7 lần đến 10 lần so với thể tích của chất lỏng thứ nhất bằng cách loại bỏ phần chất lỏng thứ nhất và thứ hai ra khỏi kháng nguyên PCV-2. Ưu tiên, bước bổ sung chất lỏng và bước cô đặc được thực hiện nhiều lần, ưu tiên hai lần, thậm chí ưu tiên hơn nữa ba lần. Trong những trường hợp này, không chỉ chất lỏng thứ nhất mà cả hỗn hợp của chất lỏng thứ nhất và thứ hai cũng được loại bỏ. Ưu tiên, mỗi bước bổ sung chất lỏng được thực hiện về cơ bản đồng thời hoặc tuần tự như mô tả ở trên. Khi bước cô đặc và bước bổ sung chất lỏng được thực hiện liên tục, trình tự các bước không quan trọng. Hơn thế nữa, bước cô đặc ưu tiên được thực hiện bằng cách lọc - ưu tiên lọc màng và/hoặc siêu lọc, sử dụng bộ lọc, mà ưu tiên chứa màng bán thấm. Màng bán thấm ưu tiên có kích thước lỗ trung bình nhỏ hơn kháng nguyên PCV-2 và ngăn đường đi của ít nhất 90% kháng nguyên PCV-2 qua các lỗ của màng bán thấm và giữ kháng nguyên PCV-2 lại bên trong bộ lọc để thu lại hoặc thu hồi. Ưu tiên, kích thước lỗ trung

bình của màng bán thấm hoặc của bộ lọc bất kỳ mà được sử dụng ở đây, ngăn đường đi của ít nhất 90% protein có kích thước từ 50kDa đến 500kDa, ưu tiên hơn, ít nhất 90% protein có kích thước từ 75kDa đến 400kDa, và ưu tiên nhất ít nhất 90% protein có kích thước từ 100kDa đến 300kDa. Lỗ này được ưu tiên, khi kháng nguyên PCV-2 được sản xuất virus hoàn toàn hoặc hạt tương tự virus.

Kháng nguyên PCV-2 còn lại sau khi trải qua các phương pháp đã nêu ở đây, ưu tiên sau khi thu được từ sự làm chậm bộ lọc, được trộn với thành phần khác được chọn từ nhóm bao gồm chất mang, chất phụ trợ, chất làm loãng, tá dược và các hỗn hợp của chúng. Ưu tiên, thành phần khác là chất phụ trợ, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong đó chất phụ trợ là polyme của axit acrylic hoặc axit metacrylic, và thậm chí ưu tiên hơn nữa trong đó chất phụ trợ là Carbomer (tên chung cho các polyme tổng hợp có trọng lượng phân tử cao của axit acrylic).

Như được sử dụng ở đây, "chất mang được dùng" và "chất mang dùng được trong thú y" bao gồm dung môi bất kỳ và tất cả dung môi, môi trường phân tán, chất bao phủ, chất ổn định, chất làm loãng, chất bảo quản, chất kháng khuẩn và chất diệt nấm, chất đẳng trương, chất cản trở sự hấp phụ và các chất tương tự.

“Chất phụ trợ” như được dùng trong bản mô tả, có thể gồm có nhôm hydroxit và nhôm phosphat, saponin, ví dụ, Quil A, QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA), GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, AL), nhũ tương nước trong dầu, nhũ tương dầu trong nước, nhũ tương nước trong dầu trong nước. Nhũ tương có thể có trong dầu parafin lỏng nhẹ (loại Dược điển châu Âu); dầu isoprenoit như dầu squalan hoặc dầu squalen được tạo ra từ sự polyme hoá alken ở mức thấp, cụ thể isobuten hoặc dextrin; este của axit hoặc rượu chứa nhóm alkyl mạch thẳng, cụ thể hơn là dầu thực vật, etyl oleat, propylen glycol di-(caprylat/caprat), glyxeryl tri-(caprylat/caprat) hoặc propylen glycol dioleat; este của axit hoặc rượu béo phân nhánh, cụ thể là este của axit isostearic. Dầu được sử dụng trong tổ hợp với chất tạo nhũ tương để tạo thành nhũ tương. Chất tạo nhũ tương ưu tiên là chất có hoạt tính bề mặt không điện ly, cụ thể là este của sorbitan, của manit (ví dụ, anhydromanitol oleat), của glycol, của polyglyxerol, của propylen glycol và của axit oleic, isostearic, rixinoleic hoặc hydroxystearic, mà tùy ý được etoxy hoá, và khối copolyme polyoxypropylen-polyoxyetylen, cụ thể là sản phẩm Pluronic, cụ thể là L121. Xem

Hunter et al., *The Theory and Practical Application of Adjuvants* (Ed. Stewart-Tull, D. E. S.). John Wiley and Sons, NY, pp51-94 (1995) và Todd et al., *Vaccine* 15:564-570 (1997). Ví dụ, có thể sử dụng nhũ tương SPT được mô tả trong trang 147 của "Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach" do M. Powell và M. Newman chủ biên, Plenum Press, 1995, và nhũ tương MF59 được mô tả trong trang 183 trong quyển sách này. Các chất phù hợp khác bao gồm, nhưng không giới hạn ở, hệ chất phụ trợ RIBI (Ribi Inc.), copolyme khối (CytRx, Atlanta GA), SAF-M (Chiron, Emeryville CA), lipit monophosphoryl A, chất phụ trợ lipit-amin Avridin, độc tố trong ruột không bền nhiệt từ E. coli (tái tổ hợp hoặc khác), độc tố dịch tả, IMS 1314 hoặc dipeptit muramyl trong số nhiều chất phụ trợ khác. Trong số các copolyme của dẫn xuất maleic anhydrit và alkenyl, copolyme EMA (Monsanto) là copolyme của maleic anhydrit và etylen được bao gồm. Sự hoà tan các polyme này trong nước tạo thành dung dịch axit mà sẽ được trung hoà, ưu tiên đến pH sinh lý, để thu được dung dịch chất phụ trợ mà tự nó sẽ được hợp nhất vào trong chế phẩm sinh miễn dịch, miễn dịch hoặc chế phẩm vaccin.

Ví dụ khác về chất phụ trợ là hợp chất được chọn từ các polyme của axit acrylic hoặc metacrylic và copolyme của dẫn xuất maleic anhydrit và alkenyl. Hợp chất chứa chất phụ trợ ưu tiên là polyme của axit acrylic hoặc metacrylic mà được liên kết ngang, cụ thể với ete polyalkenyl của đường hoặc rượu đa chức. Các hợp chất này được biết đến bằng thuật ngữ carbomer (Pharmeuropa tập 8, số 2, tháng 6 năm 1996). Người có trình độ trong lĩnh vực có thể cũng tham khảo paten Mỹ số 2,909,462 mà mô tả polyme acrylic này được liên kết ngang với hợp chất được polyhydroxylat hoá có ít nhất 3 nhóm hydroxyl, ưu tiên không có nhiều hơn 8 nhóm hydroxyl, các nguyên tử hydro của ít nhất ba nhóm hydroxyl được thay thế bằng các gốc béo không no có ít nhất 2 nguyên tử cacbon. Các gốc được ưu tiên là gốc chứa từ 2 đến 4 nguyên tử cacbon, ví dụ vinyl, alyl và nhóm không no thuộc etylen khác. Trong chính các gốc không no có thể chứa các phần tử thế khác, như metyl. Sản phẩm được bán dưới tên CARBOPOL®; (BF Goodrich, Ohio, USA) đặc biệt phù hợp. Chúng là các polyme của axit acrylic được liên kết ngang với polyalkenyl ete hoặc divinyl glycol hoặc được liên kết ngang với alyl sucroza hoặc với alyl pentaerytritol. Trong số chúng, có thể đề cập đến CARBOPOL® 974P, 934P và 971P. Ưu tiên nhất là sự sử dụng CARBOPOL® 971P.

Ưu tiên, tá dược được bổ sung với lượng nằm trong khoảng từ 100 μ g đến 10mg trong một liều dùng. Thậm chí ưu tiên hơn, chất phụ trợ được bổ sung vào với lượng nằm trong khoảng từ 100 μ g đến 10mg trong một liều dùng. Thậm chí ưu tiên hơn nữa, chất phụ trợ được bổ sung vào với lượng nằm trong khoảng từ 500 μ g đến 5mg trong một liều dùng. Thậm chí ưu tiên hơn nữa, chất phụ trợ được bổ sung vào với lượng nằm trong khoảng từ 750 μ g đến 2,5mg trong một liều dùng. Ưu tiên nhất, chất phụ trợ được bổ sung vào với lượng khoảng 1mg trong một liều dùng.

"Chất pha loãng" có thể bao gồm nước, nước muối, dextroza, etanol, glyxerol, và tương tự. Các chất đẳng trương có thể bao gồm natri clorua, dextroza, mannitol, sorbitol và lactoza, trong số các chất khác. Chất ổn định bao gồm albumin và các muối kiềm của axit etylendiamintetraxetic, trong số các chất khác.

"Chất bảo quản" như được sử dụng ở đây chỉ chất hoạt tính kháng vi sinh như gentamycin, merthiolat và tương tự. Cụ thể, sự bổ sung chất bảo quản được ưu tiên nhất để bào chế chế phẩm đa liều. Các chất hoạt tính kháng vi sinh vật này được bổ sung vào trong các nồng độ hữu hiệu để ngăn chế phẩm đang nói đến bị nhiễm tạp chất vi sinh vật hoặc để ức chế sự phát triển vi sinh vật bên trong chế phẩm này.

Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập phương pháp sản xuất chế phẩm kháng nguyên PCV-2 bao gồm các bước: i) thu chất lỏng thứ nhất chứa kháng nguyên PCV-2, ii) loại bỏ ít nhất một phần chất lỏng thứ nhất ra khỏi kháng nguyên PCV-2, bao gồm thêm bước trộn kháng nguyên PCV-2 còn lại sau bước ii) với thành phần khác được chọn từ nhóm bao gồm chất mang, chất phụ trợ, chất pha loãng, tá dược và hỗn hợp của chúng. Ưu tiên, trong đó thành phần khác là chất phụ trợ, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong đó chất phụ trợ là polyme của axit acrylic hoặc axit metacrylic, và thậm chí ưu tiên hơn nữa trong đó chất phụ trợ là Carbomer. Ưu tiên, phần của chất lỏng thứ nhất loại bỏ ra khỏi kháng nguyên PCV-2 bằng sự trao đổi một phần chất lỏng thứ nhất với chất lỏng thứ hai. Sự trao đổi ưu tiên được thực hiện sao cho bao gồm bước a) bổ sung chất lỏng thứ hai vào chất lỏng thứ nhất mà chứa kháng nguyên PCV-2 và b) cô đặc kháng nguyên PCV-2, ưu tiên từ 3 lần đến 50 lần, ưu tiên hơn nữa từ 4 lần đến 20 lần, và thậm chí ưu tiên hơn nữa từ 7 lần đến 10 lần so với thể tích của chất lỏng thứ nhất bằng cách loại bỏ phần chất lỏng thứ nhất và thứ hai ra khỏi kháng nguyên PCV-2. Ưu tiên, bước bổ sung chất lỏng và bước cô đặc được thực hiện nhiều lần, ưu tiên

hai lần, thậm chí ưu tiên hơn nữa ba lần. Trong những trường hợp này, không chỉ chất lỏng thứ nhất mà cả hỗn hợp của chất lỏng thứ nhất và thứ hai cũng được loại bỏ. Ưu tiên, mỗi bước bổ sung chất lỏng được thực hiện về cơ bản đồng thời hoặc tuần tự như mô tả ở trên. Khi bước cô đặc và bước bổ sung chất lỏng được thực hiện liên tục, trình tự các bước không quan trọng. Hơn thế nữa, bước cô đặc ưu tiên được thực hiện bằng cách lọc - ưu tiên lọc màng và/hoặc siêu lọc, sử dụng bộ lọc, mà ưu tiên chứa màng bán thấm. Màng bán thấm ưu tiên có kích thước lỗ trung bình nhỏ hơn kháng nguyên PCV-2 và ngăn đường đi của ít nhất 90% kháng nguyên PCV-2 qua các lỗ của màng bán thấm và giữ kháng nguyên PCV-2 lại bên trong bộ lọc để thu lại hoặc thu hồi. Ưu tiên, kích thước lỗ trung bình của màng bán thấm hoặc của bộ lọc bất kỳ mà được sử dụng ở đây, ngăn đường đi của ít nhất 90% protein có kích thước từ 50kDa đến 500kDa, ưu tiên hơn, ít nhất 90% protein có kích thước từ 75kDa đến 400kDa, và ưu tiên nhất ít nhất 90% protein có kích thước từ 100kDa đến 300kDa. Lỗ này được ưu tiên, khi kháng nguyên PCV-2 được sản xuất virus hoàn toàn hoặc hạt tương tự virus.

Kháng nguyên PCV-2 được sử dụng trong các phương pháp đã mô tả ở trên có thể là kháng nguyên PCV-2 được xác định ở đây. Ưu tiên, kháng nguyên PCV-2 bao gồm protein ORF-2 của PCV-2, ưu tiên hơn nữa protein ORF-2 tái tổ hợp của PCV-2, và thậm chí ưu tiên hơn nữa hạt tương tự virus của protein ORF-2, và thậm chí ưu tiên hơn nữa kháng nguyên có trong INGELVAC CIRCOFLEX®. Do đó, theo khía cạnh khác của sáng chế, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất chế phẩm kháng nguyên PCV-2 bao gồm các bước: i) thu chất lỏng thứ nhất chứa kháng nguyên PCV-2, ii) loại bỏ ít nhất một phần chất lỏng thứ nhất ra khỏi kháng nguyên PCV-2 này, trong đó kháng nguyên PCV-2 bao gồm protein ORF-2 của PCV-2, ưu tiên hơn protein ORF-2 tái tổ hợp của PCV-2, và ưu tiên hơn nữa hạt dạng virus của protein ORF-2. Ưu tiên, phần của chất lỏng thứ nhất loại bỏ ra khỏi kháng nguyên PCV-2 bằng sự trao đổi một phần chất lỏng thứ nhất với chất lỏng thứ hai. Sự trao đổi ưu tiên được thực hiện sao cho bao gồm bước a) bổ sung chất lỏng thứ hai vào chất lỏng thứ nhất mà chứa kháng nguyên PCV-2 và b) cô đặc kháng nguyên PCV-2, ưu tiên từ 3 lần đến 50 lần, ưu tiên hơn nữa từ 4 lần đến 20 lần, và thậm chí ưu tiên hơn nữa từ 7 lần đến 10 lần so với thể tích của chất lỏng thứ nhất bằng cách loại bỏ phần chất lỏng thứ nhất và thứ hai ra khỏi kháng nguyên PCV-2.

Ưu tiên, bước bổ sung chất lỏng và bước cô đặc được thực hiện nhiều lần, ưu tiên hai lần, thậm chí ưu tiên hơn nữa ba lần. Trong những trường hợp này, không chỉ chất lỏng thứ nhất mà cả hỗn hợp của chất lỏng thứ nhất và thứ hai cũng được loại bỏ. Ưu tiên, mỗi bước bổ sung chất lỏng được thực hiện về cơ bản đồng thời hoặc tuần tự như mô tả ở trên. Khi bước cô đặc và bước bổ sung chất lỏng được thực hiện liên tục, trình tự các bước không quan trọng. Hơn thế nữa, bước cô đặc ưu tiên được thực hiện bằng cách lọc - ưu tiên lọc màng và/hoặc siêu lọc, sử dụng bộ lọc, mà ưu tiên chứa màng bán thấm. Màng bán thấm ưu tiên có kích thước lỗ trung bình nhỏ hơn kháng nguyên PCV-2 và ngăn đường đi của ít nhất 90% kháng nguyên PCV-2 qua các lỗ của màng bán thấm và giữ kháng nguyên PCV-2 lại bên trong bộ lọc để thu lại hoặc thu hồi. Ưu tiên, kích thước lỗ trung bình của màng bán thấm hoặc của bộ lọc bất kỳ mà được sử dụng ở đây, ngăn đường đi của ít nhất 90% protein có kích thước từ 50kDa đến 500kDa, ưu tiên hơn, ít nhất 90% protein có kích thước từ 75kDa đến 400kDa, và ưu tiên nhất ít nhất 90% protein có kích thước từ 100kDa đến 300kDa. Lỗ này được ưu tiên, khi kháng nguyên PCV-2 được sản xuất virus hoàn toàn hoặc hạt tương tự virus.

Chất lỏng thứ nhất chứa kháng nguyên PCV-2 được sử dụng có thể thu được bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực. Ưu tiên, chất lỏng thứ nhất chứa kháng nguyên PCV-2 cũng như kháng nguyên PCV-2 có thể thu được bằng phương pháp bất kỳ được mô tả trong WO2006/072065. Cụ thể, kháng nguyên PCV-2, khi được biểu hiện tái tổ hợp *in vitro* ở tế bào vật chủ, có thể thu được qua vector virus, ưu tiên vector virus baculovirus tái tổ hợp, chứa và biểu hiện kháng nguyên PCV-2, ưu tiên, PCV-2 ORF-2.

Vector và phương pháp tạo ra và/hoặc sử dụng vector (hoặc thể tái tổ hợp) để biểu hiện kháng nguyên PCV-2, ưu tiên kháng nguyên PCV-2 ORF2 có thể bằng hoặc tương tự phương pháp được bộc lộ trong: patent U.S các số 4,603,112, 4,769,330, 5,174,993, 5,505,941, 5,338,683, 5,494,807, 4,722,848, 5,942,235, 5,364,773, 5,762,938, 5,770,212, 5,942,235, 382,425, WO 94/16716, WO 96/39491, WO 95/30018, Paoletti, "Applications of pox virus vectors to vaccination: An update, "PNAS USA 93: 11349-11353, October 1996, Moss, "Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety," PNAS USA 93: 11341-11348, October 1996, Smith et al., U. S. Patent No. 4,745,051, (recombinant

baculovirus), Richardson, C.D. (Editor), Methods in Molecular Biology 39, "Baculovirus Expression Protocols" (1995 Humana Press Inc.), Smith et al., "Production of Human Beta Interferon in Insect Cells Infected with a Baculovirus Expression Vector", Molecular and Cellular Biology, Dec., 1983, Vol. 3, No. 12, p. 2156-2165; Pennock et al., "Strong and Regulated Expression of Escherichia coli B-Galactosidase in Infect Cells with a Baculovirus vector, "Molecular and Cellular Biology Mar. 1984, Vol. 4, No. 3, p. 399-406; EPA0 370 573, U. S. application No. 920,197, filed October 16,1986, EP Patent publication No. 265785, U. S. Patent No. 4,769,331 (recombinant herpesvirus), Roizman, "The function of herpes simplex virus genes: A primer for genetic engineering of novel vectors," PNAS USA 93:11307-11312, October 1996, Andreansky et al., "The application of genetically engineered herpes simplex viruses to the treatment of experimental brain tumors," PNAS USA 93: 11313-11318, October 1996, Robertson et al. "Epstein-Barr virus vectors for gene delivery to B lymphocytes", PNAS USA 93: 11334-11340, October 1996, Frolov et al., "Alphavirus-based expression vectors: Strategies and applications," PNAS USA 93: 11371-11377, October 1996, Kitson et al., J. Virol. 65,3068-3075,1991; Patent US các số 5,591,439, 5,552,143, WO 98/00166, đơn US số seri 08/675,556, và 08/675,566 cả hai được nộp ngày 3 tháng 7 năm 1996 (adenovirus tái tổ hợp), Grunhaus et al., 1992,"Adenovirus as cloning vectors," Seminars in Virology (Vol. 3) p. 237-52, 1993, Ballay et al. EMBO Journal, vol. 4, p. 3861-65,Graham, Tibtech 8,85-87, April, 1990, Prevec et al., J. Gen Virol. 70,42434, PCT WO 91/11525, Felgner et al. (1994), J. Biol. Chem. 269,2550-2561, Science, 259: 1745-49,1993 and McClements et al., "Immunization with DNA vaccines encoding glycoprotein D or glycoprotein B, alone or in combination, induces protective immunity in animal models of herpes simplex virus-2 disease", PNAS USA 93: 11414-11420, October 1996, và Patent US các số 5,591,639, 5,589,466, và 5,580,859, cũng như WO 90/11092, WO93/19183, WO94/21797, WO95/11307, WO95/20660, Tang et al., Nature and Furth et al. Analytical Biochemistry, liên quan đến các vector biểu hiện ADN. Xem WO 98/33510; Ju et al., Diabetologia, 41: 736-739,1998 (lentiviral expression system); Sanford et al., Patent US số 4,945,050; Fischbach et al. (Intracel), WO 90/01543; Robinson et al., seminars in Immunology vol. 9, pp. 271-283 (1997), (DNA vector systems); Szoka et al., Patent US số (method of inserting DNA into living cells); McCormick et al.,Patent

US số 5,677,178 (use of cytopathic viruses); và Patent US số 5,928,913 (vectors for gene delivery), cũng như các tài liệu khác đã nêu ở đây. Sự biểu hiện của kháng nguyên PCV-2 ORF2 trong các tế bào côn trùng được mô tả, ví dụ, trong WO 06/072065. Kháng nguyên ORF2 PCV-2 tinh chế theo sáng chế có thể thu được bằng nhiều phương pháp đã biết trong lĩnh vực. Các phương pháp ưu tiên là các phương pháp được mô tả ở đây. Kháng thể ORF2 PCV-2 có thể được sản xuất tái tổ hợp *in vitro* bằng phương pháp bao gồm các bước: i) trong canh trường để các tế bào dễ bị tác động nhiễm vector virus tái tổ hợp chứa trình tự mã hóa ORF2 PCV-2, trong đó protein ORF2 PCV-2 được biểu hiện bởi vector virus tái tổ hợp, và ii) sau đó thu hồi kháng nguyên ORF2 PCV-2 từ môi trường nuôi cấy tế bào. Kháng nguyên ORF2 PCV-2 được thu hồi bằng cách thu toàn bộ (tức là nguyên vẹn) tế bào SF+ biểu hiện kháng nguyên ORF2 PCV-2.

Do đó, theo khía cạnh khác của sáng chế, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất chế phẩm kháng nguyên PCV-2 bao gồm các bước: i) thu chất lỏng thứ nhất chứa kháng nguyên PCV-2, ii) loại bỏ ít nhất một phần chất lỏng thứ nhất ra khỏi kháng nguyên PCV-2, trong đó kháng nguyên PCV-2 thu được qua vector virus, ưu tiên vector virus baculovirus tái tổ hợp, chứa và biểu hiện kháng nguyên PCV-2, ưu tiên ORF-2 PCV-2, và trong đó kháng nguyên PCV-2 bao gồm protein ORF-2 của PCV-2, ưu tiên hơn protein ORF-2 tái tổ hợp của PCV-2, và ưu tiên hơn nữa hạt tương tự virus của protein ORF-2. Khi vector virus, cụ thể baculovirus tái tổ hợp chứa và biểu hiện kháng nguyên PCV-2 được sử dụng để tạo ra/thu kháng nguyên PCV-2, phương pháp đã mô tả ở trên bao gồm thêm bước bất hoạt vector virus, ưu tiên vector virus baculovirus tái tổ hợp bằng chất bất hoạt ADN, ưu tiên trong sự có mặt của etylenimin hai thành phần từ 1 đến 20mM. Ưu tiên, bước bất hoạt được thực hiện sau khi ít nhất một phần của chất lỏng thứ nhất được loại bỏ ra khỏi kháng nguyên PCV-2, ưu tiên hơn sau khi kháng nguyên PCV-2 được thu lại. Ưu tiên hơn nữa, bước bất hoạt được thực hiện sau khi phần chất lỏng thứ nhất được loại bỏ ra khỏi kháng nguyên PCV-2 bằng sự trao đổi một phần chất lỏng thứ nhất với chất lỏng thứ hai. Khi sự trao đổi của phần chất lỏng thứ nhất với chất lỏng thứ hai được thực hiện sao cho bao gồm bước a) bổ sung chất lỏng thứ hai vào chất lỏng thứ nhất mà chứa kháng nguyên PCV-2 và b) cô đặc kháng nguyên PCV-2, ưu tiên từ 3 lần đến 50 lần, ưu tiên hơn nữa từ 4 lần đến 20 lần, và thậm chí ưu tiên hơn nữa từ 7 lần đến 10 lần so với thể tích của chất lỏng thứ nhất

bằng cách loại bỏ phần chất lỏng thứ nhất và thứ hai ra khỏi kháng nguyên PCV-2, bước bất hoạt được thực hiện sau bước cô đặc. Khi bước bổ sung chất lỏng và bước cô đặc được thực hiện nhiều lần, ưu tiên hai lần, thậm chí ưu tiên nửa ba lần, bước bất hoạt được thực hiện sau bước bổ sung chất lỏng cuối cùng và bước cô đặc. Khi bước cô đặc được thực hiện bằng cách lọc - ưu tiên bằng phương pháp lọc màng và/hoặc siêu lọc, sử dụng bộ lọc, ưu tiên chứa màng bán thấm, bước bất hoạt được thực hiện sau bước lọc đã mô tả ở trên, ưu tiên sử dụng màng bán thấm. Màng bán thấm ưu tiên có kích thước lỗ trung bình nhỏ hơn kháng nguyên PCV-2 và ngăn đường đi của ít nhất 90% kháng nguyên PCV-2 qua các lỗ của màng bán thấm và giữ kháng nguyên PCV-2 lại bên trong bộ lọc để thu lại hoặc thu hồi. Ưu tiên, kích thước lỗ trung bình của màng bán thấm hoặc của bộ lọc bất kỳ mà được sử dụng ở đây, ngăn đường đi của ít nhất 90% protein có kích thước từ 50kDa đến 500kDa, ưu tiên hơn, ít nhất 90% protein có kích thước từ 75kDa đến 400kDa, và ưu tiên nhất ít nhất 90% protein có kích thước từ 100kDa đến 300kDa. Lỗ này được ưu tiên, khi kháng nguyên PCV-2 được sản xuất virus hoàn toàn hoặc hạt tương tự virus.

"Chất bất hoạt ADN", nhằm mục đích của sáng chế, chỉ chất hóa học bất kỳ mà khử hoạt tính của ADN, ưu tiên ADN của thể sinh bệnh để thể sinh bệnh này không thể gây ra sự nhiễm hoạt tính hoặc lây nhiễm hoặc tái bản, nhưng vẫn có khả năng gây ra đáp ứng miễn dịch ở đối tượng. Ưu tiên, chất bất hoạt ADN là formalin.

Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất chế phẩm kháng nguyên PCV-2 bao gồm các bước: i) thu chất lỏng thứ nhất chứa kháng nguyên PCV-2, ii) loại bỏ ít nhất một phần chất lỏng thứ nhất ra khỏi kháng nguyên PCV-2, trong đó kháng nguyên PCV-2 thu được qua vector virus, ưu tiên vector virus baculovirus tái tổ hợp, chứa và biểu hiện kháng nguyên PCV-2, ưu tiên ORF-2 PCV-2, trong đó phương pháp bao gồm thêm bước bất hoạt vector virus, ưu tiên vector virus baculovirus tái tổ hợp bằng chất bất hoạt ADN, ưu tiên trong sự có mặt của etylenimin hai thành phần từ 1 đến 20mM, và trong đó kháng nguyên PCV-2 bao gồm protein ORF-2 của PCV-2, ưu tiên hơn protein ORF-2 tái tổ hợp của PCV-2, và ưu tiên hơn nửa hạt tương tự virus của protein ORF-2. Ưu tiên, bước bất hoạt được thực hiện sau khi ít nhất một phần của chất lỏng thứ nhất được loại bỏ ra khỏi kháng nguyên PCV-2, ưu tiên hơn sau khi kháng nguyên PCV-2 được thu lại. Ưu tiên hơn nữa, bước bất hoạt

được thực hiện sau khi phần chất lỏng thứ nhất được loại bỏ ra khỏi kháng nguyên PCV-2 bằng sự trao đổi một phần chất lỏng thứ nhất với chất lỏng thứ hai. Khi sự trao đổi của phần chất lỏng thứ nhất với chất lỏng thứ hai được thực hiện sao cho bao gồm bước a) bổ sung chất lỏng thứ hai vào chất lỏng thứ nhất mà chứa kháng nguyên PCV-2 và b) cô đặc kháng nguyên PCV-2, ưu tiên từ 3 lần đến 50 lần, ưu tiên hơn nữa từ 4 lần đến 20 lần, thậm chí ưu tiên hơn nữa từ 7 lần đến 10 lần so với thể tích của chất lỏng thứ nhất bằng cách loại bỏ phần chất lỏng thứ nhất và thứ hai ra khỏi kháng nguyên PCV-2, bước bất hoạt được thực hiện sau bước cô đặc. Khi bước bổ sung chất lỏng và bước cô đặc được thực hiện nhiều lần, ưu tiên hai lần, thậm chí ưu tiên nữa ba lần, bước bất hoạt được thực hiện sau bước bổ sung chất lỏng cuối cùng và bước cô đặc. Khi bước cô đặc được thực hiện bằng cách lọc - ưu tiên bằng phương pháp lọc màng và/hoặc siêu lọc, sử dụng bộ lọc, ưu tiên chứa màng bán thấm, bước bất hoạt được thực hiện sau bước lọc đã mô tả ở trên, ưu tiên sử dụng màng bán thấm. Màng bán thấm ưu tiên có kích thước lỗ trung bình nhỏ hơn kháng nguyên PCV-2 và ngăn đường đi của ít nhất 90% kháng nguyên PCV-2 qua các lỗ của màng bán thấm và giữ kháng nguyên PCV-2 lại bên trong bộ lọc để thu lại hoặc thu hồi. Ưu tiên, kích thước lỗ trung bình của màng bán thấm hoặc của bộ lọc bất kỳ mà được sử dụng ở đây, ngăn đường đi của ít nhất 90% protein có kích thước từ 50kDa đến 500kDa, ưu tiên hơn, ít nhất 90% protein có kích thước từ 75kDa đến 400kDa, và ưu tiên nhất ít nhất 90% protein có kích thước từ 100kDa đến 300kDa. Lỗ này được ưu tiên, khi kháng nguyên PCV-2 được sản xuất virut hoàn toàn hoặc hạt tương tự virut.

Trong trường hợp chất bất hoạt ADN được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế, phương pháp này còn bao gồm bước bổ sung lượng chất mà trung hòa chất bất hoạt ADN, lượng này tương đương với lượng chất bất hoạt ADN trong đó chất trung hòa chất bất hoạt ADN bao gồm dung dịch natri thiosulfat được cô đặc tới nồng độ cuối từ khoảng 1 đến 20mM và trong đó chất bất hoạt ADN là BEI. Ưu tiên, bước bất hoạt được thực hiện sau khi ít nhất một phần của chất lỏng thứ nhất được loại bỏ ra khỏi kháng nguyên PCV-2.

"Chất trung hòa chất bất hoạt" hoặc "chất trung hòa", như được sử dụng ở đây, chỉ chất bất kỳ có khả năng trung hòa các chất bất hoạt được nêu ở trên để chất bất

hoạt không còn có khả năng bất hoạt ADN. Chất trung hòa chất bất hoạt ưu tiên là natri thiosulfat.

Do đó, theo một phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất chế phẩm kháng nguyên PCV-2 bao gồm các bước: i) thu kháng nguyên PCV-2 trong chất lỏng thứ nhất trong đó kháng nguyên PCV-2 thu được qua vector virus, ưu tiên vector virus baculovirus tái tổ hợp, chứa và biểu hiện kháng nguyên PCV-2, ưu tiên, PCV-2 ORF-2, và trong đó kháng nguyên PCV-2 bao gồm protein ORF-2 của PCV-2, ưu tiên hơn protein ORF-2 tái tổ hợp của PCV-2, và ưu tiên hơn nữa hạt tương tự virus của protein ORF-2; ii) loại bỏ ít nhất một phần chất lỏng từ kháng nguyên PCV-2; iii) bất hoạt vector virus baculovirus tái tổ hợp bằng chất bất hoạt ADN, ưu tiên trong sự có mặt của etylenimin hai thành phần từ khoảng 1 đến khoảng 20mM; iv) bổ sung lượng chất trung hòa mà trung hòa chất bất hoạt, lượng chất trung hòa này tương đương với lượng chất bất hoạt, trong đó chất trung hòa ưu tiên bao gồm dung dịch natri thiosulfat ưu tiên được cô đặc tới nồng độ cuối khoảng từ 1 đến khoảng 20mM và trong đó chất bất hoạt ưu tiên gồm BEI. Ưu tiên, bước bất hoạt và trung hòa được thực hiện sau khi ít nhất một phần của chất lỏng thứ nhất được loại bỏ ra khỏi kháng nguyên PCV-2, ưu tiên hơn sau khi kháng nguyên PCV-2 được thu lại. Ưu tiên hơn nữa, bước bất hoạt và trung hòa được thực hiện sau khi phần chất lỏng thứ nhất được loại bỏ ra khỏi kháng nguyên PCV-2 bằng sự trao đổi một phần chất lỏng thứ nhất với chất lỏng thứ hai. Khi sự trao đổi của phần chất lỏng thứ nhất với chất lỏng thứ hai được thực hiện sao cho bao gồm bước a) bổ sung chất lỏng thứ hai vào chất lỏng thứ nhất mà chứa kháng nguyên PCV-2 và b) cô đặc kháng nguyên PCV-2, ưu tiên từ 3 lần đến 50 lần, ưu tiên hơn nữa từ 4 lần đến 20 lần, và thậm chí ưu tiên hơn nữa từ 7 lần đến 10 lần so với thể tích của chất lỏng thứ nhất bằng cách loại bỏ phần chất lỏng thứ nhất và thứ hai ra khỏi kháng nguyên PCV-2, bước bất hoạt và trung hòa được thực hiện sau bước cô đặc. Khi bước bổ sung chất lỏng và bước cô đặc được thực hiện nhiều lần, ưu tiên hai lần, thậm chí ưu tiên hơn nữa ba lần, bước bất hoạt và trung hòa được thực hiện sau bước bổ sung chất lỏng cuối cùng và bước cô đặc. Khi bước cô đặc được thực hiện bằng cách lọc - ưu tiên bằng phương pháp lọc màng và/hoặc siêu lọc, sử dụng bộ lọc, ưu tiên chứa màng bán thấm, bước bất hoạt và trung hòa được thực hiện sau bước lọc đã mô tả ở trên, ưu tiên sử dụng màng bán thấm. Màng bán thấm ưu tiên có kích thước lỗ trung bình nhỏ hơn kháng nguyên PCV-2 và ngăn đường đi của ít nhất 90% kháng nguyên

PCV-2 qua các lỗ của màng bán thấm và giữ kháng nguyên PCV-2 lại bên trong bộ lọc để thu lại hoặc thu hồi. Ưu tiên, kích thước lỗ trung bình của màng bán thấm hoặc của bộ lọc bất kỳ mà được sử dụng ở đây, ngăn đường đi của ít nhất 90% protein có kích thước từ 50kDa đến 500kDa, ưu tiên hơn, ít nhất 90% protein có kích thước từ 75kDa đến 400kDa, và ưu tiên nhất ít nhất 90% protein có kích thước từ 100kDa đến 300kDa. Lỗ này được ưu tiên, khi kháng nguyên PCV-2 được sản xuất virus hoàn toàn hoặc hạt tương tự virus.

Theo khía cạnh khác của sáng chế, phương pháp được mô tả ở trên còn bao gồm bước trộn kháng nguyên PCV-2 thu được sau các bước bất hoạt và trung hòa với thành phần khác được chọn từ nhóm bao gồm các chất mang, chất phụ trợ, chất làm loãng, tá dược được dụng và các hỗn hợp của chúng. Do đó, theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất chế phẩm kháng nguyên PCV-2 bao gồm các bước: i) thu kháng nguyên PCV-2 trong chất lỏng thứ nhất, trong đó kháng nguyên PCV-2 thu được qua vector virus, ưu tiên vector virus baculovirus tái tổ hợp, chứa và biểu hiện kháng nguyên PCV-2, ưu tiên, PCV-2 ORF-2, và trong đó kháng nguyên PCV-2 bao gồm protein ORF-2 của PCV-2, ưu tiên hơn protein ORF-2 tái tổ hợp của PCV-2, và ưu tiên hơn nữa hạt tương tự virus của protein ORF-2; ii) loại bỏ ít nhất một phần chất lỏng từ kháng nguyên PCV-2; iii) bất hoạt vector virus baculovirus tái tổ hợp bằng chất bất hoạt ADN, ưu tiên trong sự có mặt của etylenimin hai thành phần từ khoảng 1 đến khoảng 20mM; iv) bổ sung lượng chất trung hòa mà trung hòa chất bất hoạt, lượng chất trung hòa này ưu tiên tương đương với lượng chất bất hoạt, trong đó chất trung hòa ưu tiên bao gồm dung dịch natri thiosulfat ưu tiên được cô đặc tới nồng độ cuối khoảng từ 1 đến khoảng 20mM và trong đó chất bất hoạt ưu tiên gồm BEI; và v) trộn kháng nguyên PCV-2 thu được trong bước iv) với thành phần khác được chọn từ nhóm bao gồm chất mang, chất phụ trợ, chất làm loãng, tá dược được dụng và hỗn hợp của chúng. Ưu tiên, kháng nguyên PCV-2 bao gồm protein ORF-2 của PCV-2, ưu tiên hơn nữa protein ORF-2 tái tổ hợp của PCV-2, và thậm chí ưu tiên hơn nữa hạt tương tự virus của protein ORF-2. Ưu tiên, trong bước ii), phần của chất lỏng thứ nhất được loại bỏ ra khỏi kháng nguyên PCV-2 bằng sự trao đổi một phần chất lỏng thứ nhất với chất lỏng thứ hai. Sự trao đổi ưu tiên được thực hiện sao cho bao gồm bước: a) bổ sung chất lỏng thứ hai vào chất lỏng thứ nhất mà chứa kháng nguyên PCV-2 và b) cô đặc kháng nguyên PCV-2, ưu tiên từ 3 lần đến 50 lần, ưu tiên hơn nữa từ 4 lần

đến 20 lần, và thậm chí ưu tiên hơn nữa từ 7 lần đến 10 lần so với thể tích của chất lỏng thứ nhất bằng cách loại bỏ phần chất lỏng thứ nhất và thứ hai ra khỏi kháng nguyên PCV-2. Ưu tiên, bước bổ sung chất lỏng và bước cô đặc được thực hiện nhiều lần, ưu tiên hai lần, thậm chí ưu tiên hơn nữa ba lần. Trong trường hợp này, không chỉ chất lỏng thứ nhất mà cả hỗn hợp của chất lỏng thứ nhất và thứ hai cũng được loại bỏ. Ưu tiên, mỗi bước bổ sung chất lỏng được thực hiện về cơ bản đồng thời hoặc tuần tự như mô tả ở trên. Khi bước cô đặc và bước bổ sung chất lỏng được thực hiện liên tục, trình tự các bước không quan trọng. Hơn thế nữa, bước cô đặc ưu tiên được thực hiện bằng cách lọc - ưu tiên lọc màng và/hoặc siêu lọc, sử dụng bộ lọc, mà ưu tiên chứa màng bán thấm. Màng bán thấm ưu tiên có kích thước lỗ trung bình nhỏ hơn kháng nguyên PCV-2 và ngăn đường đi của ít nhất 90% kháng nguyên PCV-2 qua các lỗ của màng bán thấm và giữ kháng nguyên PCV-2 lại bên trong bộ lọc để thu lại hoặc thu hồi. Ưu tiên, kích thước lỗ trung bình của màng bán thấm hoặc của bộ lọc bất kỳ mà được sử dụng ở đây, ngăn đường đi của ít nhất 90% protein có kích thước từ 50kDa đến 500kDa, ưu tiên hơn, ít nhất 90% protein có kích thước từ 75kDa đến 400kDa, và ưu tiên nhất ít nhất 90% protein có kích thước từ 100kDa đến 300kDa. Lỗ này được ưu tiên, khi kháng nguyên PCV-2 được sản xuất virus hoàn toàn hoặc hạt tương tự virus.

Theo khía cạnh khác, phương pháp bất kỳ đã mô tả ở trên để thu được kháng nguyên PCV-2 với hoạt tính diệt virus giảm có thể bao gồm bước tinh chế thêm để thu được kháng nguyên PCV-2 tinh chế. Ngạc nhiên khi phát hiện ra rằng chế phẩm kháng nguyên hoặc sinh miễn dịch chứa kháng nguyên PCV-2 tinh chế, ưu tiên trong tổ hợp với chất phụ trợ, không chỉ thể hiện hoạt tính diệt virus giảm như được mô tả ở đây, mà còn thể hiện tính sinh miễn dịch tăng so với chế phẩm sinh miễn dịch, mà không chứa kháng nguyên PCV-2 tinh chế, có nghĩa là chứa kháng nguyên PCV-2 không tinh chế hoặc thô.

Thuật ngữ kháng nguyên PCV-2 “tinh chế” có nghĩa là kháng nguyên PCV-2 được tinh chế trong chế phẩm tới mức lớn hơn 50% (trọng lượng/trọng lượng), ưu tiên lớn hơn 60% (trọng lượng/trọng lượng), ưu tiên lớn hơn 70% (trọng lượng/trọng lượng), ưu tiên lớn hơn 80% (trọng lượng/trọng lượng), ưu tiên lớn hơn 85% (trọng lượng/trọng lượng), ưu tiên hơn lớn hơn 90% (trọng lượng/trọng lượng), thậm chí ưu tiên hơn nữa lớn hơn 95% (trọng lượng/trọng lượng) so với tổng lượng protein có

trong chế phẩm sinh miễn dịch. Nói một cách khác, nếu chế phẩm chứa kháng nguyên PCV-2 với độ tinh khiết 80% (trọng lượng/trọng lượng), chế phẩm này chứa không quá 20% (trọng lượng/trọng lượng) protein không phải PCV-2 so với tổng lượng protein có trong chế phẩm sinh miễn dịch. Ưu tiên, độ tinh khiết được đo trong chế phẩm, tức là trong chế phẩm sinh miễn dịch trước khi trộn với chất phụ trợ hoặc tá được bất kỳ khác hoặc chất bất hoạt. Tuy nhiên, nếu chất phụ trợ được sử dụng trong chế phẩm sinh miễn dịch cuối cùng là chất phụ trợ không chứa protein, sự bổ sung chất phụ trợ không có tác dụng bất kỳ về giá trị tinh khiết. Độ tinh khiết của kháng nguyên PCV-2 có thể được ước tính bằng các phương pháp chuẩn đã biết đối với người có trình độ trong lĩnh vực, ví dụ bằng Imperial Protein Stain (Pierce) sau sự phân tách SDS-PAGE, sắc ký khí, phân tích HPLC, v.v.. Phương pháp ưu tiên theo sáng chế để ước tính sự tinh khiết hoặc độ tinh khiết của kháng nguyên PCV-2 trong chế phẩm, tức là trong chế phẩm sinh miễn dịch là nhuộm màu Imperial Protein Stain (Pierce), mà được thực hiện như sau: chế phẩm bao gồm kháng nguyên PCV-2 được phân tách thông qua NuPAGE 10% Bis-Tris gels (Invitrogen) sử dụng hệ đệm NuPAGE MOPS (Invitrogen). Các gel được chạy dưới điều kiện làm biến chất (tất cả các đệm có SDS trong đó) và khử (đệm tải có 2-mercaptoethanol). Sau khi tải các gel với các mẫu, các gel được chạy trong khoảng thời gian 55 phút tại hằng số 200 Volt. Sau khi chạy xong, các gel được nhuộm màu sử dụng Imperial Protein Stain (Pierce) và được khử nhuộm màu theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Ngược lại, thuật ngữ kháng nguyên PCV-2 "không tinh chế" hoặc "thô" chỉ chế phẩm thô chứa kháng nguyên PCV-2. Kháng nguyên PCV-2 thường được sản xuất trong môi trường nuôi cấy tế bào *in vitro*. Do đó, kháng nguyên PCV-2 thô chỉ hỗn hợp của kháng nguyên PCV-2 và môi trường nuôi cấy tế bào hoặc nguyên liệu cho môi trường nuôi cấy tế bào được sử dụng cho sự sản xuất kháng nguyên PCV-2. Hơn thế nữa, kháng nguyên PCV-2 không tinh chế còn có nghĩa là kháng nguyên PCV-2 tinh chế một phần ưu tiên có độ tinh chế nhỏ hơn 50% (trọng lượng/trọng lượng), ưu tiên hơn nhỏ hơn 40% (trọng lượng/trọng lượng), thậm chí ưu tiên hơn nhỏ hơn 30% (trọng lượng/trọng lượng), thậm chí ưu tiên hơn nữa nhỏ hơn 20% (trọng lượng/trọng lượng) so với tổng lượng protein có trong chế phẩm sinh miễn dịch.

Ngoài ra, các thuật ngữ "tính sinh miễn dịch tăng hoặc tính sinh miễn dịch cải

thiện" như được sử dụng ở đây, có nghĩa là đáp ứng miễn dịch được tạo ra bởi chế phẩm sinh miễn dịch chứa kháng nguyên đang nói tới được tăng so với chế phẩm sinh miễn dịch tham chiếu chứa kháng nguyên khác nhau hoặc độ tinh khiết khác nhau của kháng nguyên, cho dù đáp ứng miễn dịch này là đáp ứng miễn dịch qua tế bào và/hoặc qua kháng thể. Theo khía cạnh được ưu tiên, thuật ngữ tính sinh miễn dịch tăng hoặc tính sinh miễn dịch cải thiện có nghĩa là đáp ứng miễn dịch qua kháng thể được gây ra bởi chế phẩm sinh miễn dịch chứa kháng nguyên đang nói tới được tăng so với chế phẩm sinh miễn dịch tham chiếu chứa kháng nguyên khác hoặc độ tinh khiết khác của kháng nguyên. Đáp ứng miễn dịch qua kháng thể có nghĩa là sự sản xuất các kháng thể, mà đặc hiệu đối với kháng nguyên đang nói tới được tăng so với sự sản xuất kháng thể gây ra bởi chế phẩm sinh miễn dịch tham chiếu chứa kháng nguyên khác hoặc độ tinh khiết khác của kháng nguyên.

Thuật ngữ “tăng” có nghĩa là đáp ứng miễn dịch qua tế bào và/hoặc kháng thể được tăng lên ít nhất 10%, ưu tiên lên ít nhất 20%, ưu tiên hơn lên ít nhất 30%, thậm chí ưu tiên hơn nữa lên ít nhất 40%, thậm chí ưu tiên hơn nữa lên ít nhất 50%, thậm chí ưu tiên hơn nữa lên ít nhất 75%, ưu tiên nhất lên ít nhất 100% so với đáp ứng miễn dịch qua tế bào và/hoặc kháng thể gây ra bởi chế phẩm sinh miễn dịch tham chiếu chứa kháng nguyên khác hoặc độ tinh khiết khác của kháng nguyên.

Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực sẽ biết cách đánh giá đáp ứng miễn dịch qua tế bào và/hoặc kháng thể. Cụ thể, người có trình độ trung bình trong lĩnh vực dễ dàng hoặc là so sánh đáp ứng miễn dịch qua tế bào của chế phẩm sinh miễn dịch đang nói tới với đáp ứng miễn dịch qua tế bào của chế phẩm sinh miễn dịch tham chiếu, hoặc là so sánh đáp ứng miễn dịch qua kháng thể của chế phẩm sinh miễn dịch đang nói tới với đáp ứng miễn dịch của chế phẩm tham chiếu, nhưng không so sánh được đáp ứng miễn dịch do tế bào gây ra của chế phẩm sinh miễn dịch đang nói tới với đáp ứng miễn dịch do kháng thể gây ra. Hơn thế nữa, đáp ứng miễn dịch qua tế bào có thể được đo, ví dụ, bằng cách đo sự hoạt hóa của các tế bào T gây độc tế bào bằng chế phẩm sinh miễn dịch/kháng nguyên đang nói tới. Đáp ứng miễn dịch qua kháng thể có thể được đo, ví dụ, bằng cách đo lượng kháng thể đặc hiệu kháng nguyên, được tạo ra do sự sử dụng chế phẩm kháng nguyên chứa kháng nguyên cho động vật. Đáp ứng miễn dịch qua tế bào và/hoặc kháng thể có thể được đo, ví dụ, bằng cách sử dụng mô

hình chuột. Theo sáng chế, mô hình chuột được sử dụng là phương pháp tham chiếu.

Thuật ngữ "chế phẩm sinh miễn dịch" có nghĩa là, nhưng không giới hạn ở, chế phẩm sinh miễn dịch chứa ít nhất kháng nguyên mà tạo ra đáp ứng miễn dịch qua tế bào và/hoặc qua kháng thể trong vật chủ đối với kháng nguyên đang nói tới. Thông thường, "đáp ứng miễn dịch" bao gồm nhưng không giới hạn ở một hoặc nhiều tác dụng sau đây: sản xuất hoặc hoạt hoá các kháng thể, tế bào B, tế bào T hỗ trợ, tế bào T điều hoà, và/hoặc tế bào T gây độc và/hoặc tế bào T gamma-delta, hướng cụ thể đến một kháng nguyên hoặc các kháng nguyên có trong chế phẩm hoặc vaccin quan tâm. Ưu tiên, vật chủ sẽ thể hiện hoặc là đáp ứng miễn dịch trị liệu hoặc là đáp ứng gây miễn dịch bảo vệ để tính kháng sự lây nhiễm mới sẽ được tăng cường và/hoặc mức độ trầm trọng của bệnh được giảm bớt. Trong trường hợp này, chế phẩm sinh miễn dịch là "vaccin". Sự bảo vệ này sẽ được thể hiện bởi hoặc là sự giảm hoặc là thiếu triệu chứng thường biểu hiện bởi vật chủ bị nhiễm, thời gian hồi phục nhanh hơn và/hoặc chuẩn độ virus thấp hơn ở vật chủ bị nhiễm.

Sự tinh chế thêm của kháng nguyên PCV-2 có thể đạt được với các quy trình sắc ký, ưu tiên quy trình sắc ký hai bước. Nếu kháng nguyên PCV-2 được ghép vào thể tương tự virus (VLP), một bước, ưu tiên bước thứ nhất, ưu tiên sắc ký loại trừ kích thước (lọc gel), mà có thể được thực hiện, ví dụ, bằng cách sử dụng nền Sephacryl S300. Khi sử dụng HiPrep 26/60 Sephacryl S300HR ở quy mô phòng thí nghiệm, các cột được ưu tiên nhất. Tuy nhiên, các nền sắc ký loại trừ kích thước đã biết đối với người có trình độ trong lĩnh vực có thể được sử dụng, mà cho phép sự phân tách của PCV-2 ORF2 VLP từ chất lọc hoặc chất nổi lên trên bề mặt canh trường. Các nền tương tự được mô tả, ví dụ, trong E.L.V. Harris and S. Angel (eds.), Protein purification methods – a practical approach, IRL Press Oxford 1995). Sắc ký lọc gel có thể được tiến hành, ví dụ, bằng cách tải vào cột chế phẩm thô gồm kháng nguyên PCV-2 với lưu lượng 1,0ml/phút và rửa giải cột với 1,5 thể tích cột của dung dịch đệm gồm Tris 20mM, pH=6,5, 5mM DTT. Tuy nhiên, kháng nguyên PCV-2 ORF2 cũng có thể được tinh chế bằng cách sử dụng sắc ký ái lực, ví dụ, thông qua sự liên kết chọn lọc với kháng thể đặc hiệu ORF2 PCV-2, hoặc phương pháp bất kỳ đã biết đối với người có hiểu biết về lĩnh vực này.

Do đó, theo khía cạnh được ưu tiên, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất

chế phẩm kháng nguyên PCV-2 bao gồm các bước: i) thu chất lỏng thứ nhất chứa kháng nguyên PCV-2, ii) loại bỏ ít nhất một phần chất lỏng thứ nhất ra khỏi kháng nguyên PCV-2 và iii) tinh chế sản phẩm thu được ở bước ii) chứa kháng nguyên PCV-2, ưu tiên kháng nguyên PCV-2 ORF2 bằng quy trình sắc ký. Ưu tiên, sắc ký loại trừ kích thước được thực hiện như đã mô tả ở đây, ưu tiên như được mô tả trong Ví dụ 3. Ưu tiên, sự loại trừ kích thước dẫn đến chế phẩm sinh miễn dịch có độ tinh khiết lớn hơn 80% (trọng lượng/trọng lượng), ưu tiên lớn hơn 90% (trọng lượng/trọng lượng) so với tổng lượng protein có trong chế phẩm sinh miễn dịch trước khi trộn với chất phụ trợ. Độ tinh khiết có thể được ước tính bằng phương pháp nhuộm Imperial Protein Stain (Pierce) sau SDS PAGE qua NuPAGE 10% Bis-Tris gels (Invitrogen) sử dụng hệ đệm NuPAGE MOPS (Invitrogen).

Do đó, theo khía cạnh được ưu tiên, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất chế phẩm kháng nguyên PCV-2 bao gồm các bước: i) thu chất lỏng thứ nhất chứa kháng nguyên PCV-2, ii) loại bỏ ít nhất một phần chất lỏng thứ nhất ra khỏi kháng nguyên PCV-2 và iii) tinh chế sản phẩm thu được ở bước ii) bao gồm kháng nguyên PCV-2 bằng sắc ký loại trừ theo kích thước (lọc gel).

Để thu được độ tinh khiết cao hơn, bước sắc ký thứ hai có thể được thực hiện, tuy nhiên khác với bước sắc ký thứ nhất. Ví dụ, nếu bước tinh chế/bước sắc ký thứ nhất là bước loại trừ kích thước (lọc gel), bước thứ hai khác ở chỗ, ví dụ sắc ký ái lực, sắc ký trao đổi ion, v.v.. Ưu tiên, nếu bước thứ nhất để tinh chế kháng nguyên PCV-2, ưu tiên để tinh chế kháng nguyên ORF2 PCV-2 là sắc ký loại trừ kích thước (lọc gel), bước thứ hai có thể là sắc ký trao đổi ion, ưu tiên sắc ký trao đổi anion (AIEX). Nền sắc ký trao đổi anion ưu tiên để tinh chế kháng thể PCV-2, ưu tiên kháng thể ORF2 PCV-2 là Q Sepharosa. Trong quy mô nhỏ khoảng 50ml, sự sử dụng 5ml cột HiTrap Q Sepharose HP được ưu tiên nhất. Sắc ký trao đổi anion có thể được thực hiện, ví dụ, như được mô tả trong Ví dụ 3. Nói một cách ngắn gọn, khoảng 50ml phần thể tích rỗng từ bước sắc ký loại trừ kích thước có thể được tải lên trên cột AIEX tại lưu lượng 3,0ml/phút. Sau bước rửa, ví dụ, Tris 20mM, pH = 6,5, DTT 5mM để loại bỏ vật liệu không liên kết, protein có thể được rửa giải bằng bước đơn chứa 8 thể tích cột của đệm sau đây (Tris 20mM, pH=6,5, DTT 5mM, NaCl 1M). Dòng tiến từ bước chạy AIEX có thể được tải ngược lên trên cột Q Sepharosa và được rửa giải như đã mô tả ở trên để

tăng hiệu suất. Kỹ thuật hai bước này (bước loại trừ kích thước, sau đó là bước sắc ký trao đổi anion) phân tách hiệu quả kháng nguyên ORF2 PCV-2 từ hầu hết các thành phần protein khác của sản phẩm thu được từ canh trường.

Do đó, theo khía cạnh được ưu tiên, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất chế phẩm kháng nguyên PCV-2 bao gồm các bước: a) thu chất lỏng thứ nhất chứa kháng nguyên PCV-2, ii) loại bỏ ít nhất một phần chất lỏng thứ nhất ra khỏi kháng nguyên PCV-2 và iii) tinh chế sản phẩm thu được ở bước ii) bao gồm kháng nguyên PCV-2 bằng sắc ký hai bước. Ưu tiên, bước sắc ký thứ nhất khác bước sắc ký thứ hai. Nếu bước thứ nhất là sắc ký loại trừ kích thước (lọc gel), bước thứ hai có thể là sắc ký trao đổi ion, ưu tiên sắc ký trao đổi anion (AIEX). Ưu tiên, trong phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp đã mô tả ở trên, bao gồm một hoặc nhiều bước tinh chế khác để thu được kháng nguyên PCV-2 tinh chế, ưu tiên protein ORF-2 PCV-2, phần chất lỏng thứ nhất được loại bỏ ra khỏi kháng nguyên PCV-2 bởi sự trao đổi của phần chất lỏng thứ nhất với chất lỏng thứ hai. Sự trao đổi ưu tiên được thực hiện sao cho bao gồm bước a) bổ sung chất lỏng thứ hai vào chất lỏng thứ nhất mà chứa kháng nguyên PCV-2 và b) cô đặc kháng nguyên PCV-2, ưu tiên từ 3 lần đến 50 lần, ưu tiên hơn nữa từ 4 lần đến 20 lần, và thậm chí ưu tiên hơn nữa từ 7 lần đến 10 lần so với thể tích của chất lỏng thứ nhất bằng cách loại bỏ phần chất lỏng thứ nhất và thứ hai ra khỏi kháng nguyên PCV-2. Ưu tiên, bước bổ sung chất lỏng và bước cô đặc được thực hiện nhiều lần, ưu tiên hai lần, thậm chí ưu tiên hơn nữa ba lần. Trong những trường hợp này, không chỉ chất lỏng thứ nhất mà cả hỗn hợp của chất lỏng thứ nhất và thứ hai cũng được loại bỏ. Ưu tiên, mỗi bước bổ sung chất lỏng được thực hiện về cơ bản đồng thời hoặc tuần tự như mô tả ở trên. Khi bước cô đặc và bước bổ sung chất lỏng được thực hiện liên tục, trình tự các bước không quan trọng. Hơn thế nữa, bước cô đặc ưu tiên được thực hiện bằng cách lọc - ưu tiên lọc màng hoặc siêu lọc, sử dụng bộ lọc, mà ưu tiên chứa màng bán thấm. Màng bán thấm ưu tiên có kích thước lỗ trung bình nhỏ hơn kháng nguyên PCV-2 và ngăn đường đi của ít nhất 90% kháng nguyên PCV-2 qua các lỗ của màng bán thấm và giữ kháng nguyên PCV-2 lại bên trong bộ lọc để thu lại hoặc thu hồi. Ưu tiên, kích thước lỗ trung bình của màng bán thấm hoặc của bộ lọc bất kỳ mà được sử dụng ở đây, ngăn đường đi của ít nhất 90% protein có kích thước từ 50kDa đến 500kDa, ưu tiên hơn, ít nhất 90% protein có kích thước từ 75kDa đến 400kDa, và ưu tiên nhất ít nhất 90% protein có kích thước từ 100kDa đến 300kDa. Lỗ

này được ưu tiên, khi kháng nguyên PCV-2 được sản xuất virus hoàn toàn hoặc hạt tương tự virus. Trong các dạng ưu tiên, phương pháp sản xuất chế phẩm kháng nguyên PCV-2 đã mô tả ở trên bao gồm thêm các bước: i) thu kháng nguyên PCV-2 trong chất lỏng thứ nhất, trong đó kháng nguyên PCV-2 thu được qua vector virus, ưu tiên vector virus baculovirus tái tổ hợp, chứa và biểu hiện kháng nguyên PCV-2, ưu tiên, PCV-2 ORF-2, và trong đó kháng nguyên PCV-2 bao gồm protein ORF-2 của PCV-2, ưu tiên hơn protein ORF-2 tái tổ hợp của PCV-2, và ưu tiên hơn nữa hạt tương tự virus của protein ORF-2; ii) loại bỏ ít nhất một phần chất lỏng từ kháng nguyên PCV-2; iii) bất hoạt vector virus baculovirus tái tổ hợp bằng chất bất hoạt ADN, ưu tiên trong sự có mặt của etylenimin hai thành phần từ khoảng 1 đến khoảng 20mM; iv) bổ sung lượng chất trung hòa mà trung hòa chất bất hoạt, lượng chất trung hòa này tương đương với lượng chất bất hoạt, trong đó chất trung hòa ưu tiên bao gồm dung dịch natri thiosulfat ưu tiên được cô đặc tới nồng độ cuối khoảng từ 1 đến khoảng 20mM và trong đó chất bất hoạt ưu tiên gồm BEI; và v) trộn kháng nguyên PCV-2 thu được trong bước iv) với thành phần khác được chọn từ nhóm bao gồm chất mang, chất phụ trợ, chất làm loãng, tá dược được dùng và hỗn hợp của chúng. Sự tinh chế thêm, ưu tiên, phương pháp tinh chế hai bước bao gồm bước trước khi tinh chế dẫn đến chế phẩm sinh miễn dịch có độ tinh khiết lớn hơn 80% (trọng lượng/trọng lượng), ưu tiên lớn hơn 85% (trọng lượng/trọng lượng), thậm chí ưu tiên hơn nữa lớn hơn 90% (trọng lượng/trọng lượng), ưu tiên nhất lớn hơn 95% (trọng lượng/trọng lượng) so với tổng lượng protein có trong chế phẩm sinh miễn dịch trước khi trộn với chất phụ trợ bất kỳ.

Chế phẩm kháng nguyên PCV-2 được sản xuất bằng phương pháp đã mô tả ở đây gây ra sự hao hụt nhỏ hơn 1log TCID₅₀ của virus sống hoặc nhỏ hơn 1log CFU trên ml của vi khuẩn sống, khi virus sống hoặc vi khuẩn sống được trộn với chế phẩm kháng nguyên PCV-2 và được ủ trong khoảng thời gian 2 giờ hoặc lâu hơn, ưu tiên trong khoảng thời gian hơn 4 giờ, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 12 giờ, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 24 giờ, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 2 ngày, ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 4 ngày, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 7 ngày, ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 2 tuần, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 4 tuần, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 2 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 3 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa

trong khoảng thời gian hơn 4 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 6 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 9 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 12 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 18 tháng, ưu tiên nhất trong khoảng thời gian hơn 2 năm. Ưu tiên nhất, chế phẩm kháng nguyên PCV-2 được sản xuất bằng phương pháp đã mô tả ở đây gây ra sự hao hụt nhỏ hơn $0,9\log$ TCID₅₀ của virus sống hoặc nhỏ hơn $0,9\log$ CFU trên ml của vi khuẩn sống, khi virus sống hoặc vi khuẩn sống được trộn và ủ với chế phẩm kháng nguyên PCV-2 trong khoảng thời gian 2 giờ hoặc lâu hơn, ưu tiên trong khoảng thời gian hơn 4 giờ, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 12 giờ, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 24 giờ, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 2 ngày, ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 4 ngày, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 7 ngày, ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 2 tuần, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 4 tuần, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 2 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 3 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 4 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 6 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 9 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 12 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 18 tháng, ưu tiên nhất trong khoảng thời gian hơn 2 năm. Thậm chí ưu tiên hơn, chế phẩm kháng nguyên PCV-2 được sản xuất bằng phương pháp đã mô tả ở đây gây ra sự hao hụt nhỏ hơn $0,7\log$ TCID₅₀ trên ml của virus sống hoặc nhỏ hơn $0,7\log$ CFU trên ml của vi khuẩn sống, khi virus sống hoặc vi khuẩn sống được trộn và ủ với chế phẩm kháng nguyên PCV-2 trong khoảng thời gian 2 giờ hoặc lâu hơn, ưu tiên trong khoảng thời gian hơn 4 giờ, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 12 giờ, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 24 giờ, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 2 ngày, ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 4 ngày, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 7 ngày, ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 2 tuần, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 4 tuần, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 2 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 3 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 4 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 6 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 9 tháng, thậm

chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 12 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 18 tháng, ưu tiên nhất trong khoảng thời gian hơn 2 năm. Thậm chí ưu tiên hơn, chế phẩm kháng nguyên PCV-2 được sản xuất bằng phương pháp đã mô tả ở đây gây ra sự hao hụt nhỏ hơn 0,5log TCID₅₀ trên ml của virus sống hoặc nhỏ hơn 0,5log CFU trên ml của vi khuẩn sống, khi virus sống hoặc vi khuẩn sống được trộn và ủ với chế phẩm kháng nguyên PCV-2 trong khoảng thời gian 2 giờ hoặc lâu hơn, ưu tiên trong khoảng thời gian hơn 4 giờ, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 12 giờ, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 24 giờ, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 2 ngày, ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 4 ngày, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 7 ngày, ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 2 tuần, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 4 tuần, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 2 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 3 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 4 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 6 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 9 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 12 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 18 tháng, ưu tiên nhất trong khoảng thời gian hơn 2 năm. Thậm chí ưu tiên hơn, chế phẩm kháng nguyên PCV-2 được sản xuất bằng phương pháp đã mô tả ở đây gây ra sự hao hụt nhỏ hơn 0,3log TCID₅₀ trên ml của virus sống hoặc nhỏ hơn 0,3log CFU trên ml của vi khuẩn sống, khi virus sống hoặc vi khuẩn sống được trộn và ủ với chế phẩm kháng nguyên PCV-2 trong khoảng thời gian 2 giờ hoặc lâu hơn, ưu tiên trong khoảng thời gian hơn 4 giờ, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 12 giờ, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 24 giờ, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 2 ngày, ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 4 ngày, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 7 ngày, ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 2 tuần, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 4 tuần, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 2 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 3 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 4 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 6 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 9 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 12 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 18 tháng, ưu tiên nhất

trong khoảng thời gian hơn 2 năm. Virut sống có thể là loại virut sống bất kỳ, nhưng ưu tiên virut sống là virut PRRS, ưu tiên virut PRRS có số hiệu lưu giữ ATCC VR 2332. Vi khuẩn sống có thể là vi khuẩn bất kỳ, nhưng ưu tiên vi khuẩn *Mycoplasma hyopneumonia*, ưu tiên chủng J của *Mycoplasma hyopneumonia*. TCID₅₀ trên ml có thể được ước tính bằng thử nghiệm chuẩn độ trong ống nghiệm chuẩn mà cho phép ước tính lượng virut sống. CFU trên ml có thể được ước tính bằng thử nghiệm chuẩn độ trong ống nghiệm chuẩn mà cho phép ước tính lượng vi khuẩn sống. Thuật ngữ "trên ml" ưu tiên chỉ 1ml chất lưu. Kháng nguyên PCV-2 đã tinh chế này, không chỉ thể hiện hoạt tính diệt virut giảm, như được xác định ở đây, mà còn thể hiện tính sinh miễn dịch tăng so với kháng nguyên PCV-2 không tinh chế như được xác định ở đây, ưu tiên kháng nguyên PCV-2 tinh chế tăng đáp ứng miễn dịch qua tế bào và/hoặc qua kháng thể lên ít nhất 10%, ưu tiên lên ít nhất 20%, ưu tiên hơn lên ít nhất 30%, thậm chí ưu tiên hơn nữa lên ít nhất 40%, thậm chí ưu tiên hơn nữa lên ít nhất 50%, thậm chí ưu tiên hơn nữa lên ít nhất 75%, ưu tiên nhất lên ít nhất 100% so với đáp ứng miễn dịch qua tế bào và/hoặc kháng thể gây ra bởi chế phẩm sinh miễn dịch tham chiếu gồm kháng nguyên PCV-2 không tinh chế.

Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất chế phẩm kháng nguyên PCV-2 gồm các bước: i) thu được chất lỏng thứ nhất chứa kháng nguyên PCV-2, ii) loại bỏ ít nhất một phần chất lỏng thứ nhất ra khỏi kháng nguyên PCV-2, trong đó chế phẩm kháng nguyên PCV-2 thu được sau bước ii) gây ra sự hao hụt nhỏ hơn 1log TCID₅₀ – ưu tiên trên ml -, ưu tiên nhỏ hơn 0,9log TCID₅₀ - ưu tiên trên ml -, thậm chí ưu tiên hơn nhỏ hơn 0,7log TCID₅₀ - ưu tiên trên ml -, thậm chí ưu tiên hơn nhỏ hơn 0,5log TCID₅₀ - ưu tiên trên ml -, ưu tiên nhất nhỏ hơn 0,3log TCID₅₀ - ưu tiên trên ml - của virut sống, ưu tiên của PRRSV sống hoặc nhỏ hơn 1log CFU - ưu tiên trên ml -, ưu tiên nhỏ hơn 0,9log CFU - ưu tiên trên ml -, thậm chí ưu tiên nhỏ hơn 0,7log CFU - ưu tiên trên ml -, thậm chí ưu tiên nhỏ hơn 0,5log CFU - ưu tiên trên ml -, ưu tiên nhất nhỏ hơn 0,3log CFU - ưu tiên trên ml - của vi khuẩn sống, ưu tiên *Mycoplasma hyopneumoniae*, khi virut sống, ưu tiên PRRSV hoặc vi khuẩn sống, ưu tiên *Mycoplasma hyopneumoniae* được trộn và ủ với chế phẩm kháng nguyên PCV-2 trong khoảng thời gian 2 giờ hoặc lâu hơn, ưu tiên trong khoảng thời gian hơn 4 giờ, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 12 giờ, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 24 giờ, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian

hơn 2 ngày, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 4 ngày, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 7 ngày, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 2 tuần, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 4 tuần, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 2 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 3 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 4 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 6 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 9 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 12 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 18 tháng, ưu tiên nhất trong khoảng thời gian hơn 2 năm. Ưu tiên, phần của chất lỏng thứ nhất loại bỏ ra khỏi kháng nguyên PCV-2 bằng sự trao đổi một phần chất lỏng thứ nhất với chất lỏng thứ hai. Sự trao đổi ưu tiên được thực hiện sao cho bao gồm bước a) bổ sung chất lỏng thứ hai vào chất lỏng thứ nhất mà chứa kháng nguyên PCV-2 và b) cô đặc kháng nguyên PCV-2, ưu tiên từ 3 lần đến 50 lần, ưu tiên hơn nữa từ 4 lần đến 20 lần, thậm chí ưu tiên hơn nữa từ 7 lần đến 10 lần so với thể tích của chất lỏng thứ nhất bằng cách loại bỏ phần chất lỏng thứ nhất và thứ hai ra khỏi kháng nguyên PCV-2. Ưu tiên, bước bổ sung chất lỏng và bước cô đặc được thực hiện nhiều lần, ưu tiên hai lần, thậm chí ưu tiên hơn nữa ba lần. Trong trường hợp này, không chỉ chất lỏng thứ nhất mà cả hỗn hợp của chất lỏng thứ nhất và thứ hai cũng được loại bỏ. Ưu tiên, mỗi bước bổ sung chất lỏng được thực hiện về cơ bản đồng thời hoặc tuần tự như mô tả ở trên. Khi bước cô đặc và bước bổ sung chất lỏng được thực hiện liên tục, trình tự các bước không quan trọng. Hơn thế nữa, bước cô đặc ưu tiên được thực hiện bằng cách lọc - ưu tiên lọc màng và/hoặc siêu lọc, sử dụng bộ lọc, mà ưu tiên chứa màng bán thấm. Màng bán thấm ưu tiên có kích thước lỗ trung bình nhỏ hơn kháng nguyên PCV-2 và ngăn đường đi của ít nhất 90% kháng nguyên PCV-2 qua các lỗ của màng bán thấm và giữ kháng nguyên PCV-2 lại bên trong bộ lọc để thu lại hoặc thu hồi. Ưu tiên, kích thước lỗ trung bình của màng bán thấm hoặc của bộ lọc bất kỳ mà được sử dụng ở đây, ngăn đường đi của ít nhất 90% protein có kích thước từ 50kDa đến 500kDa, ưu tiên hơn, ít nhất 90% protein có kích thước từ 75kDa đến 400kDa, và ưu tiên nhất ít nhất 90% protein có kích thước từ 100kDa đến 300kDa. Lỗ này được ưu tiên, khi kháng nguyên PCV-2 được sản xuất virus hoàn toàn hoặc hạt tương tự virus. Khi kháng nguyên PCV-2 thu được qua vector virus, ưu tiên vector virus baculovirus tái tổ hợp, chứa và biểu hiện kháng nguyên PCV-2, ưu tiên, PCV-2 ORF-2, quy trình bao

gồm thêm iii) bất hoạt vectơ virus baculovirus tái tổ hợp với chất bất hoạt ADN, ưu tiên trong sự có mặt của etylenimin hai thành phần từ khoảng 1 đến khoảng 20mM; iv) bổ sung lượng chất trung hòa mà trung hòa chất bất hoạt, lượng chất trung hòa này tương đương với lượng chất bất hoạt, trong đó chất trung hòa ưu tiên bao gồm dung dịch natri thiosulfat ưu tiên được cô đặc tới nồng độ cuối khoảng từ 1 đến khoảng 20mM và trong đó chất bất hoạt ưu tiên gồm BEI. Ưu tiên, bước bất hoạt và trung hòa được thực hiện sau khi ít nhất một phần của chất lỏng thứ nhất được loại bỏ ra khỏi kháng nguyên PCV-2, ưu tiên hơn sau khi kháng nguyên PCV-2 được thu lại. Ưu tiên hơn nữa, bước bất hoạt và trung hòa được thực hiện sau khi phần chất lỏng thứ nhất được loại bỏ ra khỏi kháng nguyên PCV-2 bằng sự trao đổi một phần chất lỏng thứ nhất với chất lỏng thứ hai. Khi sự trao đổi của phần chất lỏng thứ nhất với chất lỏng thứ hai được thực hiện sao cho bao gồm bước a) bổ sung chất lỏng thứ hai vào chất lỏng thứ nhất mà chứa kháng nguyên PCV-2 và b) cô đặc kháng nguyên PCV-2, ưu tiên từ 3 lần đến 50 lần, ưu tiên hơn nữa từ 4 lần đến 20 lần, thậm chí ưu tiên hơn nữa từ 7 lần đến 10 lần so với thể tích của chất lỏng thứ nhất bằng cách loại bỏ phần chất lỏng thứ nhất và thứ hai ra khỏi kháng nguyên PCV-2, bước bất hoạt và trung hòa được thực hiện sau bước cô đặc. Khi bước bổ sung chất lỏng và bước cô đặc được thực hiện nhiều lần, ưu tiên hai lần, thậm chí ưu tiên nữa ba lần, bước bất hoạt và trung hòa được thực hiện sau bước bổ sung chất lỏng cuối cùng và bước cô đặc. Khi bước cô đặc được thực hiện bằng cách lọc - ưu tiên bằng phương pháp lọc màng và/hoặc siêu lọc, sử dụng bộ lọc, ưu tiên chứa màng bán thấm, bước bất hoạt và trung hòa được thực hiện sau bước lọc đã mô tả ở trên, ưu tiên sử dụng màng bán thấm. Màng bán thấm ưu tiên có kích thước lỗ trung bình nhỏ hơn kháng nguyên PCV-2 và ngăn đường đi của ít nhất 90% kháng nguyên PCV-2 qua các lỗ của màng bán thấm và giữ kháng nguyên PCV-2 lại bên trong bộ lọc để thu lại hoặc thu hồi. Ưu tiên, kích thước lỗ trung bình của màng bán thấm hoặc của bộ lọc bất kỳ mà được sử dụng ở đây, ngăn đường đi của ít nhất 90% protein có kích thước từ 50kDa đến 500kDa, ưu tiên hơn, ít nhất 90% protein có kích thước từ 75kDa đến 400kDa, và ưu tiên nhất ít nhất 90% protein có kích thước từ 100kDa đến 300kDa. Lỗ này được ưu tiên, khi kháng nguyên PCV-2 được sản xuất virus hoàn toàn hoặc hạt tương tự virus. Ưu tiên, sự tinh chế khác để thu được kháng nguyên PCV-2 tinh chế như được xác định ở đây, có thể đạt được bằng cách thực hiện bước tinh chế thêm bao gồm iii) tinh chế sản phẩm thu được ở bước (ii)

bao gồm kháng nguyên PCV-2, mà thu được sau khi loại bỏ phần chất lỏng thứ nhất, bằng bước sắc ký. Để thu được độ tinh khiết cao hơn, bước sắc ký thứ hai có thể được thực hiện, tuy nhiên khác với bước sắc ký thứ nhất. Ví dụ, nếu bước tinh chế/bước sắc ký thứ nhất là bước loại trừ kích thước (lọc gel), bước thứ hai khác ở chỗ, ví dụ sắc ký ái lực, sắc ký trao đổi ion, v.v.. Ưu tiên, nếu bước thứ nhất để tinh chế kháng nguyên PCV-2, ưu tiên để tinh chế kháng nguyên ORF2 PCV-2 là sắc ký loại trừ kích thước (lọc gel), bước thứ hai có thể là sắc ký trao đổi ion, ưu tiên sắc ký trao đổi anion (AIEX). Nền sắc ký trao đổi anion ưu tiên để tinh chế kháng thể PCV-2, ưu tiên kháng thể ORF2 PCV-2 là Q Sepharosa. Trong quy mô nhỏ khoảng 50ml, sự sử dụng 5ml cột HiTrap Q Sepharose HP được ưu tiên nhất. Sắc ký trao đổi anion có thể được thực hiện, ví dụ, như được mô tả trong Ví dụ 3. Nói một cách ngắn gọn, khoảng 50ml phần thể tích rỗng từ bước sắc ký loại trừ kích thước có thể được tải lên trên cột AIEX tại lưu lượng 3,0ml/phút. Sau bước rửa, ví dụ, Tris 20mM, pH = 6,5, DTT 5mM để loại bỏ vật liệu không liên kết, protein có thể được rửa giải bằng bước đơn chứa 8 thể tích cột của đệm sau đây (Tris 20mM, pH=6,5, DTT 5mM, NaCl 1M). Dòng tiến từ bước chạy AIEX có thể được tải ngược lên trên cột Q Sepharosa và được rửa giải như mô tả ở trên để tăng hiệu suất. Kỹ thuật hai bước này (bước loại trừ kích thước, sau đó là bước sắc ký trao đổi anion) phân tách hiệu quả kháng nguyên ORF2 PCV-2 từ hầu hết các thành phần protein khác của sản phẩm thu được từ canh trường.

Chế phẩm kháng nguyên PCV-2 thu được theo phương pháp mô tả ở trên, hoặc kháng nguyên PCV-2 được sử dụng trong bước i) của phương pháp mô tả ở trên, có thể được kết hợp với ít nhất một kháng nguyên khác, ưu tiên kháng nguyên virus hoặc vi khuẩn, và thậm chí ưu tiên hơn, kháng nguyên virus hoặc vi khuẩn từ ít nhất một vi sinh vật gây bệnh ở lợn. Kháng nguyên khác có thể loại bất kỳ bộc lộ trong WO2007/094893. Tóm lại, các kháng nguyên khác có thể là các kháng nguyên của vi sinh vật gây bệnh bất kỳ. Ưu tiên, "các vi sinh vật gây bệnh" của lợn được chọn độc lập từ nhóm bao gồm: *Actinobacillus pleuropneumonia* (1); Adenovirus (2); Alphavirus chẳng hạn virus viêm não tủy ngựa (Eastern equine encephalomyelitis) (3); *Bordetella bronchiseptica* (4); *Brachyspira* spp. (5), ưu tiên *B. hyodysenteriae* (6); *B. piosicoli* (7), *Brucella suis*, ưu tiên biovars 1, 2, và 3 (8); virus cúm ở lợn điển hình (9); *Clostridium* spp. (10), ưu tiên *Cl. difficile* (11), *Cl. perfringens* loại A, B, và C (12), *Cl. novyi* (13), *Cl. septicum* (14), *Cl. tetani* (15); Coronavirus (16), ưu tiên virus Corona

hồ hấp ở lợn (17); *Eperythrozoonosis suis* (18); *Erysipelothrix rhusiopathiae* (19) *Escherichia coli* (20); *Haemophilus parasuis*, ưu tiên các kiểu phụ 1, 7 và 14 (21) virus *Hemagglutinating encephalomyelitis* (22); virus viêm não Nhật bản (23); *Lawsonia intracellularis*(24) *Leptospira* spp. (25), ưu tiên *Leptospira australis* (26); *Leptospira canicola* (27); *Leptospira grippotyphosa* (28); *Leptospira icterohaemorrhagicae* (29); và *Leptospira interrogans* (30); *Leptospira pomona* (31); *Leptospira tarassovi* (32); *Mycobacterium* spp. (33) ưu tiên *M. avium* (34), *M. intracellulare* (35) và *M. bovis* (36); *Mycoplasma hyopneumoniae* (37); *Pasteurella multocida* (38); cytomegalovirus ở lợn (39); Parvovirus ở lợn (40); virus gây ra hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn (41); virus Pseudorabies (42); Rotavirus (43); *Salmonella* spp. (44), ưu tiên *S. typhimurium* (45) and *S. choleraesuis* (46); *Staph. hyicus* (47); *Staphylococcus* spp. (48) ưu tiên *Streptococcus* spp. (49), ưu tiên *Strep. suis* (50); virus gây bệnh herpes ở lợn (51); virus gây cảm cúm ở lợn (52); virus gây bệnh đậu mùa ở lợn (53); virus gây bệnh đậu mùa ở lợn (54); virus gây bệnh viêm miệng mụn nước (55); virus gây ngoại ban mụn nước ở lợn (56); *Leptospira Hardjo* (57); và/hoặc *Mycoplasma hyosynoviae* (58).

Do đó, theo khía cạnh khác của sáng chế, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất chế phẩm kháng nguyên PCV-2 bao gồm các bước: i) thu kháng nguyên PCV-2 trong chất lỏng thứ nhất; ii) loại bỏ ít nhất một phần chất lỏng thứ nhất ra khỏi kháng nguyên PCV-2, và kết hợp kháng nguyên PCV-2 này với ít nhất một kháng nguyên khác, ưu tiên kháng nguyên virus hoặc vi khuẩn, và ưu tiên hơn kháng nguyên virus hoặc vi khuẩn từ ít nhất một vi sinh vật gây bệnh khác ở lợn. Ưu tiên, kháng nguyên PCV-2 bao gồm protein ORF-2 của PCV-2, ưu tiên hơn nữa protein ORF-2 tái tổ hợp của PCV-2, và thậm chí ưu tiên hơn nữa hạt tương tự virus của protein ORF-2. Ưu tiên, phần của chất lỏng thứ nhất loại bỏ ra khỏi kháng nguyên PCV-2 bằng sự trao đổi một phần chất lỏng thứ nhất với chất lỏng thứ hai. Sự trao đổi ưu tiên được thực hiện sao cho bao gồm bước a) bổ sung chất lỏng thứ hai vào chất lỏng thứ nhất mà chứa kháng nguyên PCV-2 và b) cô đặc kháng nguyên PCV-2, ưu tiên từ 3 lần đến 50 lần, ưu tiên hơn nữa từ 4 lần đến 20 lần, và thậm chí ưu tiên hơn nữa từ 7 lần đến 10 lần so với thể tích của chất lỏng thứ nhất bằng cách loại bỏ phần chất lỏng thứ nhất và thứ hai ra khỏi kháng nguyên PCV-2. Ưu tiên, bước bổ sung chất lỏng và bước cô đặc được thực hiện nhiều lần, ưu tiên hai lần, thậm chí ưu tiên hơn nữa ba lần. Trong những

trường hợp này, không chỉ chất lỏng thứ nhất mà cả hỗn hợp của chất lỏng thứ nhất và thứ hai cũng được loại bỏ. Ưu tiên, mỗi bước bổ sung chất lỏng được thực hiện về cơ bản đồng thời hoặc tuần tự như mô tả ở trên. Khi bước cô đặc và bước bổ sung chất lỏng được thực hiện liên tục, trình tự các bước không quan trọng. Hơn thế nữa, bước cô đặc ưu tiên được thực hiện bằng cách lọc - ưu tiên lọc màng hoặc siêu lọc, sử dụng bộ lọc, mà ưu tiên chứa màng bán thấm. Màng bán thấm ưu tiên có kích thước lỗ trung bình nhỏ hơn kháng nguyên PCV-2 và ngăn đường đi của ít nhất 90% kháng nguyên PCV-2 qua các lỗ của màng bán thấm và giữ kháng nguyên PCV-2 lại bên trong bộ lọc để thu lại hoặc thu hồi. Ưu tiên, kích thước lỗ trung bình của màng bán thấm hoặc của bộ lọc bất kỳ mà được sử dụng ở đây, ngăn đường đi của ít nhất 90% protein có kích thước từ 50kDa đến 500kDa, ưu tiên hơn, ít nhất 90% protein có kích thước từ 75kDa đến 400kDa, và ưu tiên nhất ít nhất 90% protein có kích thước từ 100kDa đến 300kDa. Kích thước lỗ này được ưu tiên, khi kháng nguyên PCV-2 được sản xuất là virus hoàn toàn hoặc hạt tương tự virus. Sự tinh chế thêm để thu được kháng nguyên PCV-2 tinh chế có thể được thực hiện như mô tả ở trên.

Trong các dạng ưu tiên, phương pháp sản xuất chế phẩm kháng nguyên PCV-2 đã mô tả ở trên bao gồm thêm các bước i) thu kháng nguyên PCV-2 trong chất lỏng thứ nhất, trong đó kháng nguyên PCV-2 thu được qua vector virus, ưu tiên vector virus baculovirus tái tổ hợp, chứa và biểu hiện kháng nguyên PCV-2, ưu tiên, PCV-2 ORF-2, và trong đó kháng nguyên PCV-2 bao gồm protein ORF-2 của PCV-2, ưu tiên hơn protein ORF-2 tái tổ hợp của PCV-2, và ưu tiên hơn nữa hạt tương tự virus của protein ORF-2; ii) loại bỏ ít nhất một phần chất lỏng từ kháng nguyên PCV-2; iii) bất hoạt vector virus baculovirus tái tổ hợp bằng chất bất hoạt ADN, ưu tiên trong sự có mặt của etylenimin hai thành phần từ khoảng 1 đến khoảng 20mM; iv) bổ sung lượng chất trung hòa mà trung hòa chất bất hoạt, lượng chất trung hòa này tương đương với lượng chất bất hoạt, trong đó chất trung hòa ưu tiên bao gồm dung dịch natri thiosulfat ưu tiên được cô đặc tới nồng độ cuối khoảng từ 1 đến khoảng 20mM và trong đó chất bất hoạt ưu tiên gồm BEI; và v) trộn kháng nguyên PCV-2 thu được trong bước iv) với thành phần khác được chọn từ nhóm bao gồm chất mang, chất phụ trợ, chất làm loãng, tá dược được dùng và hỗn hợp của chúng.

Trong một khía cạnh khác của phương pháp, ít nhất một kháng nguyên bổ sung là kháng nguyên virus, ưu tiên kháng nguyên từ virus gây ra hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn. Thậm chí ưu tiên hơn, kháng nguyên virus gây ra hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn gồm virus sống, và ưu tiên hơn nữa virus sống cải biến, thậm chí ưu tiên hơn nữa virus sống giảm độc lực. Ưu tiên hơn nữa, kháng nguyên virus gây hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn bao gồm chủng virus sống cải biến của VR với số hiệu lưu giữ ATCC 2332, và ưu tiên hơn nữa bao gồm INGELVAC® PRRS MLV. Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất chế phẩm kháng nguyên PCV-2 bao gồm các bước i) thu chất lỏng thứ nhất chứa kháng nguyên PCV-2, ii) loại bỏ ít nhất một phần chất lỏng thứ nhất ra khỏi kháng nguyên PCV-2, và kết hợp kháng nguyên PCV-2 với kháng nguyên từ virus gây hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn, ưu tiên, kháng nguyên virus gây hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn gồm virus sống, ưu tiên hơn nữa virus sống cải biến, và ưu tiên hơn nữa virus giảm độc sống cải biến. Ưu tiên hơn nữa, kháng nguyên virus của hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn bao gồm chủng virus sống cải biến của VR với số hiệu lưu giữ ATCC 2332, và ưu tiên hơn nữa bao gồm INGELVAC® PRRS MLV. Ưu tiên, kháng nguyên PCV-2 bao gồm protein ORF-2 của PCV-2, ưu tiên hơn nữa protein ORF-2 tái tổ hợp của PCV-2, và thậm chí ưu tiên hơn nữa hạt tương tự virus của protein ORF-2. Ưu tiên, phần của chất lỏng thứ nhất loại bỏ ra khỏi kháng nguyên PCV-2 bằng sự trao đổi một phần chất lỏng thứ nhất với chất lỏng thứ hai. Sự trao đổi ưu tiên được thực hiện sao cho bao gồm bước a) bổ sung chất lỏng thứ hai vào chất lỏng thứ nhất mà chứa kháng nguyên PCV-2 và b) cô đặc kháng nguyên PCV-2, ưu tiên từ 3 lần đến 50 lần, ưu tiên hơn nữa từ 4 lần đến 20 lần, và thậm chí ưu tiên hơn nữa từ 7 lần đến 10 lần so với thể tích của chất lỏng thứ nhất bằng cách loại bỏ phần chất lỏng thứ nhất và thứ hai ra khỏi kháng nguyên PCV-2. Ưu tiên, bước bổ sung chất lỏng và bước cô đặc được thực hiện nhiều lần, ưu tiên hai lần, thậm chí ưu tiên hơn nữa ba lần. Trong trường hợp này, không chỉ chất lỏng thứ nhất mà cả hỗn hợp của chất lỏng thứ nhất và thứ hai cũng được loại bỏ. Ưu tiên, mỗi bước bổ sung chất lỏng được thực hiện về cơ bản đồng thời hoặc tuần tự như mô tả ở trên. Khi bước cô đặc và bước bổ sung chất lỏng được thực hiện liên tục, trình tự các bước không quan trọng. Hơn thế nữa, bước cô đặc ưu tiên được thực hiện bằng cách lọc - ưu tiên lọc màng và/hoặc siêu lọc, sử dụng bộ lọc, mà ưu tiên chứa màng bán thấm. Màng bán

thấm ưu tiên có kích thước lỗ trung bình nhỏ hơn kháng nguyên PCV-2 và ngăn đường đi của ít nhất 90% kháng nguyên PCV-2 qua các lỗ của màng bán thấm và giữ kháng nguyên PCV-2 lại bên trong bộ lọc để thu lại hoặc thu hồi. Ưu tiên, kích thước lỗ trung bình của màng bán thấm hoặc của bộ lọc bất kỳ mà được sử dụng ở đây, ngăn đường đi của ít nhất 90% protein có kích thước từ 50kDa đến 500kDa, ưu tiên hơn, ít nhất 90% protein có kích thước từ 75kDa đến 400kDa, và ưu tiên nhất ít nhất 90% protein có kích thước từ 100kDa đến 300kDa. Kích thước lỗ này được ưu tiên, khi kháng nguyên PCV-2 được sản xuất là virus hoàn toàn hoặc hạt tương tự virus. Sự tinh chế thêm để thu được kháng nguyên PCV-2 tinh chế có thể được thực hiện như mô tả ở trên.

Trong khía cạnh khác của sáng chế, ít nhất một kháng nguyên bổ sung là kháng nguyên vi khuẩn, ưu tiên *Mycoplasma hyopneumoniae*. Ưu tiên, kháng nguyên *Mycoplasma hyopneumoniae* là vaccine vi khuẩn, và ưu tiên hơn, vaccine vi khuẩn *Mycoplasma hyopneumoniae* là INGELVAC® MYCOFLEX. Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất chế phẩm kháng nguyên PCV-2 bao gồm các bước: i) thu chất lỏng thứ nhất chứa kháng nguyên PCV-2, ii) loại bỏ ít nhất một phần chất lỏng thứ nhất ra khỏi kháng nguyên PCV-2, và kết hợp kháng nguyên PCV-2 với kháng nguyên vi khuẩn, ưu tiên *Mycoplasma hyopneumoniae*. Ưu tiên, kháng nguyên *Mycoplasma hyopneumoniae* là vaccine vi khuẩn, và ưu tiên hơn, vaccine vi khuẩn *Mycoplasma hyopneumoniae* là INGELVAC® MYCOFLEX. Ưu tiên, kháng nguyên PCV-2 bao gồm protein ORF-2 của PCV-2, ưu tiên hơn, protein ORF-2 tái tổ hợp của PCV-2, và thậm chí ưu tiên hơn nữa hạt tương tự virus của protein ORF-2. Ưu tiên, phần của chất lỏng thứ nhất loại bỏ ra khỏi kháng nguyên PCV-2 bằng sự trao đổi một phần chất lỏng thứ nhất với chất lỏng thứ hai. Sự trao đổi ưu tiên được thực hiện sao cho bao gồm bước a) bổ sung chất lỏng thứ hai vào chất lỏng thứ nhất mà chứa kháng nguyên PCV-2 và b) cô đặc kháng nguyên PCV-2, ưu tiên từ 3 lần đến 50 lần, ưu tiên hơn nữa từ 4 lần đến 20 lần, và thậm chí ưu tiên hơn nữa từ 7 lần đến 10 lần so với thể tích của chất lỏng thứ nhất bằng cách loại bỏ phần chất lỏng thứ nhất và thứ hai ra khỏi kháng nguyên PCV-2. Ưu tiên, bước bổ sung chất lỏng và bước cô đặc được thực hiện nhiều lần, ưu tiên hai lần, thậm chí ưu tiên hơn nữa ba lần. Trong những trường hợp này, không chỉ chất lỏng thứ nhất mà cả hỗn hợp của chất lỏng thứ nhất và thứ hai cũng được loại bỏ. Ưu tiên, mỗi bước bổ sung chất lỏng được thực hiện về cơ

bản đồng thời hoặc tuần tự như mô tả ở trên. Khi bước cô đặc và bước bổ sung chất lỏng được thực hiện liên tục, trình tự các bước không quan trọng. Hơn thế nữa, bước cô đặc ưu tiên được thực hiện bằng cách lọc - ưu tiên lọc màng hoặc siêu lọc, sử dụng bộ lọc, mà ưu tiên chứa màng bán thấm. Màng bán thấm ưu tiên có kích thước lỗ trung bình nhỏ hơn kháng nguyên PCV-2 và ngăn đường đi của ít nhất 90% kháng nguyên PCV-2 qua các lỗ của màng bán thấm và giữ kháng nguyên PCV-2 lại bên trong bộ lọc để thu lại hoặc thu hồi. Ưu tiên, kích thước lỗ trung bình của màng bán thấm hoặc của bộ lọc bất kỳ mà được sử dụng ở đây, ngăn đường đi của ít nhất 90% protein có kích thước từ 50kDa đến 500kDa, ưu tiên hơn, ít nhất 90% protein có kích thước từ 75kDa đến 400kDa, và ưu tiên nhất ít nhất 90% protein có kích thước từ 100kDa đến 300kDa. Kích thước lỗ này được ưu tiên, khi kháng nguyên PCV-2 được sản xuất là virus hoàn toàn hoặc hạt tương tự virus. Sự tinh chế thêm để thu được kháng nguyên PCV-2 tinh chế có thể được thực hiện như mô tả ở trên.

Trong khía cạnh khác của sáng chế, ít nhất một kháng nguyên bổ sung bao gồm kháng nguyên virus, ưu tiên kháng nguyên virus gây ra hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn, như được mô tả ở trên, và kháng nguyên vi khuẩn, ưu tiên kháng nguyên *Mycoplasma hyopneumoniae*, như đã mô tả ở trên. Ưu tiên, kháng nguyên virus gây hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn bao gồm virus sống, ưu tiên hơn virus sống biến đổi, và ưu tiên hơn nữa bao gồm chủng virus sống cải biến có số hiệu lưu giữ ATCC VR 2332, ưu tiên hơn nữa bao gồm INGELVAC® PRRS MLV. Ưu tiên, kháng nguyên *Mycoplasma hyopneumoniae* là vắc xin vi khuẩn, và ưu tiên hơn nữa, vắc xin vi khuẩn *Mycoplasma hyopneumoniae* là INGELVAC® MYCOFLEX. Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất chế phẩm kháng nguyên PCV-2 bao gồm các bước: i) thu chất lỏng thứ nhất chứa kháng nguyên PCV-2, ii) loại bỏ ít nhất một phần chất lỏng thứ nhất ra khỏi kháng nguyên PCV-2, và kết hợp kháng nguyên PCV-2 với kháng nguyên virus, ưu tiên kháng nguyên virus gây hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn, như được mô tả ở trên, và kháng nguyên vi khuẩn, ưu tiên kháng nguyên *Mycoplasma hyopneumoniae*, như được mô tả ở trên. Ưu tiên, kháng nguyên virus gây hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn bao gồm virus sống, ưu tiên hơn virus sống biến đổi, và ưu tiên hơn nữa bao gồm chủng virus sống cải biến có số hiệu lưu giữ ATCC VR 2332, ưu tiên hơn nữa bao gồm INGELVAC® PRRS MLV. Ưu tiên, kháng nguyên *Mycoplasma hyopneumoniae* là

vacxin vi khuẩn, và ưu tiên hơn, vacxin vi khuẩn *Mycoplasma hyopneumoniae* là INGELVAC® MYCOFLEX. Ưu tiên, kháng nguyên PCV-2 bao gồm protein ORF-2 của PCV-2, ưu tiên hơn, protein ORF-2 tái tổ hợp của PCV-2, và thậm chí ưu tiên hơn nữa hạt tương tự virus của protein ORF-2. Ưu tiên, phần của chất lỏng thứ nhất loại bỏ ra khỏi kháng nguyên PCV-2 bằng sự trao đổi một phần chất lỏng thứ nhất với chất lỏng thứ hai. Sự trao đổi ưu tiên được thực hiện sao cho bao gồm bước a) bổ sung chất lỏng thứ hai vào chất lỏng thứ nhất mà chứa kháng nguyên PCV-2 và b) cô đặc kháng nguyên PCV-2, ưu tiên từ 3 lần đến 50 lần, ưu tiên hơn nữa từ 4 lần đến 20 lần, và thậm chí ưu tiên hơn nữa từ 7 lần đến 10 lần so với thể tích của chất lỏng thứ nhất bằng cách loại bỏ phần chất lỏng thứ nhất và thứ hai ra khỏi kháng nguyên PCV-2. Ưu tiên, bước bổ sung chất lỏng và bước cô đặc được thực hiện nhiều lần, ưu tiên hai lần, thậm chí ưu tiên hơn nữa ba lần. Trong những trường hợp này, không chỉ chất lỏng thứ nhất mà cả hỗn hợp của chất lỏng thứ nhất và thứ hai cũng được loại bỏ. Ưu tiên, bước bổ sung chất lỏng được thực hiện về cơ bản đồng thời hoặc tuần tự như mô tả ở trên. Khi bước cô đặc và bước bổ sung chất lỏng được thực hiện liên tục, trình tự các bước không quan trọng. Hơn thế nữa, bước cô đặc ưu tiên được thực hiện bằng cách lọc - ưu tiên lọc màng và/hoặc siêu lọc, sử dụng bộ lọc, mà ưu tiên chứa màng bán thấm. Màng bán thấm ưu tiên có kích thước lỗ trung bình nhỏ hơn kháng nguyên PCV-2 và ngăn đường đi của ít nhất 90% kháng nguyên PCV-2 qua các lỗ của màng bán thấm và giữ kháng nguyên PCV-2 lại bên trong bộ lọc để thu lại hoặc thu hồi. Ưu tiên, kích thước lỗ trung bình của màng bán thấm hoặc của bộ lọc bất kỳ mà được sử dụng ở đây, ngăn đường đi của ít nhất 90% protein có kích thước từ 50kDa đến 500kDa, ưu tiên hơn, ít nhất 90% protein có kích thước từ 75kDa đến 400kDa, và ưu tiên nhất ít nhất 90% protein có kích thước từ 100kDa đến 300kDa. Kích thước lỗ này được ưu tiên, khi kháng nguyên PCV-2 được sản xuất là virus hoàn toàn hoặc hạt tương tự virus. Sự tinh chế thêm để thu được kháng nguyên PCV-2 tinh chế có thể được thực hiện như mô tả ở trên.

Sáng chế không chỉ đề xuất phương pháp sản xuất chế phẩm kháng nguyên PCV-2, mà còn đề cập đến chế phẩm kháng nguyên PCV-2. Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất thêm chế phẩm kháng nguyên PCV-2, khác biệt ở chỗ chế phẩm kháng nguyên PCV-2 gây ra sự hao hụt nhỏ hơn 1log TCID₅₀ của virus sống hoặc nhỏ hơn 1log CFU trên ml của vi khuẩn sống, khi virus sống hoặc vi khuẩn sống

được trộn với chế phẩm kháng nguyên PCV-2 và được ủ trong khoảng thời gian 2 giờ hoặc lâu hơn, ưu tiên trong khoảng thời gian hơn 4 giờ, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 12 giờ, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 24 giờ, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 2 ngày, ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 4 ngày, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 7 ngày, ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 2 tuần, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 4 tuần, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 2 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 3 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 4 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 6 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 9 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 12 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 18 tháng, ưu tiên nhất trong khoảng thời gian hơn 2 năm. Ưu tiên hơn, chế phẩm kháng nguyên PCV-2 được sản xuất bằng phương pháp đã mô tả ở đây gây ra sự hao hụt của virus sống hoặc nhỏ hơn $0,9\log$ CFU trên ml của vaccine vi khuẩn sống, khi virus sống hoặc vi khuẩn sống được trộn và ủ với chế phẩm kháng nguyên PCV-2 trong khoảng thời gian 2 giờ hoặc lâu hơn, ưu tiên trong khoảng thời gian hơn 4 giờ, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 12 giờ, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 24 giờ, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 2 ngày, ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 4 ngày, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 7 ngày, ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 2 tuần, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 4 tuần, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 2 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 3 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 4 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 6 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 9 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 12 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 18 tháng, ưu tiên nhất trong khoảng thời gian hơn 2 năm. Thậm chí ưu tiên hơn, chế phẩm kháng nguyên PCV-2 gây ra sự hao hụt nhỏ hơn $0,7\log$ TCID₅₀ trên ml của virus sống hoặc nhỏ hơn $0,7\log$ CFU trên ml của vi khuẩn sống, khi virus sống hoặc vi khuẩn sống được trộn và ủ với chế phẩm kháng nguyên PCV-2 trong khoảng thời gian 2 giờ hoặc lâu hơn, ưu tiên trong khoảng thời gian hơn 4 giờ, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 12 giờ, thậm chí ưu tiên

hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 24 giờ, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 2 ngày, ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 4 ngày, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 7 ngày, ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 2 tuần, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 4 tuần, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 2 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 3 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 4 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 6 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 9 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 12 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 18 tháng, ưu tiên nhất trong khoảng thời gian hơn 2 năm. Thậm chí ưu tiên hơn, chế phẩm kháng nguyên PCV-2 gây ra sự hao hụt nhỏ hơn 0,5log TCID₅₀ trên ml của virus sống hoặc nhỏ hơn 0,5log CFU trên ml của vi khuẩn sống, khi virus sống hoặc vi khuẩn sống được trộn và ủ với chế phẩm kháng nguyên PCV-2 trong khoảng thời gian 2 giờ hoặc lâu hơn, ưu tiên trong khoảng thời gian hơn 4 giờ, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 12 giờ, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 24 giờ, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 2 ngày, ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 4 ngày, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 7 ngày, ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 2 tuần, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 4 tuần, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 2 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 3 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 4 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 6 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 9 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 12 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 18 tháng, ưu tiên nhất trong khoảng thời gian hơn 2 năm. Thậm chí ưu tiên hơn, chế phẩm kháng nguyên PCV-2 gây ra sự hao hụt nhỏ hơn 0,3log TCID₅₀ trên ml của virus sống hoặc nhỏ hơn 0,3log CFU trên ml của vi khuẩn sống, khi virus sống hoặc vi khuẩn sống được trộn và ủ với chế phẩm kháng nguyên PCV-2 trong khoảng thời gian 2 giờ hoặc lâu hơn, ưu tiên trong khoảng thời gian hơn 4 giờ, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 12 giờ, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 24 giờ, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 2 ngày, ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 4 ngày, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 7 ngày, ưu tiên hơn nữa trong khoảng

thời gian hơn 2 tuần, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 4 tuần, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 2 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 3 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 4 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 6 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 9 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 12 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 18 tháng, ưu tiên nhất trong khoảng thời gian hơn 2 năm. Virus sống có thể là loại virus sống bất kỳ, nhưng ưu tiên virus sống là virus PRRS, ưu tiên virus PRRS có số hiệu lưu giữ ATCC VR 2332. Vi khuẩn sống có thể là vi khuẩn bất kỳ, nhưng ưu tiên vi khuẩn *Mycoplasma hyopneumonia*, ưu tiên chủng J của *Mycoplasma hyopneumonia*. TCID₅₀ trên ml có thể được ước tính bằng thử nghiệm chuẩn độ trong ống nghiệm chuẩn mà cho phép ước tính lượng virus sống. CFU trên ml có thể được ước tính bằng thử nghiệm chuẩn độ trong ống nghiệm chuẩn mà cho phép ước tính lượng vi khuẩn sống. Thuật ngữ "trên ml" ưu tiên chỉ 1ml chất lưu.

Theo khía cạnh khác, chế phẩm kháng nguyên PCV-2 đã mô tả ở trên bao gồm thành phần khác được chọn từ nhóm bao gồm chất mang, chất phụ trợ, chất pha loãng, tá dược được dụng và hỗn hợp của chúng. Ưu tiên, thành phần khác là chất phụ trợ, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong đó chất phụ trợ là polyme của axit acrylic hoặc axit metacrylic, và thậm chí ưu tiên hơn nữa trong đó chất phụ trợ là Carbomer. Ưu tiên, tá dược được bổ sung với lượng nằm trong khoảng từ 100µg đến khoảng 10mg trong một liều dùng. Thậm chí ưu tiên hơn, chất phụ trợ được bổ sung vào với lượng nằm trong khoảng từ 100µg đến khoảng 10mg trong một liều dùng. Thậm chí ưu tiên hơn nữa, chất phụ trợ được bổ sung vào với lượng nằm trong khoảng từ 500µg đến khoảng 5mg trong một liều dùng. Thậm chí ưu tiên hơn nữa, chất phụ trợ được bổ sung vào với lượng nằm trong khoảng từ 750µg đến khoảng 2,5mg trong một liều dùng. Ưu tiên nhất, chất phụ trợ được bổ sung vào với lượng khoảng 1mg trong một liều dùng.

Sáng chế không chỉ đề xuất phương pháp sản xuất chế phẩm kháng nguyên PCV-2 và/hoặc chế phẩm kháng nguyên PCV-2 như được xác định ở trên, mà còn đề cập đến chế phẩm kháng nguyên PCV-2 mà có thể thu được bằng phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp mô tả ở đây. Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm kháng nguyên PCV-2 mà có thể thu được bằng phương pháp bao gồm

các bước: i) chứa chất lỏng thứ nhất chứa kháng nguyên PCV-2, ii) loại bỏ ít nhất một phần chất lỏng thứ nhất ra khỏi kháng nguyên PCV-2 đã nói. Ưu tiên, kháng nguyên PCV-2 được sử dụng làm hoặc trong chế phẩm kháng nguyên PCV-2. Thuật ngữ "chế phẩm kháng nguyên PCV-2 thu được bằng phương pháp đã mô tả ở đây" còn có nghĩa là chế phẩm kháng nguyên PCV-2 có thể thu được bằng phương pháp đã nêu ở đây. Theo khía cạnh khác, sáng chế còn đề cập đến chế phẩm kháng nguyên PCV-2 mà thu được bằng cách loại bỏ phần chất lỏng thứ nhất từ kháng nguyên PCV-2 bằng sự trao đổi của phần chất lỏng thứ nhất với chất lỏng thứ hai, trong đó chất lỏng thứ hai khác với chất lỏng thứ nhất. Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất chế phẩm kháng nguyên PCV-2 thu được bằng phương pháp bao gồm các bước: i) thu chất lỏng thứ nhất chứa kháng nguyên PCV-2, ii) loại bỏ ít nhất một phần chất lỏng thứ nhất ra khỏi kháng nguyên PCV-2 này, trong đó phần của chất lỏng thứ nhất được loại bỏ ra khỏi kháng nguyên PCV-2 bằng sự trao đổi của phần chất lỏng thứ nhất đối với chất lỏng thứ hai, trong đó chất lỏng thứ hai khác với chất lỏng thứ nhất. Ưu tiên, sự trao đổi của phần chất lỏng thứ nhất với chất lỏng thứ hai bao gồm các bước a) bổ sung chất lỏng thứ hai vào chất lỏng thứ nhất mà chứa kháng nguyên PCV-2 và b) cô đặc kháng nguyên PCV-2 bằng cách loại bỏ phần chất lỏng thứ nhất và thứ hai ra khỏi kháng nguyên PCV-2.

Theo khía cạnh khác, chế phẩm kháng nguyên PCV-2 ưu tiên thu được bằng phương pháp trong đó phần chất lỏng thứ nhất được loại bỏ ra khỏi kháng nguyên PCV-2 bằng bước lọc sử dụng bộ lọc. Tuy nhiên, phương pháp bất kỳ khác đã biết đối với người có trình độ trong lĩnh vực có thể được sử dụng để loại bỏ phần chất lưu thứ nhất và thứ hai ra khỏi kháng nguyên PCV-2, ví dụ, ly tâm và/hoặc sắc ký. Tuy nhiên, ưu tiên nhất là phương pháp lọc. Các phương pháp lọc ưu tiên để loại bỏ phần chất lưu thứ nhất bao gồm siêu lọc và/hoặc lọc màng. Bước cô đặc và bước bổ sung chất lỏng của phương pháp như được mô tả ở đây có thể được thực hiện về cơ bản đồng thời hoặc tuần tự, bước cô đặc và bước bổ sung chất lỏng được thực hiện tuần tự. Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất chế phẩm kháng nguyên PCV-2 thu được bằng phương pháp bao gồm các bước: i) thu chất lỏng thứ nhất chứa kháng nguyên PCV-2, ii) loại bỏ ít nhất một phần chất lỏng thứ nhất ra khỏi kháng nguyên PCV-2 này, trong đó phần của chất lỏng thứ nhất được loại bỏ ra khỏi kháng nguyên PCV-2 bằng sự trao đổi của phần chất lỏng thứ nhất đối với chất lỏng

thứ hai, trong đó chất lỏng thứ hai khác với chất lỏng thứ nhất. Ưu tiên, sự trao đổi của phần chất lỏng thứ nhất với chất lỏng thứ hai bao gồm các bước a) bổ sung chất lỏng thứ hai vào chất lỏng thứ nhất mà chứa kháng nguyên PCV-2 và b) cô đặc kháng nguyên PCV-2 bằng cách loại bỏ phần chất lỏng thứ nhất và thứ hai ra khỏi kháng nguyên PCV-2, trong đó bước bổ sung chất lỏng được thực hiện về cơ bản đồng thời hoặc liên tiếp. Khi bước cô đặc và bước bổ sung chất lỏng được thực hiện liên tục, trình tự các bước không quan trọng. Ví dụ, theo khía cạnh khác, bước bổ sung chất lỏng xảy ra trước bước cô đặc và theo khía cạnh khác, bước cô đặc xảy ra trước bước bổ sung chất lỏng.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm kháng nguyên PCV-2 mà có thể thu được bằng cách sử dụng phương pháp được mô tả ở đây, trong đó bước bổ sung chất lỏng và bước cô đặc, không kể đến trình tự trong đó chúng được thực hiện, có thể được thực hiện nhiều lần. Ví dụ, mỗi bước tương ứng này có thể được thực hiện ít nhất hai, ít nhất ba, ít nhất bốn, ít nhất năm, ít nhất 10, lên tới nhiều lần nếu muốn. Theo một khía cạnh, bước cô đặc và bước bổ sung chất lỏng mỗi chúng được thực hiện ít nhất hai lần. Theo một khía cạnh khác, bước cô đặc và bước bổ sung chất lỏng mỗi chúng được thực hiện ít nhất ba lần.

Theo khía cạnh khác của sáng chế, chế phẩm kháng nguyên PCV-2 của sáng chế được thu như đã mô tả ở trên, trong đó lọc là phương pháp ưu tiên để loại bỏ phần của chất lỏng thứ nhất, hoặc trong trường hợp có nhiều bước loại bỏ, như đã mô tả ở trên, phần hỗn hợp chứa chất lưu thứ nhất và chất lưu thứ hai, từ kháng nguyên PCV-2. Bộ lọc có thể là bộ lọc truyền thống trong lĩnh vực. Ưu tiên, bộ lọc bao gồm màng bán thấm. Ở dạng ưu tiên hơn, màng bán thấm có kích thước lỗ trung bình nhỏ hơn kháng nguyên PCV-2 để ngăn đường đi của ít nhất 90% kháng nguyên PCV-2 qua các lỗ của màng bán thấm và giữ kháng nguyên PCV-2 lại bằng bộ lọc. Theo khía cạnh khác, bộ lọc có kích thước lỗ trung bình ngăn đường đi của ít nhất 90% protein có kích thước từ 50kDa đến 500kDa, ưu tiên hơn, bộ lọc có kích thước lỗ trung bình ngăn đường đi của ít nhất 90% protein có kích thước từ 75kDa đến 400kDa, và ưu tiên nhất, bộ lọc có kích thước lỗ trung bình mà ngăn đường đi của ít nhất 90% protein có kích thước từ 100kDa đến 300kDa. Kích thước lỗ này được ưu tiên, khi kháng nguyên PCV-2 được sản xuất là virus hoàn toàn hoặc hạt tương tự virus. Vẫn trong khía cạnh

khác, màng bán thấm bao gồm vật liệu được chọn từ nhóm gồm polysulfon, polyetesulfon và xenluloza tái tạo. Tuy nhiên, vật liệu khác bất kỳ có thể được sử dụng, cho phép loại bỏ phần của chất lưu thứ nhất, và trong trường hợp nhiều bước xử lý, loại bỏ hỗn hợp của chất lưu thứ nhất và thứ hai ra khỏi kháng nguyên PCV-2. Theo khía cạnh khác, bộ lọc được chọn từ nhóm bao gồm ống siêu lọc màng sợi rỗng, tấm phẳng, hoặc băng cát xét, với ống siêu lọc màng sợi rỗng được đặc biệt ưu tiên.

Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm kháng nguyên PCV-2 mà thu được bằng cách sử dụng các phương pháp đã mô tả ở trên, trong đó bộ lọc ưu tiên là hoặc bao gồm màng bán thấm. Ưu tiên, màng bán thấm có kích thước lỗ trung bình nhỏ hơn kháng nguyên PCV-2 để ngăn đường đi của ít nhất 90% kháng nguyên PCV-2 qua các lỗ của màng bán thấm. Ưu tiên, kích thước lỗ trung bình của màng bán thấm ngăn đường đi của ít nhất 90% protein có kích thước từ 50kDa đến 500kDa, ưu tiên hơn, ít nhất 90% protein có kích thước từ 75kDa đến 400kDa, và ưu tiên nhất ít nhất 90% protein có kích thước từ 100kDa đến 300kDa. Kích thước lỗ này được ưu tiên, khi kháng nguyên PCV-2 được sản xuất là virus hoàn toàn hoặc hạt tương tự virus. Như đã mô tả ở trên, bước loại bỏ nhìn chung bao gồm sự trao đổi của phần chất lưu thứ nhất với phần chất lưu thứ hai bao gồm các bước a) bổ sung chất lỏng thứ hai vào chất lỏng thứ nhất mà chứa kháng nguyên PCV-2 và b) cô đặc kháng nguyên PCV-2 bằng cách loại bỏ phần chất lỏng thứ nhất và thứ hai ra khỏi kháng nguyên PCV-2, trong đó bước bổ sung chất lỏng và bước cô đặc được thực hiện nhiều lần, ví dụ, hai lần, ba lần, năm lần, 10 lần, v.v.. Ưu tiên, bước bổ sung chất lỏng và bước cô đặc được thực hiện hai lần, ưu tiên nhất ba lần.

Bước cô đặc của phương pháp được đề xuất ở đây để thu được chế phẩm kháng nguyên PCV-2 được thực hiện để kháng nguyên PCV-2 được cô đặc từ 3 lần đến 50 lần so với thể tích của chất lỏng thứ nhất. Ưu tiên hơn, bước cô đặc được thực hiện để kháng nguyên PCV-2 được cô đặc từ 4 lần đến 20 lần so với thể tích của chất lỏng thứ nhất. Ưu tiên hơn, bước cô đặc được thực hiện để kháng nguyên PCV-2 được cô đặc từ 7 lần đến 10 lần so với thể tích của chất lỏng thứ nhất. Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm kháng nguyên PCV-2 thu được bởi phương pháp đã mô tả ở trên, trong đó kháng nguyên PCV-2 được cô đặc từ 3 lần đến 50 lần, ưu tiên từ 4 lần đến 20 lần, và ưu tiên hơn nữa từ 7 lần đến 10 lần so với thể tích của chất lỏng thứ

nhất. Ưu tiên, phần chất lỏng thứ nhất được loại bỏ ra khỏi kháng nguyên PCV-2 bởi sự trao đổi của phần chất lỏng thứ nhất đối với chất lỏng thứ hai bao gồm các bước a) bổ sung chất lỏng thứ hai vào chất lỏng thứ nhất mà chứa kháng nguyên PCV-2 và b) cô đặc kháng nguyên PCV-2 từ 3 lần đến 50 lần, ưu tiên từ 4 lần đến 20 lần so với thể tích của chất lỏng thứ nhất bằng cách loại bỏ phần chất lỏng thứ nhất và thứ hai ra khỏi kháng nguyên PCV-2. Ưu tiên, bước bổ sung chất lỏng được thực hiện về cơ bản đồng thời hoặc liên tiếp với bước cô đặc. Khi bước cô đặc và bước bổ sung chất lỏng được thực hiện liên tục, trình tự các bước không quan trọng. Hơn thế nữa, bước cô đặc ưu tiên được thực hiện bằng cách lọc - ưu tiên lọc màng và/hoặc siêu lọc, sử dụng bộ lọc, mà ưu tiên chứa màng bán thấm. Màng bán thấm ưu tiên có kích thước lỗ trung bình nhỏ hơn kháng nguyên PCV-2 và ngăn đường đi của ít nhất 90% kháng nguyên PCV-2 qua các lỗ của màng bán thấm. Ưu tiên, kích thước lỗ trung bình của màng bán thấm ngăn đường đi của ít nhất 90% protein có kích thước từ 50kDa đến 500kDa, ưu tiên hơn, ít nhất 90% protein có kích thước từ 75kDa đến 400kDa, và ưu tiên nhất ít nhất 90% protein có kích thước từ 100kDa đến 300kDa. Kích thước lỗ này được ưu tiên, khi kháng nguyên PCV-2 được sản xuất là virus hoàn toàn hoặc hạt tương tự virus.

Ưu tiên, sự tinh chế khác để thu được chế phẩm kháng nguyên PCV-2 chứa kháng nguyên PCV-2 tinh chế như được xác định ở đây, có thể đạt được bằng cách thực hiện bước tinh chế thêm bao gồm iii) tinh chế sản phẩm thu được ở bước (ii) bao gồm kháng nguyên PCV-2 (của phương pháp bất kỳ được mô tả ở đây), mà thu được sau khi loại bỏ phần chất lỏng thứ nhất, bằng bước sắc ký. Để thu được độ tinh khiết cao hơn, bước sắc ký thứ hai có thể được thực hiện, tuy nhiên khác với bước sắc ký thứ nhất. Ví dụ, nếu bước tinh chế/bước sắc ký thứ nhất là bước loại trừ kích thước (lọc gel), bước thứ hai khác ở chỗ, ví dụ, sắc ký ái lực, sắc ký trao đổi ion, v.v.. Ưu tiên, nếu bước thứ nhất để tinh chế kháng nguyên PCV-2, ưu tiên để tinh chế kháng nguyên ORF2 PCV-2 là sắc ký loại trừ kích thước (lọc gel), bước thứ hai có thể là sắc ký trao đổi ion, ưu tiên sắc ký trao đổi anion (AIEX). Nền sắc ký trao đổi anion ưu tiên để tinh chế kháng thể PCV-2, ưu tiên kháng thể ORF2 PCV-2 là Q Sepharosa. Trong quy mô nhỏ khoảng 50ml, sự sử dụng 5ml cột HiTrap Q Sepharose HP được ưu tiên nhất. Sắc ký trao đổi anion có thể được thực hiện, ví dụ, như được mô tả trong Ví dụ 3. Nói một cách ngắn gọn, khoảng 50ml phần thể tích rỗng từ bước sắc ký loại trừ kích thước có thể được tải lên trên cột AIEX tại lưu lượng 3ml/phút. Sau bước rửa, ví dụ,

Tris 20mM, pH = 6,5, DTT 5mM để loại bỏ vật liệu không liên kết, protein có thể được rửa giải bằng bước đơn chứa 8 thể tích cột của đệm sau đây (Tris 20mM, pH=6,5, DTT 5mM, NaCl 1 M). Dòng tiến từ bước chạy AIEX có thể được tải ngược lên trên cột Q Sepharosa và được rửa giải như đã mô tả ở trên để tăng hiệu suất. Kỹ thuật hai bước này (bước loại trừ kích thước, sau đó là bước sắc ký trao đổi anion) phân tách hiệu quả kháng nguyên ORF2 PCV-2 từ hầu hết các thành phần protein khác của sản phẩm thu được từ canh trường.

Theo phương án khác, hoạt tính diệt virus của chế phẩm kháng nguyên PCV-2 được sản xuất bằng phương pháp mô tả ở đây được giảm đi ít nhất 10% so với chất lỏng mà không trải qua phương pháp này. Ưu tiên hơn nữa, hoạt tính diệt virus của chế phẩm kháng nguyên PCV-2 được giảm đi ít nhất 50% so với chất lỏng mà không trải qua phương pháp này. Ưu tiên hơn nữa, hoạt tính diệt virus của chế phẩm kháng nguyên PCV-2 được giảm đi ít nhất 70% so với chất lỏng mà không trải qua phương pháp này.

Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm kháng nguyên PCV-2 thu được bằng phương pháp bao gồm các bước: i) thu chất lỏng thứ nhất chứa kháng nguyên PCV-2, ii) loại bỏ ít nhất một phần chất lỏng thứ nhất ra khỏi kháng nguyên PCV-2, trong đó hoạt tính diệt virus - ưu tiên đối với virus PRRS của chế phẩm kháng nguyên PCV-2 thu được sau bước ii) được giảm đi ít nhất 10%, ưu tiên ít nhất 50%, ưu tiên hơn ít nhất 70%, ưu tiên hơn nữa ít nhất 90% so với thể tích của chất lỏng thứ nhất. Ưu tiên, phần của chất lỏng thứ nhất có hoạt tính diệt virus được loại bỏ ra khỏi kháng nguyên PCV-2 bằng sự trao đổi một phần chất lỏng thứ nhất với chất lỏng thứ hai. Sự trao đổi ưu tiên được thực hiện sao cho bao gồm bước a) bổ sung chất lỏng thứ hai vào chất lỏng thứ nhất mà chứa kháng nguyên PCV-2 và b) cô đặc kháng nguyên PCV-2, ưu tiên từ 3 lần đến 50 lần, ưu tiên hơn nữa từ 4 lần đến 20 lần, và thậm chí ưu tiên hơn nữa từ 7 lần đến 10 lần so với thể tích của chất lỏng thứ nhất bằng cách loại bỏ phần chất lỏng thứ nhất và thứ hai ra khỏi kháng nguyên PCV-2. Ưu tiên, bước bổ sung chất lỏng được thực hiện về cơ bản đồng thời hoặc liên tiếp với bước cô đặc như mô tả ở trên. Khi bước cô đặc và bước bổ sung chất lỏng được thực hiện liên tục, trình tự các bước không quan trọng. Hơn thế nữa, bước cô đặc ưu tiên được thực hiện bằng cách lọc - ưu tiên lọc màng và/hoặc siêu lọc, sử dụng bộ lọc, mà ưu tiên chứa màng

bán thấm. Màng bán thấm ưu tiên có kích thước lỗ trung bình nhỏ hơn kháng nguyên PCV-2 và ngăn đường đi của ít nhất 90% kháng nguyên PCV-2 qua các lỗ của màng bán thấm. Ưu tiên, kích thước lỗ trung bình của màng bán thấm hoặc của bộ lọc bất kỳ mà được sử dụng ở đây, ngăn đường đi của ít nhất 90% protein có kích thước từ 50kDa đến 500kDa, ưu tiên hơn, ít nhất 90% protein có kích thước từ 75kDa đến 400kDa, và ưu tiên nhất ít nhất 90% protein có kích thước từ 100kDa đến 300kDa. Kích thước lỗ này được ưu tiên, khi kháng nguyên PCV-2 được sản xuất là virus hoàn toàn hoặc hạt tương tự virus. Sự tinh chế thêm để thu được kháng nguyên PCV-2 tinh chế có thể được thực hiện như mô tả ở trên.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm kháng nguyên PCV-2 thu được bằng phương pháp được mô tả ở đây, trong đó chế phẩm kháng nguyên PCV-2 gây ra sự hao hụt nhỏ hơn 1log TCID₅₀ – ưu tiên trên ml -, ưu tiên nhỏ hơn 0,9log TCID₅₀, - ưu tiên trên ml -, thậm chí ưu tiên hơn nhỏ hơn 0,7log TCID₅₀ - ưu tiên trên ml -, thậm chí ưu tiên hơn nhỏ hơn 0,5log TCID₅₀ - ưu tiên trên ml -, ưu tiên nhất nhỏ hơn 0,3log TCID₅₀ - ưu tiên trên ml - của virus sống, ưu tiên của PRRSV sống hoặc nhỏ hơn 1log CFU - ưu tiên trên ml -, ưu tiên nhỏ hơn 0,9log CFU - ưu tiên trên ml -, thậm chí ưu tiên nhỏ hơn 0,7log CFU - ưu tiên trên ml -, thậm chí ưu tiên nhỏ hơn 0,5log CFU - ưu tiên trên ml -, ưu tiên nhất nhỏ hơn 0,3log CFU - ưu tiên trên ml - của vi khuẩn sống, ưu tiên *Mycoplasma hyopneumoniae*, khi virus sống, ưu tiên PRRSV hoặc vi khuẩn sống, ưu tiên *Mycoplasma hyopneumoniae* được trộn và ủ với chế phẩm kháng nguyên PCV-2 trong khoảng thời gian 2 giờ hoặc lâu hơn, ưu tiên trong khoảng thời gian hơn 4 giờ, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 12 giờ, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 24 giờ, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 2 ngày, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 4 ngày, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 7 ngày, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 2 tuần, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 4 tuần, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 2 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 3 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 4 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 6 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 9 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 12 tháng, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong khoảng thời gian hơn 18 tháng, ưu tiên nhất trong khoảng thời gian hơn 2 năm.

Virut sống có thể là loại virut sống bất kỳ, nhưng ưu tiên virut sống là virut PRRS, ưu tiên virut PRRS có số hiệu lưu giữ ATCC VR 2332. Vi khuẩn sống có thể là vi khuẩn bất kỳ, nhưng ưu tiên vi khuẩn *Mycoplasma hyopneumoniae*, ưu tiên chủng J của *Mycoplasma hyopneumoniae*. TCID₅₀ trên ml có thể được ước tính bằng thử nghiệm chuẩn độ trong ống nghiệm chuẩn mà cho phép ước tính lượng virut sống. CFU trên ml có thể được ước tính bằng thử nghiệm chuẩn độ trong ống nghiệm chuẩn mà cho phép ước tính lượng vi khuẩn sống. Thuật ngữ "trên ml" ưu tiên chỉ 1ml chất lưu.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm kháng nguyên PCV-2 thu được bằng phương pháp đã mô tả ở trên, bao gồm thêm bước thu kháng nguyên PCV-2 còn lại sau bước ii). Sự thu này có thể được thực hiện theo cách truyền thống bất kỳ. Theo cách thu hồi đặc biệt ưu tiên, phần của chất lỏng thứ nhất được loại bỏ ra khỏi kháng nguyên PCV-2 thông qua bước lọc và kháng nguyên PCV-2 được thu hồi từ sự làm chậm lọc của bộ lọc.

Theo khía cạnh khác, chế phẩm kháng nguyên PCV-2 thu được bằng phương pháp bất kỳ đã mô tả ở trên được trộn với thành phần khác được chọn từ nhóm bao gồm chất mang, chất phụ trợ, chất pha loãng, tá dược được dụng và hỗn hợp của chúng. Ưu tiên, thành phần khác là chất phụ trợ, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong đó chất phụ trợ là polyme của axit acrylic hoặc axit metacrylic, và thậm chí ưu tiên hơn nữa trong đó chất phụ trợ là Carbomer.

Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm kháng nguyên PCV-2 thu được bằng phương pháp đã mô tả ở trên, bao gồm thêm bước trộn kháng nguyên PCV-2 thu được bằng phương pháp đã mô tả ở đây với thành phần khác được chọn từ nhóm bao gồm các chất mang, chất phụ trợ, chất làm loãng, tá dược được dụng và hỗn hợp của chúng. Ưu tiên, thành phần khác là chất phụ trợ, thậm chí ưu tiên hơn nữa trong đó chất phụ trợ là polyme của axit acrylic hoặc axit metacrylic, và thậm chí ưu tiên hơn nữa trong đó chất phụ trợ là Carbomer. Ưu tiên, tá dược được bổ sung với lượng nằm trong khoảng từ 100µg đến khoảng 10mg trong một liều dùng. Thậm chí ưu tiên hơn, chất phụ trợ được bổ sung vào với lượng nằm trong khoảng từ 100µg đến khoảng 10mg trong một liều dùng. Thậm chí ưu tiên hơn nữa, chất phụ trợ được bổ sung vào với lượng từ nằm trong khoảng từ 500µg đến khoảng 5mg trong một liều dùng. Thậm chí ưu tiên hơn nữa, chất phụ trợ được bổ sung vào với lượng nằm trong

khoảng từ 750µg đến khoảng 2,5mg trong một liều dùng. Ưu tiên nhất, chất phụ trợ được bổ sung vào với lượng khoảng 1mg trong một liều dùng.

Theo một khía cạnh khác, chế phẩm kháng nguyên PCV-2 đã mô tả trên trên bao gồm protein ORF-2 của PCV-2, ưu tiên hơn, protein ORF-2 tái tổ hợp của PCV-2, và thậm chí ưu tiên hơn nữa hạt tương tự virus của protein ORF-2. Do đó, theo một khía cạnh khác, chế phẩm kháng nguyên PCV-2 thu được bằng phương pháp đã mô tả ở trên, trong đó kháng nguyên PCV-2 bao gồm protein ORF-2 của PCV-2, ưu tiên hơn, protein ORF-2 tái tổ hợp của PCV-2, và thậm chí ưu tiên hơn nữa hạt tương tự virus của protein ORF-2.

Như đã đề cập ở trên, kháng nguyên PCV-2 được sử dụng trong phương pháp đã mô tả ở đây có thể thu được bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực. Cụ thể, thu được kháng nguyên PCV-2 thông qua vector virus, ưu tiên vector virus baculovirus tái tổ hợp, chứa và biểu hiện kháng nguyên PCV-2, ưu tiên, PCV-2 ORF-2. Ở các dạng ưu tiên, kháng nguyên PCV-2 thu được theo các quy trình được mô tả trong WO2006/072065.

Do đó, theo khía cạnh khác của sáng chế, sáng chế đề cập đến chế phẩm kháng nguyên PCV-2 thu được bằng phương pháp đã mô tả ở trên, trong đó kháng nguyên PCV-2 thu được thông qua vector virus, ưu tiên vector virus baculovirus tái tổ hợp, chứa và biểu hiện kháng nguyên PCV-2, ưu tiên ORF-2 PCV-2, và trong đó kháng nguyên PCV-2 bao gồm protein ORF-2 của PCV-2, ưu tiên hơn protein ORF-2 tái tổ hợp của PCV-2, và ưu tiên hơn nữa hạt tương tự virus của protein ORF-2.

Theo khía cạnh khác của sáng chế, chế phẩm kháng nguyên PCV-2 thu được bằng phương pháp đã mô tả ở trên và bao gồm thêm bước bất hoạt vector virus baculovirus tái tổ hợp bằng chất bất hoạt ADN, ưu tiên trong sự có mặt của etylenimin hai thành phần từ 1 đến 20mM. Ở các dạng ưu tiên, phương pháp còn bao gồm bước bổ sung lượng chất mà trung hòa chất bất hoạt ADN, lượng này tương đương với lượng chất bất hoạt ADN trong đó chất trung hòa chất bất hoạt ADN bao gồm dung dịch natri thiosulfat được cô đặc tới nồng độ cuối từ khoảng 1 đến 20mM và trong đó chất bất hoạt ADN là BEI. Ưu tiên, bước bất hoạt được thực hiện sau khi ít nhất một phần của chất lỏng thứ nhất được loại bỏ ra khỏi kháng nguyên PCV-2.

Theo khía cạnh khác của sáng chế, chế phẩm kháng nguyên PCV-2 thu được bằng phương pháp đã mô tả ở trên còn gồm thêm bước trộn kháng nguyên PCV-2 thu được sau bước bất hoạt và trung hòa. Do đó, theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm kháng nguyên PCV-2 thu được bằng phương pháp đã mô tả ở trên bao gồm các bước: i) thu kháng nguyên PCV-2 trong chất lỏng thứ nhất, ii) loại bỏ ít nhất một phần chất lỏng từ kháng nguyên PCV-2; iii) bất hoạt vectơ virus baculovirus tái tổ hợp bằng chất bất hoạt ADN, ưu tiên trong sự có mặt của etylenimin hai thành phần từ khoảng 1 đến khoảng 20mM; iv) bổ sung lượng chất trung hòa mà trung hòa chất bất hoạt, lượng chất trung hòa này tương đương với lượng chất bất hoạt, trong đó chất trung hòa ưu tiên bao gồm dung dịch natri thiosulfat ưu tiên được cô đặc tới nồng độ cuối khoảng từ 1 đến khoảng 20mM và trong đó chất bất hoạt ưu tiên gồm BEI; và v) trộn kháng nguyên PCV-2 thu được trong bước iv) với thành phần khác được chọn từ nhóm bao gồm chất mang, chất phụ trợ, chất làm loãng, tá dược được dụng và hỗn hợp của chúng.

Theo khía cạnh khác của sáng chế, chế phẩm kháng nguyên PCV-2 được mô tả, ưu tiên thu được bằng phương pháp mô tả ở trên, bao gồm thêm ít nhất một kháng nguyên khác, ưu tiên kháng nguyên virus hoặc vi khuẩn, và ưu tiên hơn, kháng nguyên virus hoặc vi khuẩn từ ít nhất một vi sinh vật gây bệnh ở lợn. Theo khía cạnh khác, ít nhất một kháng nguyên khác là virus gây hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn. Thậm chí ưu tiên hơn, hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn bao gồm virus sống, và ưu tiên hơn nữa virus sống biến đổi. Ưu tiên hơn nữa, kháng nguyên virus của hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn bao gồm chủng virus sống cải biến của của VR có số hiệu lưu giữ ATCC 2332, và ưu tiên hơn nữa bao gồm INGELVAC® PRRS MLV. Theo khía cạnh khác của sáng chế, ít nhất một kháng nguyên bổ sung là *Mycoplasma hyopneumoniae*. Ưu tiên, kháng nguyên *Mycoplasma hyopneumoniae* là vacxin vi khuẩn, và ưu tiên hơn, vacxin vi khuẩn *Mycoplasma hyopneumoniae* là INGELVAC® MYCOFLEX. Theo khía cạnh khác của sáng chế, chế phẩm kháng nguyên PCV-2 đã mô tả ở trên, ưu tiên thu được bằng các phương pháp đã mô tả ở trên bao gồm thêm kháng nguyên virus gây hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn, ưu tiên virus sống biến đổi gây hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn, ưu tiên hơn nữa, virus gây hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn có số hiệu lưu giữ ATCC VR 2332, hoặc virus gây hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn được bao

gồm trong INGELVAC® PRRS MLV hoặc INGELVAC® PRRS ATP. Theo khía cạnh khác của sáng chế, chế phẩm PCV-2 đã mô tả ở trên, ưu tiên thu được bằng các phương pháp đã mô tả ở trên bao gồm thêm *Mycoplasma hyopneumoniae*, ưu tiên vi khuẩn vaccin *Mycoplasma hyopneumoniae*, và ưu tiên hơn INGELVAC® MYCOFLEX hoặc vi khuẩn vaccin *Mycoplasma hyopneumoniae* được bao gồm trong INGELVAC® MYCOFLEX. Theo khía cạnh khác, chế phẩm kháng nguyên PCV-2 đã mô tả ở đây, bao gồm virus gây hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn, ưu tiên virus bất kỳ trong số các virus đã mô tả ở trên và *Mycoplasma hyopneumoniae*, ưu tiên virus bất kỳ trong số các virus đã mô tả ở trên.

Khi chế phẩm kháng nguyên PCV-2 bao gồm ít nhất một kháng nguyên bổ sung từ ít nhất một vi sinh vật gây bệnh khác ở lợn như đã mô tả ở trên, ưu tiên virus gây hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn và/hoặc kháng nguyên *Mycoplasma hyopneumoniae* thu được bằng phương pháp đã mô tả ở đây, phương pháp này bao gồm các bước: i) thu kháng nguyên PCV-2 trong chất lỏng thứ nhất; ii) loại bỏ ít nhất một phần chất lỏng thứ nhất từ kháng nguyên PCV-2; và kết hợp kháng nguyên PCV-2 với ít nhất một kháng nguyên khác, ưu tiên kháng nguyên virus hoặc vi khuẩn, và ưu tiên hơn kháng nguyên virus hoặc vi khuẩn từ ít nhất một vi sinh vật gây bệnh khác ở lợn. Ưu tiên, kháng nguyên PCV-2 bao gồm protein ORF-2 của PCV-2, ưu tiên hơn nữa protein ORF-2 tái tổ hợp của PCV-2, và thậm chí ưu tiên hơn nữa hạt tương tự virus của protein ORF-2. Ưu tiên, phần của chất lỏng thứ nhất loại bỏ ra khỏi kháng nguyên PCV-2 bằng sự trao đổi một phần chất lỏng thứ nhất với chất lỏng thứ hai. Sự trao đổi ưu tiên được thực hiện sao cho bao gồm bước a) bổ sung chất lỏng thứ hai vào chất lỏng thứ nhất mà chứa kháng nguyên PCV-2 và b) cô đặc kháng nguyên PCV-2, ưu tiên từ 3 lần đến 50 lần, ưu tiên hơn nữa từ 4 lần đến 20 lần, và thậm chí ưu tiên hơn nữa từ 7 lần đến 10 lần so với thể tích của chất lỏng thứ nhất bằng cách loại bỏ phần chất lỏng thứ nhất và thứ hai ra khỏi kháng nguyên PCV-2. Ưu tiên, bước bổ sung chất lỏng và bước cô đặc được thực hiện nhiều lần, ưu tiên hai lần, thậm chí ưu tiên hơn nữa ba lần. Trong những trường hợp này, không chỉ chất lỏng thứ nhất mà cả hỗn hợp của chất lỏng thứ nhất và thứ hai cũng được loại bỏ. Ưu tiên, mỗi bước bổ sung chất lỏng được thực hiện về cơ bản đồng thời hoặc tuần tự như mô tả ở trên. Khi bước cô đặc và bước bổ sung chất lỏng được thực hiện liên tục, trình tự các bước không quan trọng. Hơn thế nữa, bước cô đặc ưu tiên được thực hiện bằng cách lọc - ưu

tiên lọc màng hoặc siêu lọc, sử dụng bộ lọc, mà ưu tiên chứa màng bán thấm. Màng bán thấm ưu tiên có kích thước lỗ trung bình nhỏ hơn kháng nguyên PCV-2 và ngăn đường đi của ít nhất 90% kháng nguyên PCV-2 qua các lỗ của màng bán thấm và giữ kháng nguyên PCV-2 lại bên trong bộ lọc để thu lại hoặc thu hồi. Ưu tiên, kích thước lỗ trung bình của màng bán thấm hoặc của bộ lọc bất kỳ mà được sử dụng ở đây, ngăn đường đi của ít nhất 90% protein có kích thước từ 50kDa đến 500kDa, ưu tiên hơn, ít nhất 90% protein có kích thước từ 75kDa đến 400kDa, và ưu tiên nhất ít nhất 90% protein có kích thước từ 100kDa đến 300kDa. Kích thước lỗ này được ưu tiên, khi kháng nguyên PCV-2 được sản xuất là virus hoàn toàn hoặc hạt tương tự virus.

Sáng chế như được xác định ở trên, đề xuất phương pháp mới để sản xuất kháng nguyên PCV-2 và các chế phẩm sinh miễn dịch chứa kháng nguyên PCV-2 thể hiện hoạt tính diệt virus giảm và/hoặc tính sinh miễn dịch tăng (mỗi hoạt tính như được xác định ở đây), trong đó phương pháp bao gồm các bước i) thu chất lỏng thứ nhất chứa kháng nguyên PCV-2, ii) loại bỏ ít nhất một phần chất lỏng thứ nhất ra khỏi kháng nguyên PCV-2. Hơn thế nữa, sáng chế cũng đề xuất kháng nguyên PCV-2 cũng như các chế phẩm sinh miễn dịch chứa kháng nguyên PCV-2 thể hiện hoạt tính diệt virus giảm và/hoặc tính sinh miễn dịch tăng (mỗi hoạt tính như được xác định ở đây). Theo khía cạnh khác, kháng nguyên PCV-2 cũng như các chế phẩm sinh miễn dịch chứa kháng nguyên PCV-2 tinh chế thể hiện hoạt tính diệt virus giảm và/hoặc tính sinh miễn dịch tăng có thể thu được bằng phương pháp (II). Kháng nguyên PCV-2 tinh chế theo sáng chế, ưu tiên kháng nguyên PCV-2 ORF2 tinh chế, có thể thu được bằng sự tinh chế chế phẩm virus PCV-2, cụ thể bằng sự tinh chế virus hoàn toàn. Chế phẩm virus hoàn toàn được mô tả ví dụ trong WO 99/18214 hoặc WO 03/049703. Hơn thế nữa, kháng nguyên PCV-2 cũng có thể thu được bằng cách tinh chế kháng nguyên PCV-2 biểu hiện tái tổ hợp, ưu tiên bằng sự tinh chế kháng nguyên PCV-2 ORF2 tái tổ hợp. Hệ biểu hiện để sản xuất kháng nguyên PCV-2 tái tổ hợp, ưu tiên để sản xuất các kháng nguyên PCV-2 ORF2 đã được biết đến trong lĩnh vực và bao gồm, nhưng không giới hạn, các hệ biểu hiện vi khuẩn, hệ biểu hiện men, hệ biểu hiện tế bào côn trùng hoặc hệ biểu hiện ở động vật có vú. Vector và phương pháp tạo ra và/hoặc sử dụng các vector (hoặc các vector tái tổ hợp) cho sự biểu hiện của các kháng nguyên PCV-2 được mô tả trong đơn.

Các tế bào ưu tiên là các tế bào dễ bị nhiễm vector virus tái tổ hợp phù hợp, chứa ADN PCV-2 ORF2 ADN và biểu hiện protein PCV-2 ORF2. Ưu tiên, các tế bào là các tế bào côn trùng, và ưu tiên hơn chúng bao gồm các tế bào côn trùng được bán dưới nhãn hiệu tế bào côn trùng SF+ (Protein Sciences Corporation, Meriden, CT). Môi trường nuôi cấy tế bào ưu tiên có số đếm tế bào nằm trong khoảng từ $0,3 - 2,0 \times 10^6$ tế bào/ml, ưu tiên hơn từ khoảng $0,35 - 1,9 \times 10^6$ tế bào/ml, ưu tiên hơn nữa từ khoảng $0,4 - 1,8 \times 10^6$ tế bào/ml, thậm chí ưu tiên hơn nữa từ khoảng $0,45 - 1,7 \times 10^6$ tế bào/ml, và ưu tiên nhất từ khoảng $0,5 - 1,5 \times 10^6$ tế bào/ml.

Các vector virus ưu tiên bao gồm baculovirus như BaculoGold (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA), miễn là các tế bào sinh sản là tế bào côn trùng. Mặc dù hệ biểu hiện baculovirus được ưu tiên, nhưng người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này cần hiểu rằng các hệ biểu hiện khác, bao gồm các hệ biểu hiện đã mô tả sẽ minh họa cho mục đích của sáng chế, cụ thể sự biểu hiện của kháng nguyên PCV-2 ORF2.

Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này cũng sẽ xác định được môi trường phát triển phù hợp với môi trường phát triển ưu tiên là môi trường tế bào côn trùng không chứa huyết thanh như Excell 420 (JRH Biosciences, Inc., Lenexa, KS) và tương tự.

Vector virus tái tổ hợp chứa các trình tự ADN PCV-2 ORF2 có liều nhân nhiễm (MOI) nằm trong khoảng từ 0,03 đến 1,5, ưu tiên hơn từ khoảng 0,05 đến 1,3, ưu tiên hơn nữa từ khoảng 0,09 đến 1,1, và ưu tiên nhất từ khoảng 0,1 đến 1, khi được sử dụng để lây nhiễm các tế bào dễ bị ảnh hưởng. Ưu tiên, MOI đã nói ở trên đề cập đến một ml chất lỏng môi trường nuôi cấy tế bào. Ưu tiên, phương pháp mô tả ở đây bao gồm sự lây nhiễm của $0,35 - 1,9 \times 10^6$ tế bào/ml, ưu tiên hơn nữa khoảng $0,4 - 1,8 \times 10^6$ tế bào/ml, thậm chí ưu tiên hơn nữa khoảng từ $0,45 - 1,7 \times 10^6$ tế bào/ml, và ưu tiên nhất khoảng từ $0,5 - 1,5 \times 10^6$ tế bào/ml với vector virus tái tổ hợp chứa ADN PCV-2 ORF2 và biểu hiện protein kháng nguyên PCV-2 ORF2 có MOI (liều nhân nhiễm) nằm trong khoảng từ 0,03 - 1,5, ưu tiên hơn từ khoảng 0,05 - 1,3, ưu tiên hơn nữa từ khoảng 0,09 - 1,1, và ưu tiên nhất từ khoảng 0,1 - 1,0.

Các tế bào bị nhiễm sau đó được ủ qua khoảng thời gian lên tới 10 ngày, ưu tiên hơn từ khoảng 2 ngày đến khoảng 10 ngày, ưu tiên hơn nữa từ khoảng 4 ngày đến

khoảng 9 ngày, và ưu tiên nhất từ khoảng 5 ngày đến khoảng 8 ngày. Các điều kiện ưu tiên bao gồm nhiệt độ nằm trong khoảng từ 22°C đến 32°C, ưu tiên hơn nằm trong khoảng từ 24°C đến 30°C, ưu tiên hơn nữa nằm trong khoảng từ 25°C đến 29°C, thậm chí ưu tiên hơn nữa nằm trong khoảng từ 26°C đến 28°C, và ưu tiên nhất khoảng 27°C. Ưu tiên, các tế bào SF+ được quan sát những thay đổi gây ra những thay đổi do baculovirus đặc trưng gây ra. Sự quan sát này có thể bao gồm theo dõi xu hướng mật độ tế bào và sự giảm ở khả năng sống sót trong suốt thời gian sau lây nhiễm. Phát hiện ra rằng chuẩn độ virus đỉnh được quan sát 3-5 ngày sau khi lây nhiễm và thu được sự sản xuất kháng nguyên PCV-2 ORF2 đỉnh trong tế bào vào khoảng từ ngày 5 đến ngày 8 sau khi lây nhiễm và/hoặc khi khả năng sống sót của tế bào giảm xuống dưới 10%.

Kháng nguyên PCV-2 ORF2 có thể được tinh chế từ sản phẩm thu được bằng các phương pháp chuẩn đã biết đối với người có hiểu biết về lĩnh vực này, ví dụ, bằng các phương pháp mô tả trong Protein purification methods – a practical approach (E.L.V. Harris and S. Angal, eds., IRL Press at Oxford University Press). Các phương pháp này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, phân tách bằng ly tâm và/hoặc lọc, kết tủa, loại trừ kích thước (lọc gel), sắc ký, sắc ký ái lực, sắc ký chelat kim loại, sắc ký trao đổi ion, sắc ký đồng hóa trị, sắc ký tương tác kỵ nước, v.v..

Quy trình thu hồi kháng nguyên PCV-2, ưu tiên kháng nguyên PCV-2 ORF2, ưu tiên bắt đầu với sự phân tách của mảnh tế bào từ kháng nguyên PCV-2 ORF2 được biểu hiện thông qua bước phân tách. Các bước phân tách ưu tiên bao gồm lọc, ly tâm tại tốc độ lên tới khoảng 20000xg, ly tâm dòng chảy liên tục, phân tách sắc ký bằng cách sử dụng trao đổi ion hoặc lọc gel, và các phương pháp ái lực miễn dịch truyền thống. Các phương pháp này đã được biết đến bởi người có hiểu biết về lĩnh vực ví dụ bởi (E.L.V. Harris and S. Angel (eds.), Protein purification methods – a practical approach, IRL Press Oxford 1995). Các phương pháp phân tách ưu tiên nhất bao gồm ly tâm tại tốc độ lên tới khoảng 20000xg và lọc. Phương pháp lọc ưu tiên bao gồm vi lọc vuông góc và lọc tiếp tuyến (hoặc theo luồng chéo) bao gồm lọc sợi rỗng và vi lọc vuông góc. Trong số chúng, vi lọc vuông góc được ưu tiên. Kích thước lỗ ưu tiên cho vi lọc vuông góc nằm trong khoảng từ 0,30 đến 1,35 μm , ưu tiên hơn nằm trong khoảng từ 0,35 - 1,25 μm , ưu tiên hơn nữa nằm trong khoảng từ 0,40 đến 1,1 μm , và ưu tiên nhất nằm trong khoảng từ 0,45 đến 1,0 μm . Đã cho rằng màng lọc truyền thống

bất kỳ sẽ phục vụ cho mục đích của sàng chế và các màng polyetesulfon được ưu tiên. Các loại axit nucleic trọng lượng thấp được loại bỏ trong bước lọc.

Sự tinh chế thêm của kháng nguyên PCV-2, ưu tiên của kháng nguyên PCV-2 ORF2 có thể đạt được với các quy trình sắc ký, ưu tiên quy trình sắc ký hai bước. Tuy nhiên, cũng có thể bắt đầu với quy trình sắc ký trong trường hợp, vật liệu tải không bao gồm mảnh tế bào.

Nếu kháng nguyên PCV-2 được ghép vào hạt tương tự virus (VLP), ưu tiên bước thứ nhất là sắc ký loại trừ kích thước (lọc gel), mà có thể được thực hiện, ví dụ, bằng cách sử dụng nền Sephacryl S300. Khi sử dụng HiPrep 26/60 Sephacryl S300HR ở quy mô phòng thí nghiệm, các cột được ưu tiên nhất. Tuy nhiên, các nền sắc ký loại trừ kích thước đã biết đối với người có hiểu biết về lĩnh vực này có thể được sử dụng, mà cho phép sự phân tách của PCV-2 ORF2 VLP từ chất lọc hoặc chất nổi lên trên bề mặt canh trường. Các nền tương tự được mô tả, ví dụ, trong E.L.V. Harris and S. Angel (eds.), Protein purification methods – a practical approach, IRL Press Oxford 1995). Sắc ký lọc gel có thể được tiến hành, ví dụ, bằng cách tải vào cột chế phẩm thô gồm kháng nguyên PCV-2 với lưu lượng 1,0ml/phút và rửa giải cột với 1,5 thể tích cột của đệm gồm Tris 20mM, pH=6,5, DTT 5mM. Tuy nhiên, kháng nguyên PCV-2 ORF2 cũng có thể được tinh chế bằng cách sử dụng sắc ký ái lực, ví dụ, thông qua sự liên kết chọn lọc với kháng thể đặc hiệu ORF2 PCV-2, hoặc phương pháp bất kỳ đã biết đối với người có hiểu biết về lĩnh vực.

Do đó, theo khía cạnh ưu tiên, chế phẩm sinh miễn dịch chứa kháng nguyên PCV-2, ưu tiên kháng nguyên PCV-2 ORF2, và chất phụ trợ, có thể thu được bằng quy trình gồm các bước:

- a) biểu hiện kháng nguyên PCV-2, ưu tiên kháng nguyên PCV-2 ORF2 trong tế bào vật chủ;
- b) thu môi trường nuôi cấy tế bào lấy kháng nguyên PCV-2, ưu tiên kháng nguyên PCV-2 ORF2;
- c) tinh chế sản phẩm thu được chứa kháng nguyên PCV-2, ưu tiên kháng nguyên PCV-2 ORF2 bằng sắc ký loại trừ kích thước (lọc gel);

- d) trộn kháng nguyên PCV-2 tinh chế, ưu tiên kháng nguyên PCV-2 ORF2 với chất phụ trợ.

Theo khía cạnh ưu tiên, sắc ký loại trừ kích thước được thực hiện như đã mô tả ở đây, ưu tiên như được mô tả trong Ví dụ 3. Ưu tiên, sự loại trừ kích thước dẫn đến chế phẩm sinh miễn dịch có độ tinh khiết lớn hơn 80% (trọng lượng/trọng lượng), ưu tiên lớn hơn 90% (trọng lượng/trọng lượng) so với tổng lượng protein có trong chế phẩm sinh miễn dịch trước khi trộn với chất phụ trợ. Độ tinh khiết có thể được ước tính bằng phương pháp nhuộm Imperial Protein Stain (Pierce) sau SDS PAGE qua NuPAGE 10% Bis-Tris gels (Invitrogen) sử dụng hệ đệm NuPAGE MOPS (Invitrogen).

Để thu được độ tinh khiết cao hơn, bước sắc ký thứ hai có thể được thực hiện, tuy nhiên khác với bước sắc ký thứ nhất. Ví dụ, nếu bước tinh chế/bước sắc ký là loại trừ kích thước (lọc gel), bước thứ hai sẽ khác bước thứ nhất, ví dụ, sắc ký ái lực, sắc ký trao đổi ion, v.v..

Ưu tiên, nếu bước thứ nhất để tinh chế kháng nguyên PCV-2, ưu tiên tinh chế PCV-2 ORF2 là sắc ký loại trừ kích thước (lọc gel), bước thứ hai có thể là sắc ký trao đổi ion, ưu tiên sắc ký trao đổi anion (AIEX). Nền sắc ký trao đổi anion ưu tiên để tinh chế kháng thể PCV-2, ưu tiên kháng thể ORF2 PCV-2 là Q Sepharosa. Trong quy mô nhỏ khoảng 50ml, sự sử dụng 5ml cột HiTrap Q Sepharose HP được ưu tiên nhất. Sắc ký trao đổi anion có thể được thực hiện, ví dụ, như được mô tả trong Ví dụ 3. Nói một cách ngắn gọn, khoảng 50ml phần thể tích rỗng từ bước sắc ký loại trừ kích thước có thể được tải lên trên cột AIEX tại lưu lượng 3ml/phút. Sau bước rửa, ví dụ, Tris 20mM, pH = 6,5, DTT 5mM để loại bỏ vật liệu không liên kết, protein có thể được rửa giải bằng bước đơn chứa 8 thể tích cột của đệm sau đây (Tris 20mM, pH=6,5, DTT 5mM, NaCl 1 M). Dòng tiến từ bước chạy AIEX có thể được tải ngược lên trên cột Q Sepharosa và được rửa giải như đã mô tả ở trên để tăng hiệu suất. Kỹ thuật hai bước này (bước loại trừ kích thước, sau đó là bước sắc ký trao đổi anion) phân tách hiệu quả kháng nguyên ORF2 PCV-2 từ hầu hết các thành phần protein khác của sản phẩm thu được từ canh trường.

Do đó, theo phương án ưu tiên, chế phẩm sinh miễn dịch chứa kháng nguyên

PCV-2, ưu tiên kháng nguyên PCV-2 ORF2, và chất phụ trợ, có thể thu được bằng quy trình gồm các bước:

- a) biểu hiện kháng nguyên PCV-2, ưu tiên kháng nguyên PCV-2 ORF2 trong tế bào vật chủ;
- b) thu môi trường nuôi cấy tế bào lấy kháng nguyên PCV-2, ưu tiên kháng nguyên PCV-2 ORF2;
- c) tinh chế sản phẩm thu được chứa kháng nguyên PCV-2, ưu tiên kháng nguyên PCV-2 ORF2 bằng sắc ký loại trừ kích thước (lọc gel), tiếp đến bằng sắc ký trao đổi anion;
- d) trộn kháng nguyên PCV-2 tinh chế, ưu tiên kháng nguyên PCV-2 ORF2 với chất phụ trợ.

Theo phương án ưu tiên, sắc ký loại trừ kích thước và sắc ký trao đổi anion được thực hiện như đã mô tả ở đây, ưu tiên như được mô tả trong Ví dụ 3. Ưu tiên, phương pháp tinh chế hai bước dẫn đến chế phẩm sinh miễn dịch có độ tinh khiết lớn hơn 90% (trọng lượng/trọng lượng), ưu tiên lớn hơn 95% (trọng lượng/trọng lượng) so với tổng lượng protein có trong chế phẩm sinh miễn dịch trước khi trộn với chất phụ trợ. Độ tinh khiết có thể được ước tính bằng phương pháp nhuộm Imperial Protein Stain (Pierce) sau SDS PAGE qua NuPAGE 10% Bis-Tris gels (Invitrogen) sử dụng đệm NuPAGE MOPS (Invitrogen).

Như đã mô tả ở trên, quy trình thu hồi kháng nguyên PCV-2, ưu tiên kháng nguyên PCV-2 ORF2 bắt đầu với sự phân tách của mảnh tế bào từ kháng nguyên PCV-2 ORF2 được biểu hiện thông qua bước phân tách. Bước phân tách ưu tiên bao gồm vi lọc qua bộ lọc có kích thước lỗ khoảng từ 0,6 μm đến khoảng 2 μm , ưu tiên có kích thước lỗ khoảng 0,8mm đến 1,2 μm .

Do đó, chế phẩm sinh miễn dịch chứa kháng nguyên PCV-2, ưu tiên kháng nguyên PCV-2 ORF2, và chất phụ trợ, có thể thu được bằng quy trình gồm các bước:

- a) biểu hiện kháng nguyên PCV-2, ưu tiên kháng nguyên PCV-2 ORF2 trong tế bào vật chủ;

- b) thu môi trường nuôi cấy tế bào lấy kháng nguyên PCV-2, ưu tiên kháng nguyên PCV-2 ORF2;
- c) lọc sản phẩm thu được sau bước b) qua bộ lọc có kích thước lỗ từ 0,6 đến 20 μm .
- d) tinh chế chất lọc chứa kháng nguyên PCV-2, ưu tiên kháng nguyên PCV-2 ORF2 và thu được dưới bước c) bằng sắc ký loại trừ kích thước (lọc gel), tùy ý tiếp đến bằng sắc ký trao đổi anion;
- e) trộn kháng nguyên PCV-2 tinh chế, ưu tiên kháng nguyên PCV-2 ORF2 với chất phụ trợ.

Theo phương án ưu tiên, vi lọc, sắc ký loại trừ kích thước và sắc ký trao đổi anion được thực hiện như đã mô tả ở đây, ưu tiên như được mô tả trong Ví dụ 3. Ưu tiên, phương pháp tinh chế hai bước bao gồm bước trước khi lọc dẫn đến chế phẩm sinh miễn dịch có độ tinh khiết lớn hơn 90% (trọng lượng/trọng lượng), ưu tiên lớn hơn 95% (trọng lượng/trọng lượng) so với tổng lượng protein có trong chế phẩm sinh miễn dịch trước khi trộn với chất phụ trợ. Độ tinh khiết có thể được ước tính bằng phương pháp nhuộm Imperial Protein Stain (Pierce) sau SDS PAGE qua NuPAGE 10% Bis-Tris gels (Invitrogen) sử dụng hệ đệm NuPAGE MOPS (Invitrogen).

Các chế phẩm sinh miễn dịch chứa kháng nguyên PCV-2, ưu tiên kháng nguyên PCV-2 ORF2 tinh chế được mô tả ở đây, ưu tiên kháng nguyên có thể thu được bằng các phương pháp đã mô tả ở đây có đặc điểm là tính sinh miễn dịch tăng so với chế phẩm sinh miễn dịch không chứa kháng nguyên PCV-2 tinh chế hoặc kháng nguyên PCV-2 ORF2 tinh chế.

Trong trường hợp các vectơ virus như poxvirus tái tổ hợp, adenovirus hoặc baculovirus được sử dụng để sản xuất kháng nguyên PCV-2, ưu tiên kháng nguyên PCV-2 ORF2, khuyến nghị bất hoạt axit nucleic virus bằng sự xử lý bất hoạt phù hợp. Sự bất hoạt này có thể xảy ra tại thời điểm bất kỳ trong suốt sự tinh chế kháng nguyên PCV-2, ưu tiên kháng nguyên PCV-2 ORF2. Do đó, sự bất hoạt có thể xảy ra ngay sau khi thu chất lỏng của môi trường nuôi cấy tế bào chứa kháng nguyên PCV-2, ưu tiên kháng nguyên PCV-2 ORF2, hoặc sau sự vi lọc của kháng nguyên PCV-2, ưu tiên

kháng nguyên PCV-2 ORF2, nếu sự vi lọc được thực hiện, trước hoặc sau bước tinh chế, ví dụ, trước hoặc sau sự lọc gel, và trước hoặc sau sắc ký trao đổi anion, nếu bước này được thực hiện.

Phương pháp bất hoạt truyền thống bất kỳ có thể được sử dụng nhằm mục đích của sáng chế. Do đó, sự bất hoạt có thể được thực hiện bằng các bước xử lý hóa học và/hoặc vật lý. Ở các dạng ưu tiên, thể tích của chất lưu thu được được xác định và nhiệt độ nằm trong khoảng từ 32°C đến 42°C, ưu tiên hơn nằm trong khoảng từ 34°C đến 40°C, và ưu tiên nhất nằm trong khoảng từ 35°C đến 39°C. Các phương pháp bất hoạt ưu tiên bao gồm etylenimin hai thành phần được tạo vòng bổ sung (BEI), ưu tiên trong nồng độ khoảng từ 1 đến khoảng 20mM, ưu tiên khoảng từ 2 đến khoảng 10mM, ưu tiên hơn nữa khoảng từ 2 đến khoảng 8mM, ưu tiên hơn nữa khoảng từ 3 đến khoảng 7mM, ưu tiên nhất khoảng 5mM. Ví dụ, sự bất hoạt bao gồm bổ sung dung dịch chứa 2-bromoetylenamin hydrobromua (BEA), ưu tiên khoảng 0,4 M, mà được tạo vòng tới etylenimin hai thành phần 0,2 M (BEI) trong NaOH 0,3 N, vào các chất lưu để cho ra nồng độ cuối khoảng BEI 5mM. Ưu tiên, các chất lỏng sau đó được khuấy liên tục trong khoảng thời gian 2 - 96 giờ và các chất lưu thu được đã bất hoạt có thể được bảo quản đông lạnh tại nhiệt độ 40°C hoặc thấp hơn hoặc trong khoảng từ 1°C đến 7°C. Sau khi bất hoạt xong, dung dịch natri thiosulfat, ưu tiên tại 1,0 M được bổ sung để trung hòa BEI còn lại. Ưu tiên, natri thiosulfat được bổ sung trong lượng tương đương với BEI được bổ sung trước đó cho sự bất hoạt. Ví dụ, trong trường hợp BEI được bổ sung vào nồng độ cuối là 5mM, dung dịch natri thiosulfat được bổ sung vào để cho ra nồng độ tối thiểu cuối cùng là 5mM để trung hòa BEI còn lại bất kỳ.

Trước khi trộn kháng nguyên PCV-2 đã tinh chế, ưu tiên kháng nguyên PCV-2 ORF2 với chất phụ trợ, nên thẩm tách kháng nguyên PCV-2, ưu tiên kháng nguyên PCV-2 ORF2 với nước muối đệm phosphat, pH = 7,4 hoặc đệm sinh lý bất kỳ khác.

Các phương pháp đã mô tả ở trên dẫn đến kháng nguyên PCV-2 với hoạt tính diệt virus giảm như được xác định ở đây cũng như dẫn đến tính sinh miễn dịch được cải thiện, nếu kháng nguyên PCV-2 có mức tính khiết lớn hơn 50% (trọng lượng/trọng lượng), ưu tiên lớn hơn 70% (trọng lượng/trọng lượng), thậm chí ưu tiên lớn hơn 80% (trọng lượng/trọng lượng), thậm chí ưu tiên lớn hơn 85% (trọng lượng/trọng lượng) so với tổng lượng protein được bao gồm trong chế phẩm sinh miễn dịch trước khi trộn

với chất phụ trợ bất kỳ. Tuy nhiên, kháng nguyên PCV-2 đã tinh chế theo phương pháp II này cũng có thể được trộn và sử dụng cùng với chất phụ trợ, ưu tiên với chất phụ trợ bất kỳ được mô tả ở đây. Chất phụ trợ ưu tiên là Carbopol, ưu tiên trong nồng độ khoảng từ 0,1 đến 10mg/ml, ưu tiên hơn trong nồng độ từ 0,5 đến 5mg/ml, ưu tiên nhất khoảng 1mg/ml của chế phẩm sinh miễn dịch cuối cùng.

Sáng chế không chỉ đề xuất phương pháp bất kỳ đã mô tả ở đây, bao gồm phương pháp II khác, mà còn đề xuất kháng nguyên PCV-2, ưu tiên kháng nguyên PCV-2 tinh chế, ưu tiên nhất protein PCV-2 ORF-2 tinh chế thu được bằng phương pháp bất kỳ đã mô tả ở đây, bao gồm phương pháp II khác. Hơn thế nữa, sáng chế còn đề xuất chế phẩm kháng nguyên PCV-2 chứa kháng nguyên PCV-2, ưu tiên kháng nguyên PCV-2 tinh chế, ưu tiên nhất protein PCV-2 ORF-2 tinh chế thu được bằng phương pháp bất kỳ đã mô tả ở đây, bao gồm phương pháp II khác. Lượng kháng nguyên PCV-2, cụ thể kháng nguyên PCV-2 ORF2 trong chế phẩm sinh miễn dịch cuối cùng phải nằm trong khoảng từ 0,25 đến khoảng 400µg trên liều dùng đối với chế phẩm sinh miễn dịch cuối cùng. Ưu tiên chế phẩm sinh miễn dịch cuối cùng bao gồm lượng kháng nguyên PCV-2, ưu tiên kháng nguyên PCV-2 ORF2 trong khoảng từ khoảng 2 đến khoảng 200µg/liều dùng, thậm chí ưu tiên hơn từ khoảng 3 đến khoảng 150µg/liều dùng, ưu tiên hơn nữa từ khoảng 4 đến khoảng 100µg/liều dùng, ưu tiên hơn nữa từ khoảng 5 đến khoảng 80µg/liều dùng, ưu tiên hơn nữa từ khoảng 6 đến khoảng 60µg/liều dùng, thậm chí ưu tiên hơn từ khoảng 7 đến khoảng 50µg/liều dùng, thậm chí ưu tiên hơn từ khoảng 8 đến khoảng 40µg/liều dùng, ưu tiên hơn nữa từ khoảng 8 đến khoảng 32µg/liều dùng, thậm chí ưu tiên hơn từ khoảng 8 đến khoảng 24µg/liều dùng, và ưu tiên nhất từ khoảng 8 đến khoảng 16µg/liều dùng.

Các chế phẩm sinh miễn dịch được đề xuất ở đây, bao gồm các chế phẩm có thể thu được bằng phương pháp II chứa một hoặc nhiều kháng nguyên khác của vi sinh vật gây bệnh. "Các vi sinh vật gây bệnh khác" được xác định ở trên. Ưu tiên kháng nguyên khác là virus gây hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn. Thậm chí ưu tiên hơn, kháng nguyên virus gây hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn bao gồm virus sống, và ưu tiên hơn nữa virus sống biến đổi. Ưu tiên hơn nữa, kháng nguyên virus gây hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn bao gồm chủng virus sống cải biến của của VR có số hiệu lưu giữ ATCC 2332, và ưu tiên hơn nữa bao gồm INGELVAC® PRRS

MLV. Theo khía cạnh khác của sáng chế, kháng nguyên bổ sung là *Mycoplasma hyopneumoniae*. Ưu tiên, kháng nguyên *Mycoplasma hyopneumoniae* là vi khuẩn, và ưu tiên hơn, vi khuẩn *Mycoplasma hyopneumoniae* là INGELVAC® MYCOFLEX. Ưu tiên nhất là các tổ hợp với, cả kháng nguyên của virus gây hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn và *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Do tính sinh miễn dịch tăng của chế phẩm sinh miễn dịch chứa kháng nguyên PCV-2, ưu tiên kháng nguyên PCV-2 ORF2 tinh chế được nêu ở đây, các chế phẩm sinh miễn dịch có thể được sử dụng để làm giảm tỷ lệ mắc mới hoặc làm giảm tính nghiêm trọng của các dấu hiệu lâm sàng do sự nhiễm PCV-2 gây ra hoặc liên quan đến sự nhiễm PCV-2 so với động vật không nhận chế phẩm sinh miễn dịch đó.

Thuật ngữ "giảm tỷ lệ mắc mới các dấu hiệu lâm sàng hoặc tính nghiêm trọng của các dấu hiệu lâm sàng" có nghĩa là bất kỳ dấu hiệu được giảm ở tỷ lệ mắc mới hoặc tính nghiêm trọng ở động vật nhận vaccin so với "nhóm động vật đối chứng" khi cả hai bị lây nhiễm hoặc thử thách bởi thể sinh bệnh từ đó (các) thành phần hoạt tính sinh miễn dịch trong vaccin được dẫn xuất và trong đó nhóm đối chứng không nhận sự đưa vào vaccin hoặc chế phẩm sinh miễn dịch. Trong ngữ cảnh này, thuật ngữ "giảm" có nghĩa là giảm đi ít nhất 10%, ưu tiên 25%, thậm chí ưu tiên hơn 50%, ưu tiên nhất lớn hơn 100% ở nhóm được tiêm chủng so với nhóm đối chứng không được tiêm chủng.

Như được sử dụng ở đây, "các triệu chứng lâm sàng" hoặc "dấu hiệu lâm sàng" chỉ các dấu hiệu lây nhiễm từ thể gây bệnh mà có thể quan sát trực tiếp từ động vật sống như các triệu chứng. Các mẫu tiêu biểu sẽ phụ thuộc vào thể sinh vật được chọn nhưng có thể bao gồm các thứ như dịch mũi, hôn mê, ho, sốt cao, tăng hoặc giảm cân, khử nước, tiêu chảy, sưng tấy, đi khắp khiêng, và tương tự. Các dấu hiệu lâm sàng PCV-2 có thể bao gồm suy mòn, da xanh xao, không phát triển, suy hô hấp, tiêu chảy và vàng da.

Giảm tỷ lệ mắc mới các dấu hiệu lâm sàng hoặc tính trầm trọng của các dấu hiệu lâm sàng do sự lây nhiễm PCV-2 hoặc liên quan đến sự lây nhiễm PCV-2 ở động vật có thể đạt được bằng cách đưa chỉ một liều đơn chế phẩm sinh miễn dịch vào động vật cần sự điều trị này. Tuy nhiên, chế phẩm sinh miễn dịch được đề xuất ở đây cũng

có thể được đưa vào trong hai hoặc nhiều liều, với khoảng cách từ 2 đến 4 tuần giữa liều dùng thứ nhất và liều dùng tiếp theo. Do đó, theo khía cạnh khác, chế phẩm sinh miễn dịch được đề xuất ở đây chứa kháng nguyên PCV-2 tinh chế, ưu tiên kháng nguyên PCV-2 ORF2 tinh chế có thể được đưa trong một, hai hoặc nhiều liều vào động vật cần chúng.

Cụ thể, theo khía cạnh khác của sáng chế, chế phẩm sinh miễn dịch chứa chế phẩm kháng nguyên PCV-2 như được mô tả ở trên được đề xuất trong đó chế phẩm sinh miễn dịch, khi được đưa vào động vật, làm giảm sự phá hủy bạch huyết và viêm đi ít nhất 80% ở động vật so với động vật không nhận chế phẩm sinh miễn dịch. Do đó, theo khía cạnh khác của sáng chế, chế phẩm sinh miễn dịch được đề xuất chứa chế phẩm kháng nguyên PCV-2 như đã mô tả ở trên và chế phẩm sinh miễn dịch làm giảm sự phá hủy bạch huyết và viêm đi ít nhất 80% ở động vật nhận chế phẩm sinh miễn dịch so với động vật không nhận chế phẩm sinh miễn dịch.

Theo khía cạnh khác của sáng chế, chế phẩm sinh miễn dịch chứa chế phẩm kháng nguyên PCV-2 như được mô tả ở trên được đề xuất, trong đó chế phẩm sinh miễn dịch, khi được đưa vào động vật, làm giảm thương tổn phổi đi ít nhất 80% ở động vật so với động vật không nhận chế phẩm sinh miễn dịch. Do đó, theo khía cạnh khác của sáng chế, chế phẩm sinh miễn dịch chứa chế phẩm kháng nguyên PCV-2 như đã mô tả ở trên và chế phẩm sinh miễn dịch làm giảm sự thương tổn phổi đi ít nhất 80% ở động vật nhận chế phẩm sinh miễn dịch so với động vật không nhận chế phẩm sinh miễn dịch.

Theo khía cạnh khác của sáng chế, chế phẩm sinh miễn dịch chứa chế phẩm kháng nguyên PCV-2, như được mô tả ở trên, được đề xuất trong đó chế phẩm sinh miễn dịch gây ra đáp ứng miễn dịch bảo vệ chống lại PCV-2 sau khi sử dụng một liều dùng chế phẩm sinh miễn dịch. Chế phẩm sinh miễn dịch chứa chế phẩm kháng nguyên PCV-2 có thể có thể tích bất kỳ bao gồm 1ml, 2ml, 3ml, 4ml, 5ml và cao hơn. Ở các dạng ưu tiên, 2ml chế phẩm sinh miễn dịch bao gồm một liều dùng kháng nguyên PCV-2. Do đó, theo khía cạnh khác của sáng chế, chế phẩm sinh miễn dịch chứa chế phẩm kháng nguyên PCV-2, như được mô tả ở trên được đề xuất trong đó chế phẩm sinh miễn dịch gồm PCV-2 gây ra đáp ứng miễn dịch bảo vệ chống lại PCV-

2 sau khi sử dụng một liều dùng chế phẩm sinh miễn dịch. Theo khía cạnh khác, 2ml chế phẩm sinh miễn dịch bao gồm một liều dùng kháng nguyên PCV-2.

Như được sử dụng ở đây, "đáp ứng miễn dịch bảo vệ" chỉ tỷ lệ mắc mới hoặc tính trầm trọng giảm của các dấu hiệu hoặc triệu chứng lây nhiễm lâm sàng, bệnh lý hoặc mô bệnh học từ thể sinh bệnh và bao gồm sự ngăn ngừa hoàn toàn của các dấu hiệu hoặc triệu chứng này.

Thuật ngữ dấu hiệu "bệnh lý" chỉ dấu hiệu lây nhiễm mà có thể quan sát được tại mức vi mô hoặc phân tử, qua thử nghiệm sinh học, hoặc bằng mắt trần nhờ sự mổ tử thi. Đối với PCV-2, các dấu hiệu bệnh lý sẽ bao gồm những thương tổn vi mô và vĩ mô trên nhiều mô và cơ quan, với các cơ quan bạch huyết là vị trí thương tổn nhiều nhất.

Thuật ngữ dấu hiệu "mô bệnh học" chỉ dấu hiệu thay đổi mô do sự lây nhiễm.

Các thuật ngữ, "triệu chứng lâm sàng" hoặc "dấu hiệu lâm sàng" được xác định ở trên.

Theo khía cạnh khác của sáng chế, chế phẩm sinh miễn dịch chứa chế phẩm kháng nguyên PCV-2 và kháng nguyên PRRRS, ưu tiên một bất kỳ trong số các kháng nguyên PRRS được mô tả ở đây, như đã mô tả ở trên, được đề xuất trong đó chế phẩm sinh miễn dịch gây ra đáp ứng miễn dịch bảo vệ chống lại PRRS sau khi sử dụng một liều dùng chế phẩm sinh miễn dịch. Thể tích liều dùng có thể được tạo ra, nhưng ở các dạng ưu tiên, 2ml của chế phẩm sinh miễn dịch gồm một liều dùng chứa kháng nguyên PRRS và một liều dùng chứa kháng nguyên PCV-2. Do đó, theo khía cạnh khác của sáng chế, chế phẩm sinh miễn dịch như đã mô tả ở trên chứa PRRSV và chế phẩm kháng nguyên PCV-2 như được mô tả ở đây, được đề xuất trong đó chế phẩm sinh miễn dịch gây ra đáp ứng miễn dịch bảo vệ chống lại PRRS sau khi sử dụng một liều dùng chế phẩm sinh miễn dịch. Theo khía cạnh khác, 2ml chế phẩm sinh miễn dịch bao gồm một liều dùng chứa kháng nguyên PRRS và một liều dùng chứa kháng nguyên PCV-2.

Theo khía cạnh khác của sáng chế, chế phẩm sinh miễn dịch chứa chế phẩm kháng nguyên PCV-2 như được mô tả ở đây và kháng nguyên *Mycoplasma*

hyopneumoniae như được mô tả ở trên, được đề xuất trong đó chế phẩm sinh miễn dịch gây ra đáp ứng miễn dịch bảo vệ chống lại *Mycoplasma hyopneumoniae* sau khi sử dụng một liều dùng chế phẩm sinh miễn dịch. Thử nghiệm liều dùng bất kỳ có thể được tạo ra, nhưng ở các dạng ưu tiên, 2ml của chế phẩm sinh miễn dịch gồm một liều dùng chứa kháng nguyên *Mycoplasma hyopneumoniae* và một liều dùng chứa kháng nguyên PCV-2. Do đó, theo khía cạnh khác của sáng chế, chế phẩm sinh miễn dịch như đã mô tả ở trên được đề xuất trong đó chế phẩm sinh miễn dịch gây ra đáp ứng miễn dịch bảo vệ chống lại *Mycoplasma hyopneumoniae* sau khi sử dụng một liều dùng chế phẩm sinh miễn dịch chứa chế phẩm kháng nguyên PCV-2 như được mô tả ở đây và kháng nguyên *Mycoplasma hyopneumoniae*. Theo khía cạnh khác, 2ml chế phẩm sinh miễn dịch bao gồm một liều dùng kháng nguyên *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Theo khía cạnh khác của sáng chế, chế phẩm sinh miễn dịch, như được mô tả ở trên, được điều chế để sử dụng 2ml trên liều dùng.

Theo khía cạnh khác của sáng chế, phương pháp làm giảm một hoặc nhiều triệu chứng lâm sàng của sự lây nhiễm PCV-2 ở động vật so với động vật không nhận chế phẩm sinh miễn dịch được đề xuất. Nhìn chung, phương pháp này bao gồm bước đưa vào động vật các chế phẩm sinh miễn dịch chứa kháng nguyên PCV-2 hoặc chế phẩm như được mô tả ở trên. Ưu tiên, một hoặc nhiều triệu chứng lâm sàng của sự lây nhiễm PCV-2 được giảm sau khi sử dụng liều dùng đơn của chế phẩm sinh miễn dịch. Do đó, theo khía cạnh khác của sáng chế, phương pháp làm giảm một hoặc nhiều triệu chứng lâm sàng của sự lây nhiễm PCV-2 ở động vật so với động vật không nhận chế phẩm sinh miễn dịch chứa kháng nguyên PCV-2 như được mô tả ở đây được đề xuất. Nói chung, phương pháp bao gồm bước đưa vào động vật chế phẩm sinh miễn dịch bất kỳ đã nói gồm chế phẩm kháng nguyên PCV-2 được mô tả ở trên, trong đó một hoặc nhiều triệu chứng lâm sàng của sự lây nhiễm PCV-2 được giảm, ưu tiên sau khi sử dụng liều dùng đơn của chế phẩm sinh miễn dịch đã nói chứa chế phẩm kháng nguyên PCV-2 như đã mô tả ở đây.

Theo khía cạnh khác của sáng chế, phương pháp làm giảm một hoặc nhiều triệu chứng lâm sàng của sự lây nhiễm PRRS ở động vật so với động vật không nhận chế phẩm sinh miễn dịch được đề xuất. Nhìn chung, phương pháp này bao gồm bước đưa vào động vật các chế phẩm sinh miễn dịch bất kỳ đã nói gồm kháng nguyên PCV-2

nhu được mô tả ở đây và Virut PRRS như được mô tả ở đây. Ưu tiên, một hoặc nhiều triệu chứng lâm sàng của sự lây nhiễm PRRS được giảm sau khi sử dụng liều dùng đơn của chế phẩm sinh miễn dịch chứa chế phẩm kháng nguyên PCV-2 như được mô tả ở đây và virut PRRS như được mô tả ở đây. Do đó, theo khía cạnh khác của sáng chế, phương pháp làm giảm một hoặc nhiều triệu chứng lâm sàng của sự lây nhiễm PRRS ở động vật so với động vật không nhận chế phẩm sinh miễn dịch chứa kháng nguyên PCV-2 như được mô tả ở đây và virut PRRS như được mô tả ở đây, được đề xuất. Dấu hiệu lâm sàng của virut gây hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRSV) bao gồm, nhưng không hạn chế, không ham muốn, sốt, sảy thai, đổi màu tạm thời, tình dục kéo dài, ho, dấu hiệu về hô hấp, chứng viêm vú, chứng mất sữa, hôn mê, lợn con ướp, sinh thai chết, lợn con yếu khi sinh, giảm tốc độ lứa đẻ, đẻ sớm, tiêu chảy, hao mòn dần, hắt hơi, chảy mủ mắt, da tái, chết, và sự kết hợp của các dấu hiệu này.

Theo khía cạnh khác của sáng chế, phương pháp làm giảm một hoặc nhiều triệu chứng lâm sàng của sự lây nhiễm *Mycoplasma hyopneumoniae* ở động vật so với động vật không nhận chế phẩm sinh miễn dịch chứa kháng nguyên PCV-2 như được mô tả ở đây và kháng nguyên *Mycoplasma hyopneumoniae* như được mô tả ở đây, được đề xuất. Nhìn chung, phương pháp này bao gồm bước đưa vào động vật các chế phẩm sinh miễn dịch như đã mô tả ở trên. Ưu tiên, một hoặc nhiều triệu chứng lâm sàng của sự lây nhiễm *Mycoplasma hyopneumoniae* được giảm sau khi sử dụng liều dùng đơn của chế phẩm sinh miễn dịch chứa chế phẩm kháng nguyên PCV-2 như được mô tả ở đây và kháng nguyên *Mycoplasma hyopneumoniae* như được mô tả ở đây. Do đó, theo khía cạnh khác của sáng chế, phương pháp làm giảm một hoặc nhiều triệu chứng lâm sàng của sự lây nhiễm *Mycoplasma hyopneumoniae* ở động vật so với động vật không nhận chế phẩm sinh miễn dịch chứa kháng nguyên PCV-2 như được mô tả ở đây và kháng nguyên *Mycoplasma hyopneumoniae* như được mô tả ở đây, được đề xuất. Dấu hiệu lâm sàng của sự lây nhiễm *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyo*) bao gồm, nhưng không hạn chế, ho khan, năng suất giảm, và thương tổn phổi.

Chế phẩm sinh miễn dịch chứa kháng nguyên PCV-2 tinh chế, ưu tiên kháng nguyên PCV-2 ORF2 như được đề xuất ở đây, có tính sinh miễn dịch cải thiện. Do đó, chế phẩm sinh miễn dịch được đề xuất ở đây thích hợp để cải thiện đáp ứng miễn dịch

ở động vật nhận chế phẩm sinh miễn dịch. Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp cải thiện đáp ứng miễn dịch ở động vật chống lại PCV-2 gồm bước: đưa chế phẩm sinh miễn dịch như được mô tả ở đây và có kháng nguyên PCV-2 tinh chế, ưu tiên protein PCV-2 ORF-2 tinh chế như được đề xuất ở đây, vào động vật cần chúng. Theo khía cạnh ưu tiên, kháng nguyên PCV-2, ưu tiên kháng nguyên PCV-2 ORF2 sử dụng trong phương pháp được tinh chế tới mức lớn hơn 60% (trọng lượng/trọng lượng), ưu tiên lớn hơn 60% (trọng lượng/trọng lượng), thậm chí ưu tiên tới lớn hơn 70% (trọng lượng/trọng lượng), thậm chí ưu tiên tới lớn hơn 80% (trọng lượng/trọng lượng), ưu tiên hơn tới lớn hơn 90% (trọng lượng/trọng lượng), ưu tiên nhất tới lớn hơn 95% (trọng lượng/trọng lượng) so với tổng lượng protein có trong chế phẩm sinh miễn dịch. Độ tinh khiết có thể được ước tính bằng phương pháp nhuộm Imperial Protein Stain (Pierce) sau SDS PAGE qua NuPAGE 10% Bis-Tris gels (Invitrogen) sử dụng hệ đệm NuPAGE MOPS (Invitrogen). PCV-2, và ưu tiên PCV-2 ORF2 có thể được tinh chế bằng cách sử dụng các phương pháp truyền thống đã biết đối với người có hiểu biết về lĩnh vực.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau thể hiện vật liệu và quy trình ưu tiên theo sáng chế. Tuy nhiên, cần phải hiểu rằng các ví dụ này được đề xuất chỉ để minh họa, và trong đó không có ví dụ nào được cho là sự giới hạn toàn bộ phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1

Ví dụ này mô tả quy trình ở quy mô phòng thí nghiệm và quy mô thử nghiệm để sản xuất kháng nguyên PCV-2 ORF2 cô đặc mà sẽ có hoạt tính diệt virus giảm so với các quy trình sản xuất mà không bao gồm các bước của sáng chế. Cụ thể, tác dụng mà sáng chế tạo ra đối với hoạt tính diệt virus của kháng nguyên PCV-2 ORF2 lên virus PRRS sẽ được xác định.

Vật liệu và phương pháp

Sản xuất kháng nguyên:

Quy mô thí nghiệm:

PCV SUB037 H1-F, 18,94kg

PCV 1025, 20,6kg

PCV 180/181, 20kg

PCV SUB 504PD, 40kg

Quy mô thử nghiệm:

PCV SUB 506PD, 362kg

PCV SUB 507PD, 384kg

PCV SUB512PD, 430kg

PCV SUB 513PD, 405kg

Hộp siêu lọc: GE Healthcare, Steam-In-Place (SIP), hộp màng lọc rỗng

UFP-100-E-55-STM: 100000 NMWC, ống nhỏ đường kính 1mm; được sử dụng trong UF-002 trong X109, quy mô thí nghiệm.

UFP-300-E-55-STM: 300000 NMWC, ống nhỏ đường kính 1mm; được sử dụng trong UF-002 trong X109, quy mô thí nghiệm.

UFP-100-E-65-MSM: 100000 NMWC, ống nhỏ đường kính 1mm; được sử dụng trong UF-B2614, trong APU-1, quy mô thử nghiệm.

UFP-300-E55-SMO: 300000 NMWC, ống nhỏ đường kính 1mm; được sử dụng trong UF-2713, trong VP-1, quy mô thử nghiệm.

Thiết bị siêu lọc dưới đây được sử dụng trong đánh giá tính khả thi và sự phát triển quy trình ban đầu:

Bảng 1. Thiết bị:

Bước của quy trình	Thủ tục	Thiết bị:	Nhận dạng
Siêu lọc	Nồng độ kháng nguyên	Flex-Stand Concentrator	UF-002 trong X109, quy mô thí nghiệm
		UF Skid	UF-B2614 trong APU-1, quy mô thử nghiệm
		UF Skid	UF-2713 trong VP-1, quy mô thử nghiệm

Quy trình sản xuất:

Cấu hình siêu lọc (UF): Quy mô thí nghiệm

Bình hóa chất 50l chứa vật liệu PCV-2 ORF2 đã được lọc, bất hoạt, trung hòa được tạo ra trong cấu trúc P được sử dụng trong quy trình cô đặc với GE Healthcare (Amersham) Flex Stand 30L size UF skid #002.

Các quy trình cô đặc ban đầu sử dụng sơ đồ lọc màng "theo mẻ", trong đó xấp xỉ 20kg kháng nguyên vật liệu được chuyển sang UF skid và được cô đặc qua hộp sợi rỗng 100000 NMWC (UFP-100-E-55-STM). Quy trình cô đặc 100000 NMWC sử dụng các lô PCV-2 ORF2 vật liệu SUB037PD và PCV1025 từ PD và Manufacturing tương ứng.

Hai chu trình ban đầu này được cô đặc tới xấp xỉ 4 lần của thể tích ban đầu và được chứng minh số lượng (Q.S.'d) trong thùng nạp ngược trở lại thể tích chuyển ban đầu. Nguyên liệu đã cô đặc được xử lý theo cách này đối với tổng 2 lần cô đặc trên số lô, với sự cô đặc thứ ba và cuối cùng thu được là chất cô đặc và phần (Q.S.'d) tới 1 lần của thể tích ban đầu. Các mẫu được rút trước khi cô đặc, tại mỗi bước cô đặc và tại mỗi bước Q.S. Các mẫu thấm được rút trong mỗi bước cô đặc.

Hai chu trình tiếp theo cô đặc kháng nguyên PCV-2 ORF2 không có sự rửa bằng nước muối. Vật liệu đã cô đặc được lấy mẫu tại xấp xỉ 4 lần và sau đó tại nồng độ cuối cùng. Xấp xỉ 20kg kháng nguyên vật liệu được chuyển sang thùng chứa UF skid và được cô đặc qua hộp sợi rỗng 300000 NMWC (UFP-300-E-55-STM). Thể tích 20l thứ hai được bổ sung vào bình chứa với chất cô đặc từ 20l ban đầu. Hỗn hợp này được cô đặc tới thể tích cuối cùng. Các quy trình cô đặc 300000 NMWC sử dụng các lô PCV-2 ORF2 bể PCV 180/181 và SUB504PD được tương ứng được tạo ra bởi Manufacturing và PD. Các mẫu được rút trước khi cô đặc, và tại mỗi bước cô đặc. Các mẫu thấm được rút trong mỗi bước cô đặc.

Cấu hình siêu lọc: Quy mô thử nghiệm:

Quy trình ở quy mô thử nghiệm sử dụng các lô SUB 506PD, 512PD và 513PD. Thể tích trước khi cô đặc của kháng nguyên nằm trong khoảng xấp xỉ từ 350l đến 430l. Các lô SUB506PD và SUB513PD được chuyển sang DSP (xử lý xuôi dòng) 2602 và

được cô đặc với UF-B2614 trong APU-1 bằng cách sử dụng bộ lọc 100000 NMWC (UFP-100-65-E-MSM), với diện tích bề mặt $4,2\text{m}^2$. SUB512PD được chuyển vào DSP 2701 và được cô đặc với UF-2713 bằng cách sử dụng bộ lọc 300000 NMWC (UFP-300-E-SMO) với diện tích bề mặt $2,1\text{m}^2$. Nguyên liệu đã cô đặc cuối cùng được thu lại đối với mỗi lô và được bảo quản tại nhiệt độ 4°C để phân tích.

Kết quả và kết luận

Cấu hình siêu lọc (UF): Quy mô thí nghiệm

Sự lọc bằng bộ lọc 100000 NMWC (100kDa) so với bộ lọc 300000 NMWC (300kDa) có thể so sánh về thời gian cô đặc và có tính khả thi khi xem xét quy trình quy mô đầy đủ. Thời gian lọc đối với bộ lọc 100kDa, cô đặc 4 lần, với xấp xỉ từ 181 đến 261, nằm trong khoảng từ 14 phút đến 32 phút, với thời gian ngắn hơn do các bước rửa bằng nước muối (Bảng 2). Thời gian lọc đối với bộ lọc 300kDa, cô đặc 3,2 lần, 7 lần đối với PCV180/181 và 21,5 lần đối với SUB504PD với xấp xỉ 40l nguyên liệu được cô đặc trong hai thể tích 20l liên tiếp cho ra 3,2 lần tại 25 phút, 7 lần tại 23 phút và 21,5 lần tại 32 phút. Đôi khi sự thay đổi là thích hợp do thời gian cần để thực hiện quy trình cô đặc tới áp suất xuyên màng đích (TMP) là 10,25 psi.

Trị số dòng chảy của quy trình nằm trong khoảng từ 27,43l/h đến 32l/h đối với lô PCV180/181, với trị số 32l/h do định hướng tới cuối của quy trình cô đặc. Các trị số dòng chảy đối với nguyên liệu SUB 504PD là 28,57l/h trong suốt sự cô đặc 20l đầu tiên và 35,71l/h trong suốt sự cô đặc 20l thứ hai. (Bảng 3 và 4)

Bảng 2. Dữ liệu của quy trình

Lô #	Thể tích cô đặc ban đầu	Số lần cô đặc	Thời gian cô đặc (phút)
PCV037 QS-0 (100kDa)	18,94	4,17	24
PCV037 QS-1 (100kDa)	18,76	4,75	16
PCV037 QS-2 (100kDa)	19,05	4,70	14
PCV 1025 QS-0 (100kDa)	20,59	4,39	28
PCV 1025 QS-1 (100kDa)	20,24	4,65	29
PCV 1025 QS-2 (100kDa)	18,71	3,6	17
PCV 180/181 cô đặc-1 (300kDa)	20	3,5	25
PCV 180/181 cô đặc-2 (300kDa)	16,01	7	23
SUB504PD cô đặc-2 (300kDa)	24,72	21,5	32

Bảng 3. Dữ liệu của quy trình

Bộ lọc PCV 180/181 : 300000NMWC				
	Thời gian	TMP	Dòng perm (ml/phút)	Dòng chảy (l/mh)
Cô đặc -1	9:55	9	N/A	N/A
Cô đặc -2	10:23	12,5	N/A	N/A
Cô đặc -2	10:30	12,5	960	27,43
Cô đặc -2	10:33	14,5	960	27,43
Cô đặc -2	10:36	10,5	1120	32,00
Cô đặc -2	10:39	11	810	23,14

Bảng 4. Dữ liệu của quy trình

Bộ lọc SUB504PD :300000 NMWC				
	Thời gian	TMP	Dòng PERM (ml/phút)	Dòng chảy (l/mh)
Cô đặc 1	15:29	9,5	1000	28,57
Cô đặc 2	16:00	10,25	1250	35,71

Sự thay đổi về tính hiệu nghiệm sau khi lọc được thấy là không đổi khi nguyên liệu cô đặc được chứng minh số lượng trở lại thể tích 1X, như với nguyên liệu hoàn nguyên SUB 037. Trị số về hàm lượng kháng nguyên cô đặc đầy giới hạn của thử nghiệm vượt quá giới hạn xấp xỉ 64 μ g, như được thấy trong các trị số trong các bảng từ 5 đến 8 trong đó lượng hàm lượng kháng nguyên được so sánh với lượng tính toán mong muốn. Các giá trị thẩm qua từ các nồng độ thực hiện sử dụng các kháng nguyên SUB 037, PCV 180/181 và SUB 504PD không thể hiện sự hao hụt nguyên liệu nhiều do lọc. Tất cả các lượng hàm lượng kháng nguyên thẩm qua nằm trong khoảng không thể phát hiện của thử nghiệm. Lượng hàm lượng kháng nguyên thẩm qua của kháng nguyên PCV 1025 không được thu lại.

Bảng 5. Sự thay đổi SUB 037 ở hàm lượng kháng nguyên PCV-2 (theo µg)

Số lô/ thể tích	Hàm lượng kháng nguyên trước khi cô đặc	Hàm lượng kháng nguyên sau cô đặc	Hệ số cô đặc	Hàm lượng kháng nguyên theo tính toán	Sự thay đổi từ hàm lượng kháng nguyên theo tính toán	Thu được/hao hụt từ RP theo tính toán
SUB 037 (18,94kg)--4,7x—100kDa--PDX	56	137,6	4,7	263,2	-125,6	hao hụt
Cô đặc và hoàn nguyên với nước muối: QS-1	56	61,6	1	56	5,6	thu được
Cô đặc và hoàn nguyên với nước muối: QS-2	56	62,7	1	56	6,7	thu được
Cô đặc và hoàn nguyên với nước muối: QS-3	56	55,8	1	56	-0,2	hao hụt
SUB 037 thấm qua 1,2,3	--	0			Không hao hụt	

Bảng 6. Sự thay đổi PCV 1025 ở hàm lượng kháng nguyên PCV-2 (theo µg)

Số lô/ thể tích	Hàm lượng kháng nguyên trước cô đặc	Hàm lượng kháng nguyên sau cô đặc	Hệ số cô đặc	Hàm lượng kháng nguyên theo tính toán	Sự thay đổi từ hàm lượng kháng nguyên theo tính toán	Thu được/hao hụt từ RP theo tính toán
1025 (20,46kg)--4,5X--100kDa--PDX	70,88	288,64	4,5	318,96	-30,32	hao hụt
Cô đặc và hoàn nguyên với nước muối -1	N/A(Không mẫu)	N/A	1	N/A	N/A	không mẫu
Cô đặc và hoàn nguyên với nước muối -2	70,88	66,24	1	70,88	-4,64	hao hụt
Cô đặc và hoàn nguyên với nước muối -3	70,88	76,00	1	70,88	5,12	thu được
1025 thấm qua	--	N/A			N/A	

Bảng 7. Sự thay đổi ở hàm lượng kháng nguyên PCV-2 (theo µg)

Số lô/ thể tích	Hàm lượng kháng nguyên trước cô đặc	Hàm lượng kháng nguyên sau cô đặc	Hệ số cô đặc	Hàm lượng kháng nguyên theo tính toán	Sự thay đổi từ hàm lượng kháng nguyên theo tính toán	Thu được/hao hụt từ RP theo tính toán
180/181 (40,3kg)-3,5X--300kDa--PDX	43,36	90,8	3,5	151,76	-60,96	hao hụt
180/181 7,2X	43,36	247,04	7,2	312,19	-65,15	hao hụt
180/181 thấm qua	--	0			Không hao hụt	N/A

Bảng 8. Sự thay đổi ở hàm lượng kháng nguyên PCV-2 (theo µg)

Số lô/ thể tích	Hàm lượng kháng nguyên trước cô đặc	Hàm lượng kháng nguyên sau cô đặc	Hệ số cô đặc	Hàm lượng kháng nguyên theo tính toán	Sự thay đổi từ hàm lượng kháng nguyên theo tính toán	Thu được/hao hụt từ RP theo tính toán
SUB504 (40,43kg) 4,3X—300kDa--PDX	22,24	68,16	4,3	95,63	-27,47	hao hụt
SUB504 20X	22,24	448,48	20	444,8	3,68	thu được
SUB504 thấm qua	--	0			Không hao hụt	

Các gel SDS-PAGE được chạy với nguyên liệu từ PCV 180/181 và SUB 504PD trong R&D. Dải ORF2 lưu trú tại xấp xỉ 27kDa trong Fig.1 thích hợp với kiểu phân dải của dải tham khảo trong dải 10. Kích thước dải trước đây đã được xác định là ORF2. Nguyên liệu thấm qua từ SUB 504PD, nồng độ lọc 300kDa, thể hiện sự vắng mặt của sự tạo dải tại vị trí 27kDa. Rõ ràng không có protein ORF2 bị mất mát với bộ lọc kích thước lỗ này. Gen được chạy dưới các điều kiện giảm.

Hoạt tính diệt virus của kháng nguyên trước khi cô đặc, kháng nguyên cô đặc, kháng nguyên tái hoàn nguyên và chất thẩm lọc được thử nghiệm so với vaccin virus PRRS. Các kết quả ban đầu từ Quality Control (QC) đối với SUB 037 không thỏa mãn đối với nguyên liệu trước khi cô đặc và đã cô đặc (bộ lọc 100kDa), mà đã được hoàn nguyên trở lại 1 lần với nước muối. Tuy nhiên, khi nguyên liệu đã cô đặc được bào chế thành các vaccin, nồng độ lên tới 80% bao hàm trong vaccin làm giảm hoạt tính diệt virus này tới mức độ thỏa mãn dưới giới hạn chấp nhận là hao hụt 0,7log/ml của chuẩn độ virus PRRS. Vật liệu thấm qua từ SUB 037 thể hiện ranh giới vượt qua mức hoạt tính diệt virus. Xem bảng 9.

Nguyên liệu cô đặc trước PCV 1025 được thấy là không thỏa mãn đối với hoạt tính diệt virus đối với PRRS với sự hao hụt trong chuẩn độ PRRS tại sự hao hụt 1,5log/ml. Ba nguyên liệu cô đặc đã hoàn nguyên nước muối (100kPa) được đi qua tại sự hao hụt 0,5log/ml và sự hao hụt 0,6log/ml với một trong số các chất cô đặc hoàn nguyên thỏa mãn với “sự không thay đổi” ở chuẩn độ PRRS. Các mẫu chất thẩm không được thử nghiệm cho lô này. Xem bảng 10.

Nguyên liệu vaccin đã cô đặc trước PCV 108/181 không thỏa mãn đối với hoạt tính diệt virus cho PRRS đối với 2 hoặc 3 vaccin được điều chế. Mức bao hàm kháng nguyên % nằm trong khoảng từ 37% đến 55,5%. Vaccin cô đặc trước bao hàm % cao nhất được thấy là thỏa mãn.

Các vaccin được điều chế từ vật liệu 1X (được hoàn nguyên đặc thành 1X bằng nước muối) được thấy là thỏa mãn đối với hoạt tính diệt virus cho virus PRRS. Mức bao hàm kháng nguyên % nằm trong khoảng từ 44% đến 66%. Xem bảng 11.

Các vaccin SUB 504PD được điều chế từ kháng nguyên đã cô đặc trước với sự bao hàm vaccin 79,5% thỏa mãn đối với hoạt tính diệt virus cho virus PRRS. Các vaccin được điều chế từ kháng nguyên cô đặc 4,3 lần với sự bao hàm vaccin 23,5-35% và từ kháng nguyên cô đặc 21,5X với sự bao hàm vaccin 3,5-5,5% cũng thỏa mãn. Cuối cùng, kháng nguyên rửa bằng bộ lọc được điều chế với mức bao hàm 72% được thấy là thỏa mãn đối với hoạt tính diệt virus cho virus PRRS.

Bảng 9. Hoạt tính diệt virus SUB 037

ID mẫu	Sự thay đổi ở tính hiệu nghiệm log/ml	Bảo hòa/không bảo hòa
SUB 037 trước khi cô đặc (18.94kg)-- 4,7x--100kDa--PDX Hàm lượng kháng nguyên 56 trước cô đặc / 137,6 sau cô đặc	1,4	không bảo hòa
Cô đặc và hoàn nguyên với nước muối -1	0,8	không bảo hòa
Cô đặc và hoàn nguyên với nước muối -2	1,3	không bảo hòa
Cô đặc và hoàn nguyên với nước muối -3	1,3	không bảo hòa
Chất thẩm SUB 037 -1	0,6	Bảo hòa
Chất thẩm SUB 037 -2	1,0	Bảo hòa
Chất thẩm SUB 037 -3	0,5	Bảo hòa
Vaccin: Ames bao hàm 20%**	-0,2	Bảo hòa
Vaccin: Ames bao hàm 40%**	-0,2	Bảo hòa
Vaccin: Ames bao hàm 60%**	0,2	Bảo hòa
Vaccin: Ames bao hàm 80%**	0,1	Bảo hòa

Bảng 10. Hoạt tính diệt virus PCV 1025

ID mẫu	Sự thay đổi ở tính hiệu nghiệm log/ml	Bảo hòa/không bảo hòa
PCV1025 Trước cô đặc (20,46kg)--4,5x--100kDa--PDX Hàm lượng kháng nguyên 70,8 trước/ 288,64 sau cô đặc	1,5	không bảo hòa
Cô đặc và hoàn nguyên với nước muối -1	0,6	bảo hòa
Cô đặc và hoàn nguyên với nước muối -2	không thay đổi	bảo hòa
Cô đặc và hoàn nguyên với nước muối -3	0,5	bảo hòa
Chất thẩm qua 1025	Không đưa ra	n/a

Bảng 11. Hoạt tính diệt virus PCV 180/181

ID mẫu	% bao hàm vaccin	Sự thay đổi ở tính hiệu nghiệm log/ml	Bảo hòa/không bảo hòa
PCV180/181 (49,3kg)--3.5X--300kDa--PDX Hàm lượng kháng nguyên = 43,36µg hàm lượng tiền/kháng nguyên (1) 90,88µg/Hàm lượng kháng nguyên (2) 247,04µg	n/a	n/a	n/a
Vaccin trước khi cô đặc Hàm lượng kháng nguyên = Hàm lượng thực 16µg/8,8µg	37,0	hao hụt 1,2 log/ml	không bảo hòa
Vaccin trước khi cô đặc Hàm lượng kháng nguyên = Hàm lượng thực 19,2µg/8,8µg	44,5	hao hụt 1,2 log/ml	không bảo hòa
Vaccin trước khi cô đặc Hàm lượng kháng nguyên = Hàm lượng thực 24µg/15,36µg	55,5	đạt được 0,8 log/ml	bảo hòa
7X được hoàn nguyên thành vaccin 1x Hàm lượng kháng nguyên = Hàm lượng thực 16µg/8,48µg	44,0	đạt được 0,6 log/ml	bảo hòa
7X được hoàn nguyên thành vaccin 1x Hàm lượng kháng nguyên = Hàm lượng thực 19,24µg/12,32µg	53,0	không thay đổi	bảo hòa
7X được hoàn nguyên thành vaccin 1x Hàm lượng kháng nguyên = Hàm lượng thực 24µg/14,08µg	66,0	đạt được 0,3 log/ml	bảo hòa

Bảng 12. Hoạt tính diệt virus SUB 504PD

ID mẫu	% bao hàm vaccin	Sự thay đổi ở tính hiệu nghiệm log/ml	Bảo hòa/không bảo hòa
SUB504PD (~40kg) 4,3X--300kDa--PDX Hàm lượng kháng nguyên = 22,24µg hàm lượng kháng nguyên trước cô đặc (1) = 68,16µg Hàm lượng kháng nguyên (2) = 448,48µg	n/a	n/a	n/a
Vaccin trước khi cô đặc Hàm lượng kháng nguyên = Hàm lượng thực 16µg/10,24µg	79,5	hao hụt 0,3 log/ml	bảo hòa
4,3X vaccin Hàm lượng kháng nguyên = Hàm lượng thực 16µg/18,56µg	23,5	đạt được 0,1 log/ml	bảo hòa
4,3X vaccin Hàm lượng kháng nguyên = Hàm lượng thực 19,2µg/3,04µg	28,0	đạt được 0,7 log/ml	bảo hòa

Vaccin 4,3X Hàm lượng kháng nguyên = Hàm lượng thực 24 μ g/5,28 μ g	35,0	đạt được 0,1 log/ml	bảo hòa
Vaccin 21,5X Hàm lượng kháng nguyên = Hàm lượng thực 16 μ g/10,08 μ g	3,5	hao hụt 0,1 log/ml	bảo hòa
Vaccin 21,5X Hàm lượng kháng nguyên = Hàm lượng thực 19,2 μ g/15,2 μ g	4,5	đạt được 0,1 log/ml	bảo hòa
Vaccin 21,5X Hàm lượng kháng nguyên = Hàm lượng thực 24 μ g/3,36 μ g	5,5	đạt được 0,3 log/ml	bảo hòa
Rửa bằng bộ lọc Hàm lượng kháng nguyên = Hàm lượng thực 16 μ g/12,96 μ g	72,0	đạt được 0,7	bảo hòa

Bảng 13. Dữ liệu của quy trình

SUB 506: Thiết lập lọc 100000 NMWC			
Thời gian	TMP (psi)	DÒNG PERM (ml/phút)	Dòng chảy (l/mh)
13:25	12	800	11,43
13:59	11,5	3300	47,14
15:09	12,5	3800	54,29
15:29	12	2100	30,00

Bảng 14. Dữ liệu của quy trình

SUB 513: Thiết lập lọc 100000 NMWC			
Thời gian	TMP (psi)	DÒNG PERM (ml/phút)	Dòng chảy (l/mh)
6:49	11,5	2600	37,14
8:06	11,5	2700	38,57

Bảng 15. Dữ liệu của quy trình

SUB 512: Thiết lập lọc 300.000 NMWC			
Thời gian	TMP (psi)	DÒNG PERM (ml/phút)	Dòng chảy (l/mh)
15:25	16	5000	142,86
18:00	13	800	22,86
20:03	17,5	3500	100,00
21:05	17,5	3000	85,71
21:47	18	2500	71,43
21:59	12,5	4000	114,29

Bàn luận

Vacxin circovirut ở lợn, Loại 2, Vector Baculovirus chết. Vector là sản phẩm toàn cầu được sản xuất bởi Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc., in St. Joseph, Missouri và được sử dụng trong sản phẩm INGELVAC CIRCOFLEX®. Khi thu hoạch, các dòng virut được lọc vô trùng qua một hoặc nhiều bộ lọc sơ bộ 2-15µm, và sau đó bộ lọc 0,8-1,0µm đối với sự lọc cuối cùng. Dung dịch gốc BEI (etylenimin hai thành phần) được bổ sung vào chất lỏng thu được của BEI 5mM. Các chất lỏng được khuấy liên tục trong khoảng thời gian tối thiểu 72 giờ và tối đa 96 giờ và có thể được bảo quản đông lạnh tại nhiệt độ $\leq 40^{\circ}\text{C}$ hoặc tại nhiệt độ $4^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$. Dung dịch natri thiosulfat 1,0M được bổ sung vào nồng độ cuối là 5mM để trung hòa BEI còn lại.

Kháng nguyên đã trung hòa được trộn với dung dịch carbopol 0,5% thành 20% thể tích/thể tích với hàm lượng protein PCV-2 ORF2 trong sản phẩm cuối được điều chỉnh bằng cách bổ sung nước muối để đáp ứng yêu cầu giải phóng tối thiểu của tính hiệu nghiệm tương đối lớn hơn, hoặc bằng 1,0. Sau khi tạo khối, chuỗi có thể bảo quản tại nhiệt độ 4°C hoặc được lọc.

Nguyên liệu PCV-2 ORF2 được cô đặc sau khi trung hòa bằng sự siêu lọc hộp sợi rỗng. Nguyên liệu đã cô đặc được xử lý thêm bằng hai thể tích lọc màng của dung dịch nước muối. Kích thước lỗ cắt giảm trọng lượng phân tử danh nghĩa siêu lọc (NMWC) ưu tiên được xác định để bao hàm 100000 NMWC và 300000 NMWC, mỗi chúng với đường kính lumen ống quản 1,0mm. Cả hai kích thước lỗ được bao hàm để có sự linh hoạt trong sản xuất trong trường hợp nhà sản xuất ngừng cung cấp hộp lọc. Natri dodexyl sulfat – gel polyacrylamit gel điện chuyển và dữ liệu về tính hiệu nghiệm cho thấy không có sự chênh lệch về protein kháng nguyên hoặc tính hiệu nghiệm giữa hai kích thước lỗ của bộ lọc.

Ví dụ 2

Ví dụ này so sánh hiệu suất tương đối của ORF2 sử dụng các phương pháp theo sáng chế với các phương pháp đã biết trong lĩnh vực. Phải hiểu rằng ví dụ này thể hiện một trong nhiều phương pháp có thể để thu được PCV-2 ORF2 để sử dụng với các phương pháp và chế phẩm của sáng chế.

Vật liệu và phương pháp

4 bình quay tròn 1000ml mỗi chúng được gieo xấp xỉ $1,0 \times 10^6$ tế bào Sf+/ml trong 300ml môi trường không chứa huyết thanh côn trùng, Excell 420 (JRH Biosciences, Inc., Lenexa, KS). Môi trường nuôi cấy tế bào chủ được xác định là Dung dịch gốc tế bào chủ, lần cấy truyền 19, lô #N112-095W. Các tế bào được sử dụng để tạo ra dung dịch gốc tế bào chủ SF+ thu được từ Protein Sciences Corporation, Inc., Meriden, CT. Dòng thể bào SF+ cho ví dụ này được giới hạn giữa các lần cấy truyền 19 và 59. Các lần cấy truyền khác cũng phục vụ cho mục đích của sáng chế, nhưng để tăng cường quá trình cho sản xuất quy mô lớn, ít nhất 19 lần cấy truyền có thể sẽ cần và lần cấy truyền vượt quá 59 có thể có tác dụng đối với sự biểu hiện, mặc dù điều này không được tìm hiểu. Chi tiết hơn, canh trường tế bào SF+ từ môi trường bảo quản nitơ lỏng được nuôi cấy trong môi trường Excell 420 trong huyền phù trong các bình quay tròn vô trùng với sự khuấy đều không đổi. Các canh trường được nuôi cấy trong các bình quay tròn 100ml đến 250ml với 25 đến 150ml môi trường không chứa huyết thanh Excell 420. Khi các tế bào được nhân lên thành mật độ tế bào từ $1,0$ đến $8,0 \times 10^6$ tế bào/ml, chúng được phân tách vào các bình mới với mật độ cấy tế bào từ $0,5$ - $1,5 \times 10^6$ tế bào/ml. Canh trường mở rộng tiếp theo được nuôi cấy trong các bình quay tròn lên tới 36 lit về kích thước hoặc các bình phản ứng sinh học bằng thép không gỉ lên tới 300 lit trong khoảng thời gian từ 2 đến 7 ngày tại nhiệt độ $25 - 29^\circ\text{C}$.

Sau khi gieo, các bình được ủ tại nhiệt độ 27°C trong khoảng thời gian 4 giờ. Tiếp đến, mỗi bình được gieo baculovirus tái tổ hợp chứa gen PCV-2 ORF2 (trình tự SEQ ID NO: 4). Baculovirus tái tổ hợp chứa gen PCV-2 ORF2 được tạo ra như sau: gen PCV-2 ORF2 từ chủng Bắc Mỹ của PCV-2 được khuếch đại PCR để chứa trình tự 5' Kozak (trình tự SEQ ID NO: 1) và vị trí 3' EcoR1 (Trình tự SEQ ID NO: 2), được tách dòng thành vector pGEM-T-Easy (Promega, Madison, WI). Sau đó, nó được cắt mô và tái tạo dòng thành vector chuyển pVL1392 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA). Phần tái tạo dòng được thể hiện ở đây là SEQ ID NO: 7. Plasmid pVL1392 chứa gen PCV-2 ORF2 được ký hiệu là N47-064Y và sau đó được chuyển nhiễm với ADN baculovirus BaculoGold® (BD Biosciences Pharmingen) thành các tế bào côn trùng Sf+ (Protein Sciences, Meriden, CT) để tạo thành baculovirus tái tổ hợp chứa gen PCV-2 ORF2. Sản phẩm thiết kế mới được cung cấp ở đây là SEQ ID NO: 8.

Baculovirus tái tổ hợp chứa gen PCV-2 ORF2 được tinh chế màng và virus chủng gốc (MSV) được lan truyền trên dòng tế bào SF+ được phân ước, và bảo quản tại nhiệt độ -70°C . MSV được xác định dương tính là baculovirus PCV-2 ORF2 bởi PCR-RFLP sử dụng mỗi đặc hiệu baculovirus. Tế bào côn trùng với baculovirus PCV-2 ORF2 để tạo ra MSV hoặc Virus tạo chủng sản xuất biểu hiện kháng nguyên PCV-2 ORF2 như được phát hiện bởi kháng thể huyết thanh đa dòng hoặc đơn dòng trong thử nghiệm kháng thể bằng huỳnh quang trực tiếp. Thêm vào đó, tính đồng nhất của baculovirus PCV-2 ORF2 được xác nhận bởi trình tự axit amin đầu N. Baculovirus PCV-2 ORF1 MSV cũng được thử nghiệm về độ tinh khiết theo 9 C.F.R. 113.27 (c), 113.28, and 113.55. Mỗi baculovirus tái tổ hợp được gieo vào trong các bình quay tròn có liều nhân nhiễm thay đổi (MOI). Bình 1 được gieo 7,52ml hạt giống 0,088MOI; bình 2 được gieo 3,011 hạt giống có 3,06MOI; bình 3 được gieo 1,5ml hạt giống 0,18MOI; và bình 4 được gieo 0,75ml hạt giống 0,09MOI.

Sau khi được gieo baculovirus, các bình sau đó được ủ tại nhiệt độ $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ trong khoảng thời gian 7 ngày và cũng được khuấy tại 100 vòng/phút trong suốt thời gian đó. Các bình sử dụng nắp thông hơi để cho phép dòng không khí đi vào. Các mẫu từ mỗi bình được lấy cứ 24 giờ một lần trong khoảng thời gian 7 ngày tiếp theo. Sau khi chiết, mỗi mẫu được ly tâm, và cả hạt và chất nổi lên trên bề mặt được tách ra và sau đó được vi lọc qua màng kích thước lỗ 0,45-1,0.

Kết quả và kết luận

Các mẫu tạo thành sau đó có lượng ORF2 tồn tại bên trong chúng được định lượng qua thử nghiệm ELISA. Thử nghiệm ELISA được tiến hành với kháng thể bắt giữ Swine anti-PCV-2 Pab IgG Prot. G đã tinh chế (pha loãng 1:250 trong PBS) được pha loãng tới 1:6000 trong đệm cacbonat 0,05M (pH=9,6). 100 μl kháng thể sau đó được đặc trong các giếng của đĩa vi chuẩn, được bịt kín, và ủ qua đêm tại nhiệt độ 37°C . Sau đó, đĩa được rửa ba lần bằng dung dịch rửa mà bao gồm 0,5ml Tween 20 (Sigma, St. Louis, MO), 100ml 10X D-PBS (Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA) và 899,5ml nước chưng cất. Tiếp đến, 250 μl dung dịch chặn (5g sữa khô không chất béo Carnation (Nestle, Glendale, CA) trong 10ml D-PBS QS tới 100ml với nước chưng cất) được bổ sung vào mỗi giếng. Bước tiếp theo là rửa đĩa thử nghiệm và sau đó bổ sung kháng nguyên đã làm loãng trước. Kháng nguyên đã làm loãng trước được sản

xuất bằng cách bổ sung 200µl dung dịch chất làm loãng (0,5ml Tween 20 trong 999,5ml D-PBS) vào mỗi giếng trên đĩa pha loãng. Sau đó, mẫu được làm loãng tại tỷ lệ 1:240 và tỷ lệ 1:480, và 100µl mỗi mẫu đã pha loãng này sau đó được bổ sung vào một trong số các giếng trên cùng nhận 100µl dung dịch pha loãng 1:240 và các giếng khác nhận 100µl dung dịch pha loãng 1:480). Sau đó, sự pha loãng liên tiếp được thực hiện đối với phần còn lại của đĩa bằng cách loại bỏ 100µl từ mỗi giếng liên tiếp và chuyển nó vào giếng tiếp theo trên đĩa. Mỗi giếng được trộn trước khi thực hiện chuyển tiếp theo. Việc rửa đĩa thử nghiệm bao gồm rửa đĩa ba lần bằng đệm rửa. Sau đó, đĩa được bịt kín và được ủ trong khoảng thời gian 1 giờ tại nhiệt độ 37°C trước khi được rửa ba lần bằng đệm rửa. Kháng thể phát hiện được sử dụng là kháng thể đơn dòng đối với PCV ORF2. Nó được pha loãng tới 1:300 trong dung dịch chất pha loãng, và 100µl kháng thể phát hiện đã pha loãng sau đó được bổ sung vào các giếng. Sau đó, đĩa được bịt kín và được ủ trong khoảng thời gian 1 giờ tại nhiệt độ 37°C trước khi được rửa ba lần bằng đệm rửa. Chất pha loãng tiếp hợp sau đó được điều chế bằng cách bổ sung huyết thanh thô bình thường (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) vào dung dịch chất pha loãng tới nồng độ 1%. Kháng nguyên tiếp hợp chuột kháng dê (H+1) HRP (Jackson ImmunoResearch) được pha loãng trong chất pha loãng tiếp hợp với 1:10,000. 100µl kháng nguyên tiếp hợp đã pha loãng sau đó được bổ sung vào mỗi giếng. Sau đó, đĩa được bịt kín và được ủ trong khoảng thời gian 45 phút tại nhiệt độ 37°C trước khi được rửa ba lần bằng đệm rửa. 100µl chất nền (Nền TMB Peroxidaza, Kirkgaard và Perry Laboratories (KPL), Gaithersberg, MD), được trộn với thể tích bằng nhau của chất nền Peroxidaza B (KPL) được bổ sung vào mỗi giếng. Phản ứng được khuấy tại nhiệt độ trong phòng trong khoảng thời gian 15 giờ. 100µl dung dịch HCl 1N sau đó được bổ sung vào tất cả các giếng để dừng phản ứng. Sau đó, đĩa được chạy qua đĩa đọc ELISA.

Kết quả và kết luận

Các kết quả của thử nghiệm này được cung cấp trong Bảng 17 ở dưới:

Bảng 17

Ngày	Bình	ORF2 trong hạt (μg)	ORF2 trong chất nổi lên trên bề mặt (μg)
3	1	47,53	12
3	2	57,46	22
3	3	53,44	14
3	4	58,64	12
4	1	43,01	44
4	2	65,61	62
4	3	70,56	32
4	4	64,97	24
5	1	31,74	100
5	2	34,93	142
5	3	47,84	90
5	4	55,14	86
6	1	14,7	158
6	2	18,13	182
6	3	34,78	140
6	4	36,88	146
7	1	6,54	176
7	2	12,09	190
7	3	15,84	158
7	4	15,19	152

Các kết quả này cho thấy rằng khi thời gian ủ được kéo dài, sự biểu hiện của ORF2 thành chất nổi lên trên bề mặt của các tế bào ly tâm và môi trường lớn hơn sự biểu hiện trong hạt của các tế bào ly tâm và môi trường. Theo đó, cho phép sự biểu hiện ORF2 diễn ra trong khoảng thời gian ít nhất 5 ngày và thu hồi nó trong chất nổi lên trên bề mặt thay vì cho phép sự biểu hiện diễn ra trong khoảng thời gian ít hơn 5 ngày và thu hồi ORF2 từ các tế bào, khiến năng suất ORF2 tăng đáng kể, và sự cải thiện đánh kể so với các phương pháp trong lĩnh vực.

Ví dụ 3

Sự tinh chế ORF2 đạt được bằng quy trình vi lọc tiếp đến bằng sơ đồ sắc ký hai bước. Sản phẩm thu được trong Ví dụ 1 được lọc qua màng vi lọc có kích thước lỗ 1,2 μm . Sau đó, chất vi lọc được tinh chế bằng sự loại trừ kích thước (lọc gel) sử dụng

cột HiPrep 26/60 Sephacryl S300HR. Mẫu ban đầu chứa 20ml chất lọc bao gồm PCV-2 ORF2 được tải lên cột HiPrep 26/60 Sephacryl S300HR tại lưu lượng 1,0ml/phút và được làm loãng bằng 1,5 thể tích cột của Đệm A (20mM Tris, pH=6,5, 5mM DTT). 8ml phân đoạn được thu lại trong suốt bước rửa giải. Các phân đoạn số 10-16 (10ml đến 16ml của chất rửa giải) từ sắc ký loại trừ kích thước được tập hợp và sử dụng làm mẫu ban đầu đối với sắc ký trao đổi anion (AIEX). Các phân đoạn này thể hiện thể tích rỗng của cột định cỡ, mà là nơi PCV-2 ORF2 rửa giải nhờ kích thước phân tử lớn của protein PCV-2 ORF2. Kỹ thuật này phân tách hiệu quả ORF2 từ hầu hết các thành phần protein của mẫu kháng nguyên.

AIEX được thực hiện bằng cách sử dụng 5ml cột HiTrap Q Sepharose HP. Khoảng 48ml thể tích rỗng của thùng chứa phân đoạn từ thử nghiệm loại trừ kích thước được tải lên trên cột AIEX HiTrap Q Sepharose HP tại lưu lượng 3ml/phút. Sau bước rửa với đệm tải A (Tris 20mM, pH=6,5, DTT 5mM) để loại bỏ vật liệu không liên kết, protein được rửa giải với bước đơn của 8 thể tích cột của Đệm B (Tris 20mM, pH=6,5, DTT 5mM, NaCl 1,0M) và 5ml phân đoạn được thu lại. Các phân đoạn pic số 8 và 9 được thu lại và tập hợp. Dòng tiến từ bước chạy AIEX được tải ngược lại lên trên cột Q Sepharose và được rửa giải như đã mô tả ở trên. Từ bước chạy thứ hai, các phân đoạn số 7, 8 và 9 được tập hợp với các phân đoạn từ bước chạy thứ nhất. Bước chạy thứ ba của nguyên liệu chảy qua không dẫn đến phân đoạn pic đáng kể trong chất rửa giải, vì vậy không lưu được các phân đoạn từ bước chạy đó.

Thùng chứa phân đoạn xấp xỉ 25ml được thẩm tách qua đệm tại nhiệt độ 4°C đối với 2l nước muối đệm, pH=7,4 (Gibco). Sau khi thẩm tách, độ tinh khiết của ORF2 >95% dựa vào phân tích SDS-PAGE.

Ví dụ 4

Dung dịch chứa 2-bromoethylamin hydrobromua (BEA), natri hydroxit (NaOH), và natri thiosulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) được điều chế. Dung dịch BEA được tạo ra bằng cách cân 1,63g BEA (Sigma, B65705, lô 05316EE) và hòa tan trong 20ml nước tinh khiết (dH_2O , aqua dest., ở đây: ‘nước’). Nồng độ cuối cùng của dung dịch này là BEA 0,4M. Dung dịch NaOH được tạo ra bằng cách cân 0,33g NaOH (JTBaker, 3722-01, lô E01470) và hòa tan trong 20ml nước. Nồng độ cuối cùng của dung dịch này là NaOH

0,41M. Dung dịch natri thiosulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) được điều chế bằng cách cân 25g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (Sigma S7026, lô 106K0178) và hòa tan trong 100ml nước. Sau khi hòa tan, dung môi được lọc qua bộ lọc dạng chai 0,2 μm . Nồng độ cuối cùng của dung dịch này là $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 1,0M.

Để điều chế etylenimin hai thành phần (BEI), 20ml dung dịch BEA 0,4M được trộn với 20ml NaOH 0,41M và pH ban đầu được xác định là ~12,5 – 14. Hỗn hợp được ủ tại nhiệt độ 37°C trong khoảng thời gian 1 giờ và pH được kiểm tra lại. Độ pH sau khi ủ là ~7 – 7,5, và điều này thể hiện phản ứng tạo vòng thành công của BEA thành BEI. Nồng độ cuối của BEI được cô đặc thành ~0,2M (20ml của BEA 0,4M được tạo vòng với sự dư bazơ (0,41M) trong thể tích 40ml).

Các phản ứng bất hoạt được thực hiện như sau (trên 100ml nguyên liệu được làm không có hoạt tính): Vật liệu được làm không có hoạt tính được trộn với 2,5,; BEI mới điều chế. Các phản ứng bất hoạt được ủ trong khoảng thời gian 72 giờ tại nhiệt độ 37°C với sự khuấy để tiếp tục trộn các dung dịch. Sau khoảng thời gian 72 giờ, các phản ứng được trung hòa bằng cách bổ sung 0,5ml natri thiosulfat 1,0M. Sau khi cho phép thiosulfat trộn hoàn toàn thành các dung dịch (xấp xỉ 15 phút trộn), các nguyên liệu không có hoạt tính và trung hòa được bảo quản tại nhiệt độ 4°C trước khi bào chế với chất phụ trợ.

Ví dụ 5

Điều chế mẫu thử nghiệm:

Để ước tính tính sinh miễn dịch của kháng nguyên tinh chế cao ORF2 (mức tinh chế cao hơn 90%) so với kháng nguyên không tinh chế hoặc tinh chế ít, 5ml bẻ chứa mẫu thử nghiệm được điều chế:

Bảng 1: Các mẫu thử nghiệm

Mẫu thử nghiệm	Mô tả
#1	Kháng nguyên ORF2 được tinh chế cao, bất hoạt với BEI và được trộn với carbopol 1mg/ml.
#2	Kháng nguyên ORF2 được tinh chế cao, bất hoạt với BEI và được trộn với carbopol 1mg/ml.
#3	Mảnh vụn tế bào côn trùng (đối chứng giả)
#4	Kháng nguyên PCV-2 ORF2, không được lọc, không được tinh chế trộn với carbopol 1mg/ml.
#5	Kháng nguyên PCV-2 ORF2, không được lọc, không được tinh chế, bất hoạt với BEI và được trộn với carbopol 1mg/ml.
#6	Kháng nguyên PCV-2 ORF2, không được lọc, bất hoạt với BEI và được trộn với carbopol 1mg/ml.

Mẫu thử nghiệm #1 được sản xuất như sau: Kháng nguyên PCV-2 ORF2 được sản xuất như đã mô tả trong Ví dụ 1 và được tinh chế cao trong Ví dụ 3. Kháng nguyên PCV-2 ORF 2 được tinh chế cao được bất hoạt với BEI như đã mô tả trong Ví dụ 4. Sau khi bất hoạt BEI, kháng nguyên PCV-2 ORF2 là hàm lượng được điều chỉnh tới lượng khoảng 32 đến 32,5 μ g trên ml mẫu thử nghiệm và được trộn với 1mg Carbopol 971P (BF Goodrich, Ohio, USA) trên ml mẫu thử nghiệm.

Mẫu thử nghiệm #2 được sản xuất như sau: Kháng nguyên PCV-2 ORF2 được sản xuất như đã mô tả trong Ví dụ 1 và được tinh chế cao trong Ví dụ 3. Kháng nguyên PCV-2 ORF 2 được tinh chế cao được bất hoạt với BEI như đã mô tả trong Ví dụ 4. Sau khi bất hoạt BEI, kháng nguyên PCV-2 ORF2 được trộn với mảnh vụn tế bào côn trùng và Carbopol. Mẫu thử nghiệm cuối cùng bao gồm khoảng 2,06 x 10⁶ tế bào côn trùng, khoảng từ 32 đến 32,5 μ g và 1mg Carbopol 971P trên ml mẫu thử nghiệm.

Mẫu thử nghiệm #3 được điều chế bằng cách trộn khoảng 2,06 x 10⁶ tế bào côn trùng với 1mg Carbopol 971P trên ml mẫu thử nghiệm. Trước khi trộn, tế bào côn trùng được bất hoạt bởi BEI như được mô tả trong Ví dụ 3.

Mẫu thử nghiệm #4 được sản xuất như sau: kháng nguyên PCV-2 ORF2 được sản xuất như mô tả trong Ví dụ 1. Hàm lượng kháng nguyên PCV-2 ORF2 trong chất nổi lên trên bề mặt được điều chỉnh tới lượng khoảng 32 đến 32,5 μ g trên ml mẫu thử nghiệm và được trộn với 1mg Carbopol 971P trên ml mẫu thử nghiệm.

Mẫu thử nghiệm #5 được sản xuất như sau: kháng nguyên PCV-2 ORF2 được sản xuất như mô tả trong Ví dụ 1. Sau đó, chất nổi lên trên bề mặt được sản sử dụng để bất hoạt BEI như được mô tả trong Ví dụ 3. Sau khi bất hoạt BEI, kháng nguyên PCV-2 ORF2 được trộn với mảnh vụn tế bào côn trùng và Carbopol. Mẫu thử nghiệm cuối cùng bao gồm khoảng $2,06 \times 10^6$ tế bào côn trùng, khoảng từ 32 đến 32,5 μ g và 1mg Carbopol 971P trên ml mẫu thử nghiệm.

Mẫu thử nghiệm #6 được sản xuất như sau: Kháng nguyên PCV-2 ORF2 được sản xuất như được mô tả trong Ví dụ 1. Chất nổi lên trên bề mặt của Ví dụ 1 sau đó được lọc qua bộ lọc quy mô thí nghiệm 1,2 μ m. Kích thước bộ lọc này được xác định trước đủ để lọc các tế bào côn trùng nguyên vẹn và bị vỡ trong khi cho phép kháng nguyên PCV-2 ORF2 đi qua bộ lọc. Sau đó, phần lọc là BEI bất hoạt như được mô tả trong Ví dụ 3. Sau khi bất hoạt BEI, kháng nguyên PCV-2 ORF2 là hàm lượng được điều chỉnh tới lượng khoảng 32 đến 32,5 μ g trên ml mẫu thử nghiệm và được trộn với 1mg Carbopol 971P.

Thử nghiệm tính sinh miễn dịch của mỗi mẫu thử nghiệm

Pha lâm sàng:

150 chuột Balb/C cái được lấy từ Jackson Laboratories (United States) và được làm thích nghi trong khoảng thời gian 7 ngày. Một con chuột từ mỗi lồng được chọn ngẫu nhiên để lấy máu vào Ngày 0 đối với tổng 26 mẫu. Tổng số 10 con chuột, mỗi con được tiêm chủng 0,1-0,2ml dung dịch đệm phosphat Dulbecco qua đường dưới da.

Tổng số 20 con chuột, mỗi con được tiêm chủng 0,1-0,2ml của mỗi mẫu thử nghiệm (các mẫu thử nghiệm từ #1 đến #6). Mỗi lồng chứa 5 con và tất cả các con trong mỗi lồng ở trong cùng nhóm điều trị. Vào ngày 21, tất cả các con chuột bị mọc mụn nước vào giai đoạn cuối. Mỗi mẫu máu được để đông và huyết thanh được thu lại bằng cách lọc. Tất cả các mẫu được giữ trong các ống riêng và được bảo quản tại nhiệt độ $80^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$ cho đến khi thử nghiệm. Chuột được loại bỏ bằng cách thiêu.

Thử nghiệm mẫu:

Tính sinh miễn dịch của mỗi mẫu thử nghiệm được ước tính bằng cách đo đáp ứng kháng thể đặc hiệu PCV-2 của mỗi mẫu thử nghiệm bằng cách sử dụng ELISA

đặc hiệu PCV-2 tại chỗ. Giá trị về tính sinh miễn dịch của mỗi mẫu thử nghiệm được đưa ra là giá trị sinh miễn dịch tương ứng (RI) trong bảng 2. Giá trị sinh miễn dịch tương đối này là phép đo độ chuẩn kháng thể đặc hiệu ORF2 thu được ở động vật sinh miễn dịch trên lượng chuẩn hóa của kháng nguyên ORF2 sử dụng để tiêm chủng.

Thay vì sử dụng ELISA tại chỗ, lượng kháng thể đặc hiệu PCV-2 cũng có thể được đo bằng cách sử dụng thử nghiệm ELISA được mô tả bởi Nawagitgul, P., et al. in Modified indirect porcine circovirus (PCV) type 2-based and recombinant capsid protein (ORF2)-based ELISA for the detection of antibodies to PCV Clin. Diagn. Lab. Immunol. **9**:33-40 (2002). Giá trị được đo trong mỗi thử nghiệm cũng có thể được sử dụng để tính toán giá trị của tính sinh miễn dịch tương đối (xem ở dưới).

Phân phân ước huyết thanh từ mỗi con chuột được tập hợp với các con trong lồng đối với tổng 26 mẫu cho ngày 21. Phân phân ước của tất cả các mẫu huyết thanh vào ngày 0 được tập hợp thành một mẫu. Các mẫu tham chiếu được pha loãng hai lần tại 1:2 và được bổ sung gồm ba bản vào mỗi giếng tương ứng. Các đối chứng dương và âm được bổ sung gồm ba bản. Mỗi mẫu lần lượt được làm loãng hai lần và được bổ sung vào đĩa bắt đầu tại 1:200 gồm ba bản. Sự hấp thụ cuối cùng tại 450nm được đọc bằng cách sử dụng đầu đọc đĩa SoftMax™ được hiệu chuẩn hàng tháng và tất cả giá trị OD thô được thu lại bằng điện tử và được phân tích bằng Statlia (Brendan Scientific) để tính giá trị của tính sinh miễn dịch tương ứng (RI).

Kết quả:

Giá trị RI đã tính đối với lượng kháng thể sản xuất ra sau khi tiêm chủng cho thấy rằng chế phẩm PCV-2 ORF2 tạo ra đáp ứng huyết thanh học cao nhất (kháng thể) với kháng nguyên PCV-2 ORF2 được tinh chế ở mức độ cao. Chế phẩm của PCV-2 ORF2 đã tinh chế cùng với mảnh vụn tế bào còn trùng dẫn đến sự giảm ở tính tạo miễn dịch tương đối (*tức là* tính sinh miễn dịch) của ORF2 so với một mình PCV-2 ORF2 đã tinh chế ở mức độ cao. Một mình tế bào còn trùng không tạo ra đáp ứng kháng thể chống lại kháng nguyên PCV-2 ORF2. Các mẫu thử nghiệm từ 4 đến 6, mà cũng không chứa kháng nguyên PCV-2 ORF2 đã tinh chế ở mức độ cao cũng thể hiện tính sinh miễn dịch tương ứng giảm so với một mình PCV-2 ORF2 đã tinh chế ở mức độ cao.

Các phương án

Những đối tượng sau đây cũng được mô tả trong bản mô tả:

1. Phương pháp sản xuất chế phẩm kháng nguyên PCV-2 bao gồm các bước:

i) thu chất lỏng thứ nhất chứa kháng nguyên PCV-2 trong đó; và

ii) loại bỏ ít nhất một phần chất lỏng thứ nhất ra khỏi kháng nguyên PCV-2 này.

2. Phương pháp theo mục 1, trong đó phần chất lỏng thứ nhất được loại bỏ ra khỏi kháng nguyên PCV-2 bởi sự trao đổi của phần chất lỏng thứ nhất với chất lỏng thứ hai, trong đó chất lỏng thứ hai khác với chất lỏng thứ nhất.

3. Phương pháp theo mục 2, trong đó sự trao đổi của phần chất lỏng thứ nhất với chất lỏng thứ hai bao gồm các bước:

a) bổ sung chất lỏng gồm bổ sung chất lỏng thứ hai vào chất lỏng thứ nhất mà chứa kháng nguyên PCV-2; và

b) cô đặc kháng nguyên PCV-2 bằng cách loại bỏ phần chất lỏng thứ nhất và thứ hai.

4. Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 3, trong đó phần chất lỏng thứ nhất được loại bỏ ra khỏi kháng nguyên PCV-2 bằng bước lọc sử dụng bộ lọc.

5. Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ 3 đến 5, trong đó bước cô đặc và bước bổ sung chất lỏng được thực hiện về cơ bản đồng thời.

6. Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ 3 đến 6, trong đó bước cô đặc và bước bổ sung chất lỏng được thực hiện ít nhất hai lần.

7. Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ 4 đến 6, trong đó bộ lọc bao gồm màng bán thấm.

8. Phương pháp theo mục 7, trong đó màng bán thấm có kích thước lỗ trung bình mà nhỏ hơn kháng nguyên PCV-2 để từ đó ngăn đường đi của ít nhất 90% kháng nguyên

PCV-2 qua các lỗ của màng bán thấm và giữ kháng nguyên PCV-2 lại bên trong bộ lọc.

9. Phương pháp theo mục bất kỳ từ 4 đến 8, trong đó bộ lọc có kích thước lỗ trung bình mà ngăn đường đi của ít nhất 90% protein có kích thước từ 50kDa đến 500kDa.

10. Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ 3 đến 9, trong đó bước cô đặc cô đặc kháng nguyên từ 3 lần đến 50 lần so với thể tích của chất lỏng thứ nhất.

11. Phương pháp theo mục bất kỳ từ 1 đến 10, trong đó hoạt tính diệt virus của chế phẩm kháng nguyên PCV-2 được giảm đi ít nhất 10% so với chất lỏng mà không trải qua phương pháp này.

12. Phương pháp theo mục bất kỳ từ 1 đến 11, trong đó chế phẩm kháng nguyên PCV-2 được sản xuất bởi các bước từ i) đến ii) gây ra sự hao hụt nhỏ hơn 1log TCID₅₀ trên ml của virus sống hoặc nhỏ hơn 1log CFU trên ml của vi khuẩn sống, khi virus sống hoặc vi khuẩn sống được trộn với chế phẩm kháng nguyên PCV-2 trong khoảng thời gian 2 giờ hoặc lâu hơn.

13. Phương pháp theo mục bất kỳ từ 1 đến 12, trong đó chế phẩm kháng nguyên PCV-2 được sản xuất bởi các bước từ i) đến ii) gây ra sự hao hụt nhỏ hơn 0,7log TCID₅₀ trên ml của virus sống hoặc nhỏ hơn 0,7log CFU trên ml của vi khuẩn sống, khi virus sống hoặc vi khuẩn sống được trộn với chế phẩm kháng nguyên PCV-2 trong khoảng thời gian 2 giờ hoặc lâu hơn.

14. Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 13, trong đó phương pháp này bao gồm thêm bước thu kháng nguyên PCV-2 còn lại sau bước ii).

15. Phương pháp theo mục 14, trong đó phương pháp gồm thêm bước tinh chế sản phẩm thu được ở bước ii) chứa kháng nguyên PCV-2, bằng quy trình sắc ký.

16. Phương pháp theo mục 15, trong đó kháng nguyên PCV-2 được tinh chế tới độ tinh khiết của kháng nguyên PCV-2 lớn hơn 50% (thể tích/thể tích) so với tổng lượng protein.

17. Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 16, bao gồm thêm bước trộn kháng nguyên PCV-2 còn lại sau bước ii) với thành phần khác được chọn từ nhóm

bao gồm các chất mang, chất phụ trợ, chất làm loãng, tá dược dược dụng và hỗn hợp của chúng.

18. Phương pháp theo mục 17, trong đó thành phần khác là chất phụ trợ.

19. Phương pháp theo mục 18, trong đó chất phụ trợ là Carbomer.

20. Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục 1 đến 19, trong đó kháng nguyên PCV-2 gồm protein ORF-2 của PCV-2.

21. Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục 1 đến 20, trong đó kháng nguyên PCV-2 bao gồm hạt tương tự virus của protein ORF-2.

22. Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 21, trong đó phương pháp này bao gồm thêm bước kết hợp chế phẩm kháng nguyên PCV-2 với ít nhất một kháng nguyên khác.

23. Phương pháp theo mục 22, trong đó ít nhất một kháng nguyên khác bao gồm kháng nguyên virus gây hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn và/hoặc kháng nguyên *Mycoplasma hyopneumoniae*.

24. Chế phẩm kháng nguyên PCV-2 thu được bằng phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 23.

25. Chế phẩm kháng nguyên PCV, trong đó chế phẩm kháng nguyên PCV-2 này gây ra sự hao hụt nhỏ hơn 1log TCID₅₀ trên ml của virus sống hoặc nhỏ hơn 1log CFU trên ml của vi khuẩn sống, khi virus sống hoặc vi khuẩn sống được trộn với chế phẩm kháng nguyên PCV-2 này trong khoảng thời gian ít nhất 2 giờ.

26. Chế phẩm kháng nguyên PCV theo mục 25, trong đó chế phẩm kháng nguyên PCV-2 gây ra sự hao hụt nhỏ hơn 0,7log TCID₅₀ trên ml của virus sống hoặc nhỏ hơn 0,7log CFU trên ml của vi khuẩn sống, khi virus sống hoặc vi khuẩn sống được trộn với chế phẩm kháng nguyên PCV-2 trong khoảng thời gian ít nhất 2 giờ.

27. Chế phẩm kháng nguyên PCV-2 theo mục 25 hoặc 26, trong đó virus sống là virus gây hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản (PRRS).

28. Chế phẩm sinh miễn dịch chứa chế phẩm kháng nguyên PCV-2 thu được bằng phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 23.

29. Chế phẩm sinh miễn dịch chứa chế phẩm kháng nguyên PCV-2 theo mục bất kỳ trong số các mục từ 24 đến 26.

30. Chế phẩm sinh miễn dịch theo mục 29, trong đó chế phẩm sinh miễn dịch này bao gồm thêm virus sống giảm độc hoặc vi khuẩn sống giảm độc từ ít nhất một vi khuẩn gây bệnh khác ở lợn.

31. Chế phẩm sinh miễn dịch theo mục 30, trong đó virus sống giảm độc là virus gây hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRS).

32. Chế phẩm sinh miễn dịch theo mục bất kỳ từ 29 đến 31, trong đó chế phẩm sinh miễn dịch này bao gồm thêm vacxin vi khuẩn *Mycoplasma hyopneumoniae*.

33. Chế phẩm sinh miễn dịch theo mục bất kỳ từ 29 đến 32, trong đó chế phẩm sinh miễn dịch bao gồm thêm chất phụ trợ.

34. Chế phẩm sinh miễn dịch theo mục 33, trong đó chất phụ trợ là Carbomer.

35. Chế phẩm sinh miễn dịch chứa kháng nguyên PCV-2 tinh chế và chất phụ trợ.

36. Chế phẩm sinh miễn dịch theo mục 35, trong đó mức độ tinh khiết của kháng nguyên PCV-2 cao hơn 50% (thể tích/thể tích) so với tổng lượng protein có trong chế phẩm sinh miễn dịch.

37. Chế phẩm sinh miễn dịch theo mục 35 hoặc 36, trong đó kháng nguyên PCV-2 là protein ORF2 circovirus ở lợn tái tổ hợp được biểu hiện trong các tế bào ở động vật hoặc vi khuẩn.

38. Chế phẩm sinh miễn dịch theo mục bất kỳ trong số các mục từ 35 đến 37, trong đó protein ORF2 circovirus ở lợn có thể thu được bằng quy trình gồm các bước:

- a. biểu hiện kháng nguyên PCV-2 ở tế bào chủ;
- b. thu canh trường nuôi cấy tế bào lấy kháng nguyên PCV-2;

- c. tinh chế sản phẩm thu được gồm kháng nguyên PCV-2 bằng cách lọc gel;
- d. trộn kháng nguyên PCV-2 tinh chế với chất phụ trợ.

39. Chế phẩm sinh miễn dịch theo mục từ 28 đến 38, trong đó chế phẩm sinh miễn dịch này gây ra đáp ứng miễn dịch bảo vệ chống lại PCV-2 sau khi sử dụng một liều dùng của chế phẩm sinh miễn dịch này.

40. Chế phẩm sinh miễn dịch theo mục từ 28 đến 38, trong đó việc dùng chế phẩm sinh miễn dịch này làm giảm sự phá hủy bạch huyết và viêm đi ít nhất 80% ở động vật so với động vật không nhận chế phẩm sinh miễn dịch.

41. Chế phẩm sinh miễn dịch theo mục từ 31 đến 38, trong đó chế phẩm sinh miễn dịch này gây ra đáp ứng miễn dịch bảo vệ chống lại virus PRRS sau khi sử dụng một liều dùng của chế phẩm sinh miễn dịch này.

42. Chế phẩm sinh miễn dịch theo mục từ 32 đến 38, trong đó chế phẩm sinh miễn dịch này gây ra đáp ứng miễn dịch bảo vệ chống lại *Mycoplasma hyopneumoniae* sau khi sử dụng một liều dùng của chế phẩm sinh miễn dịch này.

43. Chế phẩm sinh miễn dịch theo mục từ 28 đến 38, trong đó 2ml chế phẩm sinh miễn dịch gồm 1 liều dùng của kháng nguyên PCV-2.

44. Phương pháp làm giảm một hoặc nhiều triệu chứng lâm sàng của tình trạng nhiễm PCV-2 ở động vật so với động vật không được dùng chế phẩm sinh miễn dịch, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho động vật sử dụng chế phẩm sinh miễn dịch theo mục bất kỳ trong số các mục từ 28 đến 38.

45. Chế phẩm sinh miễn dịch theo mục bất kỳ từ 28 đến 38 để làm giảm một hoặc nhiều triệu chứng lâm sàng của sự lây nhiễm PCV-2 ở động vật so với động vật không nhận chế phẩm sinh miễn dịch.

46. Phương pháp cải thiện tính sinh miễn dịch của chế phẩm sinh miễn dịch chống lại circovirus ở lợn bao gồm các bước:

- a. biểu hiện kháng nguyên PCV-2 ở tế bào chủ;

- b. thu kháng nguyên PCV-2;
- c. tinh chế kháng nguyên PCV-2 tới độ tinh khiết cao hơn 50% (thể tích/thể tích) so với tổng lượng protein bao gồm trong chế phẩm sinh miễn dịch;
- d. trộn kháng nguyên PCV-2 tinh chế với chất phụ trợ.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất chế phẩm kháng nguyên PCV-2 bao gồm các bước:

- i) thu chất lỏng thứ nhất chứa kháng nguyên PCV-2 chứa các hạt tương tự virus của protein ORF-2; và
- ii) loại bỏ ít nhất một phần chất lỏng thứ nhất ra khỏi kháng nguyên PCV-2 chứa các hạt tương tự virus của protein ORF-2 bằng bước lọc bằng cách sử dụng bộ lọc, trong đó bộ lọc này bao gồm màng bán thấm có cỡ lỗ trung bình nhỏ hơn kích thước của kháng nguyên PCV-2 để nhờ đó ngăn ít nhất 90% kháng nguyên PCV-2 đi qua các lỗ của màng bán thấm và giữ kháng nguyên PCV-2 trong bộ lọc này, trong đó phần chất lỏng thứ nhất được loại bỏ ra khỏi kháng nguyên PCV-2 nhờ sự trao đổi của phần chất lỏng thứ nhất với chất lỏng thứ hai, trong đó chất lỏng thứ hai khác với chất lỏng thứ nhất, và trong đó sự trao đổi của phần chất lỏng thứ nhất với chất lỏng thứ hai bao gồm các bước:
 - a) bổ sung chất lỏng gồm bổ sung chất lỏng thứ hai vào chất lỏng thứ nhất mà chứa kháng nguyên PCV-2; và
 - b) cô đặc kháng nguyên PCV-2 từ 3 đến 50 lần so với thể tích chất lỏng thứ nhất bằng cách loại bỏ một phần chất lỏng thứ nhất và thứ hai; và
- iii) trộn kháng nguyên PCV-2 còn lại sau bước ii) với thành phần khác được chọn từ nhóm bao gồm chất mang, chất phụ trợ, chất pha loãng, tá dược được dùng và hỗn hợp của các chất này.

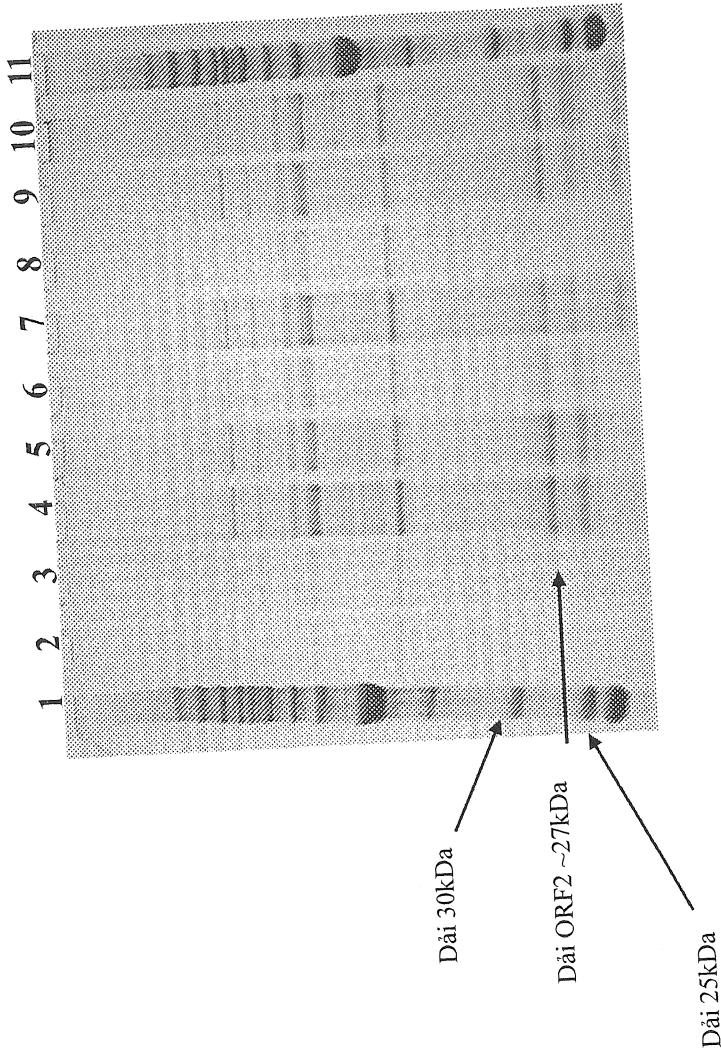
2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó bước cô đặc và bước bổ sung chất lỏng được thực hiện về cơ bản đồng thời.

3. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó bước cô đặc và bước bổ sung chất lỏng được thực hiện ít nhất hai lần.

4. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó bộ lọc có kích thước lỗ trung bình mà ngăn ít nhất 90% protein có kích thước từ 50kDa đến 500kDa đi qua.

5. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó hoạt tính diệt virus của chế phẩm kháng nguyên PCV-2 được giảm đi ít nhất 10% so với chất lỏng mà không trải qua phương pháp này.
6. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó chế phẩm kháng nguyên PCV-2 được sản xuất bởi các bước từ i) đến ii) gây ra sự hao hụt nhỏ hơn 1log TCID₅₀ trên ml của virus sống hoặc nhỏ hơn 1log CFU trên ml của vi khuẩn sống, khi virus sống hoặc vi khuẩn sống được trộn với chế phẩm kháng nguyên PCV-2 trong khoảng thời gian 2 giờ hoặc lâu hơn.
7. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó chế phẩm kháng nguyên PCV-2 được sản xuất bởi các bước từ i) đến ii) gây ra sự hao hụt nhỏ hơn 0,7log TCID₅₀ trên ml của virus sống hoặc nhỏ hơn 0,7log CFU trên ml của vi khuẩn sống, khi virus sống hoặc vi khuẩn sống được trộn với chế phẩm kháng nguyên PCV-2 trong khoảng thời gian 2 giờ hoặc lâu hơn.
8. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó phương pháp này bao gồm thêm bước thu kháng nguyên PCV-2 còn lại sau bước ii).
9. Phương pháp theo điểm 8, trong đó phương pháp này bao gồm thêm bước tinh chế sản phẩm thu được ở bước ii) chứa kháng nguyên PCV-2 bằng quy trình sắc ký.
10. Phương pháp theo điểm 9, trong đó kháng nguyên PCV-2 được tinh chế tới độ tinh khiết của kháng nguyên PCV-2 lớn hơn 50% (trọng lượng/trọng lượng) so với tổng lượng protein.
11. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, trong đó thành phần khác là chất phụ trợ.
12. Phương pháp theo điểm 11, trong đó chất phụ trợ là Carbomer.
13. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12, trong đó phương pháp này bao gồm thêm bước kết hợp chế phẩm kháng nguyên PCV-2 với ít nhất một kháng nguyên khác.
14. Phương pháp theo điểm 13, trong đó ít nhất một kháng nguyên khác bao gồm kháng nguyên virus gây hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn và/hoặc kháng nguyên *Mycoplasma hyopneumoniae*.

FIG. 1



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA INC

<120> PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT CHẾ PHẨM KHÁNG NGUYÊN PCV-2

<130> P10-0121

<160> 11

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 8

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Đây là trình tự Kozak được cải biến.

<400> 1

ccgccatg

8

<210> 2

<211> 6

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Đây là trình tự Eco R1 tái tổ hợp.

<400> 2

gaattc

6

<210> 3

<211> 713

<212> ADN

<213> circovirut ở lợn

<400> 3

cagctatgac	gtatccaagg	aggcgttacc	gcagaagaag	acaccgcccc	cgcagccatc	60
ttggccagat	cctccgccgc	cgccccctggc	tcgtccaccc	ccgccaccgc	taccgttgga	120
gaaggaaaaa	tggcatcttc	aacaccgcgc	tctcccgcac	cttcggatat	actgtggaga	180
aggaaaaatg	gcattctcaa	caccgcctc	tcccgcacct	tcggatatac	tgtgacgact	240
ttgttcccc	gggagggggg	accaacaaaa	tctctatacc	ctttgaatac	tacagaataa	300
gaaagggttaa	ggttgaattc	tggccctgct	cccccatcac	ccagggtgat	aggggagtg	360
gctccactgc	tggtattcta	gatgataact	ttgtaacaaa	ggccacagcc	ctaacctatg	420
acccatatgt	aaactactcc	tcccgccata	caatccccca	acccttctcc	taccactccc	480
gttacttcac	acccaaacct	gttcttgact	ccactattga	ttacttccaa	ccaaataaca	540
aaaggaatca	gctttggctg	aggctacaaa	cctctagaaa	tgtggaccac	gtaggcctcg	600
gcactgcgtt	cgaaaacagt	aaatacgacc	aggactacaa	tatccgtgta	accatgtatg	660
tacaattcag	agaatttaat	cttaaagacc	cccacttaa	accctaaatg	aat	713

<210> 4

<211> 713

<212> ADN

<213> circovirut ở lợn

```

<400> 4
ccgccatgac gtatccaagg aggcgttacc gcagaagaag acaccgcccc cgcagccatc 60
ttggccagat cctccgccgc cgccccctggc tegtccaccc ccgccaccgc taccgttgga 120
gaaggaaaaa tggcatcttc aacaccgcc tctccgcac cttcggatat actgtcaagg 180
ctaccacagt cacaacgccc tctggggcgg tggacatgat gagatttaat attgacgact 240
ttgttcccc gggagggggg accaacaata tctctatacc ctttgaatac tacagaataa 300
gaaagggttaa gggtgaattc tggccctgct ccccatcac ccagggtgat aggggagtgg 360
gctccactgc tgttattcta gatgataact ttgtaacaaa ggccacagcc ctaacctatg 420
accatattgt aaactactcc tcccgccata caatccccca acccttctcc taccactccc 480
gttacttcac acccaaacct gttcttgact ccactattga ttacttccaa ccaaataaca 540
aaaggaatca gctttggctg aggctacaaa cctctagaaa tgtggaccac gtaggcctcg 600
gcactgcgtt cgaaaacagt aaatacgacc aggactacaa tatccgtgta accatgtatg 660
tacaattcag agaatttaat cttaaagacc cccacttga accctaagaa ttc 713

```

```

<210> 5
<211> 233
<212> PRT
<213> circovirut ở lợn

```

```

<400> 5

```

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

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

Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Lys Pro
 225 230

<210> 6

<211> 233

<212> PRT

<213> circovirut ở lợn

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Glu Pro
 225 230

<210> 7
 <211> 756
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự này là từ circovirut typ 2 ở lợn, khung đọc mở 2, cùng với một phần từ vectơ pGEM T-easy.

<400> 7

gcggcgcgcg	gaattcgatc	cgccatgacg	tatccaagga	ggcgttaccg	cagaagaaga	60
caccgcccc	gcagccatct	tggccagatc	ctccgcgcgc	gcccctggct	cgteccacccc	120
cgccaccgct	accgttggag	aaggaaaaat	ggcatcttca	acaccgcgct	ctcccgccacc	180
ttcggatata	ctgtcaaggc	taccacagtc	acaacgcctt	cctggggcgg	ggacatgatg	240
agattttaata	ttgacgactt	tgttcccccg	ggagggggga	ccaacaaaat	ctctataccc	300
tttgaataact	acagaataag	aaagggttaag	gttgaattct	ggccctgctc	ccccatcacc	360
caggggtgata	ggggagtggg	ctccactgct	gttattctag	atgataactt	tgtaacaaag	420
gccacagccc	taacctatga	cccatatgta	aactactcct	ccgcgcatac	aatcccccaa	480
cccttctcct	accactcccg	ttacttcaca	cccaaacctg	ttcttgactc	cactattgat	540
tacttccaac	caaataacaa	aaggaatcag	ctttggctga	ggctacaaac	ctctagaaat	600
gtggaccacg	taggcctcgg	cactgcgttc	gaaaacagta	aatacgacca	ggactacaat	660
atccgtgtaa	ccatgtatgt	acaattcaga	gaatttaatc	ttaaagaccc	cccacttgaa	720
ccctaagaat	tctatcacta	gtgaattcgc	ggccgc			756

<210> 8
 <211> 10387
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>

<223> Đây là circovirut typ 2 ở lợn, cấu trúc ORF-2, gồm baculovirut và trình tự mã hóa pGEM T-easy.

<400> 8

aagctttact	cgtaaagcga	gttgaaggat	catatttagt	tgcgtttatg	agataagatt	60
gaaagcacgt	gtaaaatggt	tccgcgcgct	tggcacaact	atttacaatg	cggccaagtt	120
ataaaagatt	ctaactctgat	atgtttttaa	acacctttgc	ggcccgagtt	gtttgcgtac	180
gtgactagcg	aagaagatgt	gtggaccgca	gaacagatag	taaaacaaaa	ccctagtatt	240
ggagcaataa	tcgattttaac	caacacgtct	aatatttatg	atggtgtgca	ttttttgcgg	300
gcgggcctgt	tatacaaaaa	aattcaagta	cctggccaga	ctttgccgcc	tgaaagcata	360
gttcaagaat	ttattgacac	ggtaaaagaa	tttacagaaa	agtgtcccgg	catgttggtg	420
ggcgtgcact	gcacacacgg	tattaatcgc	accggttaca	tggtgtgcag	atattttaatg	480
cacaccctgg	gtattgcgcc	gcaggaagcc	atagatagat	tcgaaaaagc	cagaggtcac	540
aaaattgaaa	gacaaaatta	cgttcaagat	ttattaatat	aattaatatt	atttgcattc	600
tttaacaaat	actttatcct	attttcaaat	tggtgcgctt	cttcacgcga	acaaaaacta	660
tgcttcgctt	gctccgttta	gcttgtagcc	gatcagtggc	gttggttcaa	tcgacggtag	720
gattaggccg	gatattcttc	accacaatgt	tggcaacggt	gatgttacgt	ttatgctttt	780
ggttttccac	gtacgtcttt	tggccggtta	tagccgtaaa	cgtagtgcgc	tcgcgcgtca	840
cgcacaacac	cggatgtttg	cgcttgtccg	cggggtattg	aaccgcgcga	tcgcgacaaat	900
ccaccacttt	ggcaactaaa	tcggtgacct	gcgcgtcttt	tttctgcatt	atttcgtctt	960
tcttttgcac	ggtttccttg	aagccgggtg	acatgcgggt	tagatcagtc	atgacgcgcg	1020
tgacctgcaa	atctttggcc	tcgatctgct	tgctcttgat	ggcaacgatg	cgttcaataa	1080
actcttggtt	tttaacaagt	tcctcggttt	tttgcgccac	caccgcttgc	agcgcggttg	1140
tgtgctcggt	gaatgtcgca	atcagcttag	tcaccaactg	tttgctctcc	tcctcccgtt	1200
gtttgatcgc	gggatcgtag	ttgcccgtgc	agagcacttg	aggaattact	tcttctaaaa	1260
gccattcttg	taattctatg	gcgtaaggca	atttggactt	cataatcagc	tgaatcacgc	1320
cggatttagt	aatgagcact	gtatgcggct	gcaaatacag	cgggtcgcgc	cttttcacga	1380
cgctgttaga	ggtagggccc	ccattttgga	tggtctgctc	aaataacgat	ttgtatttat	1440
tgtctacatg	aacacgtata	gctttatcac	aaactgtata	ttttaaacgt	ttagcgacgt	1500
ccttggccac	gaaccggacc	tggttggtcgc	gctctagcac	gtaccgcagg	ttgaacgtat	1560

cttctccaaa	tttaaattct	ccaattttta	cgcgagccat	tttgatacac	gtgtgtcgat	1620
tttgcaacaa	ctattgtttt	ttaacgcaaa	ctaaacttat	tgtggtaagc	aataattaa	1680
tatgggggaa	catgcgcgc	tacaacactc	gtcgttatga	acgcagacgg	cgccggtctc	1740
ggcgcaagcg	gctaaaacgt	gttgcgcggt	caacgcggca	aacatcgcaa	aagccaatag	1800
tacagttttg	atttgcatat	taacggcgat	tttttaaatt	atcttattta	ataaatagtt	1860
atgacgccta	caactccccg	cccgcgttga	ctcgtctcac	ctcgagcagt	tcgttgacgc	1920
cttcctccgt	gtggccgaac	acgtcgagcg	ggtggtcgat	gaccagcggc	gtgccgcacg	1980
cgacgcacaa	gtatctgtac	accgaatgat	cgtcgggcga	aggcacgtcg	gcctccaagt	2040
ggcaatattg	gcaaattcga	aaatatatac	agttgggttg	tttgcgcata	tctatcgtgg	2100
cgttgggcat	gtacgtccga	acgttgattt	gcatgcaagc	cgaaattaa	tcattgcgat	2160
tagtgcgatt	aaaacgttgt	acatcctcgc	ttttaatcat	gccgtcgatt	aaatcgcgca	2220
atcgagtcaa	gtgatcaaag	tgtggaataa	tgttttcttt	gtattcccga	gtcaagcgca	2280
gcgcgtattt	taacaaacta	gccatcttgt	aagttagttt	catttaatgc	aactttatcc	2340
aataatatat	tatgtatcgc	acgtcaagaa	ttaacaatgc	gcccgttgtc	gcatctcaac	2400
acgactatga	tagagatcaa	ataaagcgcg	aattaaatag	cttgcgacgc	aacgtgcacg	2460
atctgtgcac	gcgttccggc	acgagctttg	attgtaataa	gtttttacga	agcgatgaca	2520
tgacccccgt	agtgacaacg	atcacgcccc	aaagaactgc	cgactacaaa	attaccgagt	2580
atgtcgggtga	cgttaaaact	attaagccat	ccaatcgacc	gtagtcgaa	tcaggaccgc	2640
tgggtgcgaga	agccgcgaag	tatggcgaa	gcatcgtata	acgtgtggag	tccgctcatt	2700
agagcgtcat	gtttagacaa	gaaagctaca	tatttaattg	atcccgatga	ttttattgat	2760
aaattgaccc	taactccata	cacgggtattc	tacaatggcg	gggttttggt	caaaatttcc	2820
ggactgcgat	tgtacatgct	gttaacggct	ccgcccacta	ttaatgaaat	taaaaattcc	2880
aattttaaaa	aacgcagcaa	gagaaacatt	tgtatgaaag	aatgcgtaga	aggaaagaaa	2940
aatgtcgtcg	acatgctgaa	caacaagatt	aatatgcctc	cgtgtataaa	aaaaatattg	3000
aacgatttga	aagaaaacaa	tgtaccgcgc	ggcggtatgt	acaggaagag	gtttatacta	3060
aactgtttaca	ttgcaaacgt	ggtttcgtgt	gccaagtgtg	aaaaccgatg	tttaatcaag	3120
gctctgacgc	atttctacaa	ccacgactcc	aagtgtgtgg	gtgaagtcac	gcatctttta	3180
atcaaattccc	aagatgtgta	taaaccacca	aactgccaaa	aaatgaaaac	tgtcgacaag	3240
ctctgtccgt	ttgctggcaa	ctgcaagggt	ctcaatccta	tttgtaatta	ttgaataata	3300
aaacaattat	aaatgctaaa	tttgtttttt	attaacgata	caaaccaaa	gcaacaagaa	3360
catttgtagt	attatctata	attgaaaacg	cgtagtata	atcgtcgagg	taatatttaa	3420
aatcattttc	aaatgattca	cagttaattt	gcgacaatat	aattttattt	tcacataaac	3480
tagacgcctt	gtcgtcttct	tcttcgtatt	ccttctcttt	ttcatttttc	tcttcataaa	3540
aattaacata	gttattatcg	tatccatata	tgtatctatc	gtatagagta	aattttttgt	3600
tgtcataaat	atataatgtc	tttttaattg	ggtgtatagt	accgctgcgc	atagtttttc	3660
tgtaatttac	aacagtgcta	ttttctggta	gttcttcgga	gtgtgttgct	ttaattatta	3720
aattttatata	atcaatgaat	ttgggatcgt	cggttttgta	caatatgttg	ccggcatagt	3780
acgcagcttc	ttctagtcca	attacaccat	tttttagcag	caccggatta	acataacttt	3840
ccaaaatggt	gtacgaaccg	ttaaacaaaa	acagttcacc	tcccttttct	atactattgt	3900
ctgcgagcag	ttgtttgttg	ttaaaaataa	cagccattgt	aatgagacgc	acaaactaat	3960
atcacaaact	ggaaatgtct	atcaatatat	agttgctgat	atcatggaga	taattaaaa	4020
gataaccatc	tcgcaaataa	ataagtattt	tactgttttc	gtaacagttt	tgtaataaaa	4080
aaacctataa	atattccgga	ttattcatat	cgtcccacca	tcgggcgcgc	atcagatctg	4140
cagcggccgc	gggaattcga	tccgccatga	cgtatccaag	gaggcggtac	cgcagaagaa	4200
gacaccgccc	ccgcagccat	cttgcccgaga	tccctccgcg	ccgcccctgg	ctcgtccacc	4260
cccgccaccg	ctaccgttgg	agaaggaaaa	atggcatctt	caacaccgcg	ctctcccgcg	4320
ccttcgggata	tactgtcaag	gctaccacag	tcacaacgcc	ctcctgggcg	gtggacatga	4380
tgagatttaa	tattgacgac	tttgttcccc	cgggaggggg	gaccaacaaa	atctctatag	4440
cctttgaata	ctacagaata	agaaagggtta	aggttgaatt	ctggccctgc	tcccccatca	4500
cccaggggtga	taggggagtg	ggctccactg	ctgttattct	agatgataac	tttgaacaaa	4560
aggccacagc	cctaaccctat	gacccatattg	taaactactc	ctcccgccat	acaatcccc	4620
aacccttctc	ctaccactcc	cgttacttca	cacccaaacc	tgttcttgac	tccactattg	4680
attacttcca	accaaataac	aaaaggaatc	agctttggct	gaggctacaa	acctctagaa	4740
atgtggacca	cgtaggcctc	ggcactgcgt	tcgaaaacag	taaatacgac	caggactaca	4800
atatccgtgt	aaccatgtat	gtacaattca	gagaatttaa	tcttaaagac	ccccacttg	4860
aaccctaaga	attctatcac	tagtgaattc	gcggccgcgc	gccgctccag	aattctagaa	4920
ggtacccggg	atcctttcct	gggaccgggc	aagaacccaa	aactcactct	cttcaaggaa	4980
atccgtaatg	ttaaaccgga	cacgatgaag	cttgtcgttg	gatggaaagg	aaaagagttc	5040
tacagggaaa	cttggaccgc	cttcatggaa	gacagcttcc	ccattgttaa	cgaccaagaa	5100
gtgatggatg	ttttccttgt	tgtcaacatg	cgtcccacta	gacccaaccg	ttgttacaaa	5160
ttcctggccc	aacacgctct	gcgttgcgac	cccgactatg	tacctcatga	cgtgattagg	5220

atcgtcgcagc	cttcatgggt	gggcagcaac	aacgagtacc	gcatacgcct	ggctaagaag	5280
ggcggcggt	gccaataat	gaaccttcac	tctgagtaca	ccaactcgtt	cgaacagttc	5340
atcgatcgtg	tcatctggga	gaacttctac	aagcccatcg	tttacctcgg	taccgactct	5400
gctgaagagg	aggaaattct	ccttgaagtt	tccttgggtg	tcaaagtaaa	ggagtttgca	5460
ccagacgcac	ctctgttcac	tggtcgcggc	tattaaaaca	cgatacattg	ttattagtac	5520
atttattaag	cgctagattc	tgtgcgttgt	tgtttacag	acaattgttg	tacgtatttt	5580
aataattcat	taaatttata	atcttttagg	tggtagtcta	gagcgaaaat	caaagtattt	5640
tcagcgtctt	tatatctgaa	tttaaatatt	aaatcctcaa	tagatttgta	aaataggttt	5700
cgattagttt	caaacaagg	ttgtttttcc	gaaccgatgg	ctggactatc	taatggattt	5760
tcgctcaacg	ccacaaaact	tgccaaatct	tgtagcagca	atctagcttt	gtcgatatct	5820
gtttgtgttt	tgttttgtaa	taaagggttc	acgtcgttca	aaatattatg	cgcttttgta	5880
tttctttcat	cactgtcgtt	agtgtacaat	tgactcgacg	taaacacggt	aaataaagct	5940
tggacatatt	taacatcggg	cgtgttagct	ttattaggcc	gattatcgtc	gtcgtcccaa	6000
ccctcgtcgt	tagaagtgtc	ttccgaagac	gattttgcc	tagccacacg	acgcctatta	6060
attgtgtcgg	ctaacacgtc	cgcgatcaaa	ttttagtctg	agcttttttg	aattatttct	6120
gattgcgggc	gtttttgggc	gggtttcaat	ctaactgtgc	cgcattttta	ttcagacaac	6180
acgttagaaa	gcgatgggtc	aggcgggtgt	aacatttcag	acggcaaatc	tactaatggc	6240
ggcgggtgtg	gagctgatga	taaatctacc	atcgggtggag	gcgcaggcgg	ggctggcggc	6300
ggaggcggag	gcggagggtg	tggcgggtgat	gcagacggcg	gttttaggtc	aaatgtctct	6360
ttaggcaaca	cagtcggcac	ctcaactatt	gtactggttt	cgggcgcctg	ttttggtttg	6420
accggtctga	gacgagtgcg	atttttttcg	tttctaatag	cttccaacaa	ttgttgtctg	6480
tcgtctaaag	gtgcagcggg	ttgagggttc	gtcggcattg	gtggagcggg	cggcaattca	6540
gacatcgatg	gtggtggtgg	tgggtggagg	gctggaatgt	taggcacggg	agaagggtgt	6600
ggcggcgggtg	ccgccggtat	aatttgttct	ggtttagttt	gttcgcgcac	gattgtgggc	6660
accggcgcag	gcgccgctgg	ctgcacaacg	gaaggctcgt	tgcttcgagg	cagcgtttgg	6720
ggtggtggca	attcaatatt	ataattggaa	tacaaatcgt	aaaaatctgc	tataagcatt	6780
gtaatttcgc	tatcgtttac	cgtgccgata	tttaacaacc	gctcaatgta	agcaattgta	6840
ttgtaaagag	attgtctcaa	gctcgcgcga	cgcgcgataa	aagccttttc	atttttacta	6900
cagcattgta	gtggcgagac	acttcgctgt	cgtcgacgta	catgtatgct	ttgttgtcaa	6960
aaacgtcgtt	ggcaagcttt	aaaatattta	aaagaacatc	tctgttcagc	accactgtgt	7020
tgtcgtaaat	gttggtttttg	ataatttgcg	cttcgcgcag	atcgacacgt	tcaaaaaatt	7080
gatgcgcate	aattttgttg	ttcctattat	tgaataaata	agattgtaca	gattcatatc	7140
tacgattcgt	catggccacc	acaaatgcta	cgtgcgaaac	gctggtacaa	ttttacgaaa	7200
actgcaaaaa	cgtcaaaaact	cgggtataaaa	taatcaacgg	gcgctttggc	aaaatatcta	7260
ttttatcgca	caagcccact	agcaaattgt	atttgcagaa	aacaatttcg	gcgcacaatt	7320
ttaacgctga	cgaaataaaa	gttcaccagt	taatgagcga	ccaccctaat	tttataaaaa	7380
tctattttta	tcacggttcc	atcaacaacc	aagtgatcgt	gatggactac	attgactgtc	7440
ccgattttatt	tgaacacta	caaattaaag	gcgagctttc	gtaccaactt	gttagcaata	7500
ttattagaca	gctgtgtgaa	gcgctcaacg	atttgcacaa	gcacaatttc	atacacaacg	7560
acataaaaact	cgaaaatgtc	ttatatattcg	aagcacttga	tcgcgtgtat	gtttgcgatt	7620
acggatttgtg	caaacacgaa	aactcactta	gcgtgcacga	cggcacgttg	gagtatttta	7680
gtccggaaaa	aattcgacac	acaactatgc	acgtttcgtt	tgactggtac	gcggcgtgtt	7740
aacatacaag	ttgctaacgt	aatcatggtc	atagctgttt	cctgtgtgaa	attgttatcc	7800
gctcacaatt	ccacacaaca	tacgagccgg	aagcataaag	tgtaaagcct	ggggtgccta	7860
atgagtgcag	taactcacat	taattgcgtt	gcgctcactg	cccgcctttc	agtcgggaaa	7920
cctgtcgtgc	cagctgcatt	aatgaatcgg	ccaacgcgcg	gggagaggcg	gtttgcgcat	7980
tgggcgctct	tccgcttcc	cgtcactga	ctcgtcgcgc	tcggtcgttc	ggctgcggcg	8040
agcggtatca	gctcactcaa	aggcggtaat	acggttatcc	acagaatcag	gggataacgc	8100
aggaaagaac	atgtgagcaa	aaggccagca	aaaggccagg	aaccgtaaaa	aggccgcgtt	8160
gctggcggtt	ttccataggc	tcgcgcccc	tgacgagcat	cacaaaaatc	gacgctcaag	8220
tcagagggtg	cgaaaccgga	caggactata	aagataccag	gcgtttcccc	ctggaagctc	8280
cctcgtgcgc	tctcctgttc	cgaccctgcc	gcttacggga	tacctgtccg	cctttctccc	8340
ttcgggaagc	gtggcgcttt	ctcatagctc	acgctgtagg	tatctcagtt	cgggtgtagg	8400
cgttcgtctc	aagctgggct	gtgtgcacga	acccccggtt	cagcccgacc	gctgcgcctt	8460
atccggtaac	tatcgtcttg	agtccaaccc	ggtaagacac	gacttatcgc	cactggcagc	8520
agccactgg	aacaggatta	gcagagcgag	gtatgtaggc	ggtgctacag	agttcttgaa	8580
gtggtggcct	aactacggct	acactagaag	gacagtattt	ggtatctgcg	ctctgctgaa	8640
gccagttacc	ttcggaaaaa	gagttggtag	ctcttgatcc	ggcaaaaaca	ccaccgctgg	8700
tagcgggtgt	ttttttgttt	gcaagcagca	gattacgcgc	agaaaaaaag	gatctcaaga	8760
agatcccttg	atcttttcta	cggggtctga	cgtcagtggt	aacgaaaact	cacgttaagg	8820
gatttttggtc	atgagattat	caaaaaggat	cttcacctag	atccttttaa	attaaaaatg	8880

```

aagttttaaa tcaatctaaa gtatatatga gtaaacttgg tctgacagtt accaatgctt 8940
aatcagtgag gcacctatct cagcgatctg tctatttcgt tcatccatag ttgcctgact 9000
ccccgtcgtg tagataacta cgatacggga gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat 9060
gataccgcga gacccacgct caccggctcc agatttatca gcaataaacc agccagccgg 9120
aagggccgag cgcagaagtg gtccctgcaac tttatccgcc tccatccagt ctattaattg 9180
ttgccgggaa gctagagtaa gtagttcgcc agttaatagt ttgcgcaacg ttgttgccat 9240
tgctacaggc atcgtggtgt cacgctcgtc gtttggtatg gcttcattca gctccggttc 9300
ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc catgttggtc aaaaaagcgg ttagctcctt 9360
cggtcctccg atcgttgtca gaagtaagtt ggccgcagtg ttatcactca tggttatggc 9420
agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc atccgtaaga tgcttttctg tgactggtga 9480
gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg tatgcggcga ccgagttgct cttgcccggc 9540
gtcaatacgg gataataccg cgccacatag cagaacttta aaagtgtcga tcattggaaa 9600
acgtttcttcg gggcgaaaac tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta 9660
accactcgt gcacccaact gatcttcagc atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg 9720
agcaaaaaa ggaaggcaaa atgccgcaaa aaagggaata agggcgacac ggaaatgttg 9780
aatactcata ctcttccttt ttcaatatta ttgaagcatt tatcagggtt attgtctcat 9840
gagcggatac atatttgaat gtatttagaa aaataaacia ataggggttc cgcgcacatt 9900
tccccgaaaa gtgccacctg acgtctaaga aaccattatt atcatgacat taacctataa 9960
aaataggcgt atcacgaggc cctttcgtct cgcgcgtttc ggtgatgacg gtgaaaacct
10020
ctgacacatg cagctccccg agacgggtcac agcttgtctg taagcggatg ccgggagcag
10080
acaagcccgt cagggcgcggt cagcgggtgt tggcgggtgt cggggctggc ttaactatgc
10140
ggcatcagag cagattgtac tgagagtgca ccatatgcgg tgtgaaatac cgcacagatg
10200
cgtaaggaga aaataccgca tcaggcgcca ttcgccattc aggctgcgca actgttggga
10260
agggcgatcg gtgcgggcct cttecgctatt acgccagctg gcgaaagggg gatgtgctgc
10320
aaggcgatta agttgggtaa cgccagggtt ttcccagtcg cgacgttgta aaacgacggc
10380
cagtgcc
10387

```

```

<210> 9
<211> 20
<212> PRT
<213> circovirut ở lợn

```

```

<400> 9

```

```

Ser Tyr Pro Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg His His Pro Pro Ser
1           5           10          15

```

```

His Leu Gly Gln
20

```

```

<210> 10
<211> 19
<212> PRT
<213> circovirut ở lợn

```

```

<400> 10

```

```

Pro Arg His His Tyr Arg Pro Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr
1           5           10          15

```

```

Thr Leu Ser

```

<210> 11
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>

<223> Đây là trình tự axit amin của circovirut typ 2 ở lợn,
 khung đọc mở 2.

<400> 11

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Lys Pro
225          230

```