



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2011121850/10, 30.05.2011

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
29.12.2005

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
30.12.2004 US 60/640,510;
13.01.2005 US 11/034,797;
29.12.2005 US 11/319,975Номер и дата приоритета первоначальной заявки,
из которой данная заявка выделена:
2007128943 30.12.2004

(43) Дата публикации заявки: 10.12.2012 Бюл. № 34

(45) Опубликовано: 20.02.2016 Бюл. № 5

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: BLANCHARD P. et al., "Protection of
swine against post-weaning multisystemic wasting
syndrome (PMWS) by porcine circovirus type 2
(PCV2) proteins", Vaccine. 2003 Nov 7;21(31):
4565-75. NAWAGITGUL P. et al., "Open reading
frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a
major capsid protein", J Gen Virol. 2000 Sep;81
(Pt 9):2281-7. KIM Y. et al., (см. прод.)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул.Б.Спасская, 25, строение 3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры", А.В.Миц

(72) Автор(ы):

ЭЙЧМЕЙЕР Марк (US),
НИТЦЕЛЬ Грег (US),
ШЕФФЕР Меррилл (US)

(73) Патентообладатель(и):

БЕРИНГЕР ИНГЕЛЬГЕЙМ
ВЕТМЕДИКА, ИНК. (US)

(54) ИММУНОГЕННЫЕ КОМПОЗИЦИИ РСV2 И СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ ТАКИХ КОМПОЗИЦИЙ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области
биотехнологии, вирусологии и ветеринарии.
Изобретение раскрывает применение
иммуногенной композиции, содержащей
рекомбинантный белок РСV2 ORF2, для индукции
иммунного ответа против РСV2 или для
получения лекарственного средства для индукциииммунного ответа против РСV2. При этом
количество рекомбинантного белка РСV2 ORF2
в композиции составляет по меньшей мере 2 мкг.
Предложенное изобретение может быть
использовано в ветеринарии. 2 н. и 17 з.п. ф-лы,
3 ил., 24 табл., 5 пр.

(56) (продолжение):

"Characterization of the recombinant proteins of porcine circovirus type2 field isolate expressed in the baculovirus system", J Vet Sci. 2002 Mar;3(1):19-23. US 6497883 B1, 24.12.2002. NAWAGITGUL P. et al., "Modified indirect porcine circovirus (PCV) type 2-based and recombinant capsid protein (ORF2)-based

R U 2 5 7 5 6 1 5 C 2

R U 2 5 7 5 6 1 5 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
A61K 39/12 (2006.01)
C07K 14/005 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2011121850/10, 30.05.2011**

(24) Effective date for property rights:
29.12.2005

Priority:

(30) Convention priority:
30.12.2004 US 60/640,510;
13.01.2005 US 11/034,797;
29.12.2005 US 11/319,975

Number and date of priority of the initial application,
from which the given application is allocated:
2007128943 30.12.2004

(43) Application published: **10.12.2012 Bull. № 34**

(45) Date of publication: **20.02.2016 Bull. № 5**

Mail address:

**129090, Moskva, ul.B.Spaskaja, 25, stroenie 3, OOO
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",
A.V.Mits**

(72) Inventor(s):

**EhJChMEJER Mark (US),
NITTS'EL' Greg (US),
ShEFFER Merrill (US)**

(73) Proprietor(s):

**BERINGER INGEL'GEJM VETMEDIKA,
INK. (US)**

(54) **PCV2 IMMUNOGENIC COMPOSITIONS AND METHODS FOR PRODUCING THESE COMPOSITIONS**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceuticals.

SUBSTANCE: invention refers to biotechnology, virology and veterinary science. The invention discloses the use of immunogenic compositions containing the PCV2 ORF2 recombinant protein, for inducing an immune response to PCV2 or producing a medicinal agent for inducing an immune response to PCV2. The

amount of the PCV2 ORF2 recombinant protein in the composition makes at least 2 mcg. The presented invention can be used in veterinary science.

EFFECT: producing the new composition for veterinary science.

19 cl, 3 dwg, 24 tbl, 5 ex

R U 2 5 7 5 6 1 5 C 2

R U 2 5 7 5 6 1 5 C 2

РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

По настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной заявки номер 60/640510, поданной 30 декабря 2004 г., и заявки номер 11/034737, поданной 13 января 2005 г., раскрытие и содержание которых приведено здесь в качестве ссылки.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Заявка содержит список последовательностей в бумажном формате и в считываемом компьютером формате, объяснения и содержание которого приведено здесь в качестве ссылки.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Область изобретения

В одном аспекте настоящее изобретение относится к выделению белка, экспрессированного с открытой рамки считывания 2 (ORF2) цирковируса свиней типа 2 (PCV2). Более конкретно, белок представляет собой рекомбинантный белок, экспрессированный трансфицированным вирусом, содержащим рекомбинантные кодирующие последовательности для цирковируса свиней типа 2, открытой рамки считывания 2. Еще более конкретно, трансфицированному вирусу позволяют инфицировать клетки в культуральной среде, и белок, экспрессированный с открытой рамки считывания 2, выделяют из супернатанта, а не из внутреннего пространства клеток. Еще более конкретно, способ включает в себя стадии амплификации гена открытой рамки считывания 2 из цирковируса свиней типа 2, клонирования этой амплифицированной части в первый вектор, вырезания части с открытой рамкой считывания 2 из этого вектора и клонирования в вектор-переносчик, котрансфекции клеток в культуральной среде вектором-переносчиком с вирусным вектором, обеспечение возможности инфекции клеток вирусным вектором и таким образом, экспрессии открытой рамки считывания 2, и выделения экспрессированного рекомбинантного белка, кодированного открытой рамкой считывания 2, из супернатанта.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к иммуногенной композиции, эффективной для индукции иммунного ответа против PCV2, и способам получения данных иммуногенных композиций. Более конкретно, настоящее изобретение относится к иммунологической композиции, эффективной для обеспечения иммунного ответа, защищающего животное, которому ввели композицию, и снижающего или уменьшающего тяжесть клинических симптомов, связанных с инфекцией PCV2. Еще более конкретно, настоящее изобретение относится к иммунологической композиции на основе белка, обеспечивающей эффективную защиту против инфекции PCV2. Еще более конкретно, настоящее изобретение относится к иммунологической композиции, содержащей ORF2 из PCV2, где введение PCV2-ORF2 приводит к защите против инфекции PCV2. Наиболее конкретно, настоящее изобретение относится к иммунологической композиции, эффективной для обеспечения эффективного иммунитета у свиньи, которой вводят иммунологическую композицию, где композиция содержит белок, экспрессированный с ORF2 из PCV2.

Описание уровня техники

Цирковирус свиней типа 2 (PCV2) представляет собой небольшой (17-22 нм в диаметре), икосаэдрический ДНК-вирус без внешней оболочки, содержащий одноцепочечный кольцевой геном. PCV2 разделяет приблизительно 80% идентичной последовательности с цирковирусом свиней типа 1 (PCV1). Однако, в отличие от PCV1, который обычно не является вирулентным, у свиней, инфицированных PCV2, обнаруживают синдром с общепринятым обозначением мультисистемный синдром

истощения после отъема от свиноматки (PMWS). PMWS клинически характеризуют истощением, бледностью кожи, хилостью, респираторными нарушениями, диареей, желтухой и разлитием желчи. У некоторых пораженных свиней наблюдают сочетание всех симптомов, в то время как у других свиней наблюдают только один или два из этих симптомов. При вскрытии обнаруживают также повреждения во множестве тканей и органов, где преимущественными участками поражений являются лимфоидные органы. Обнаружили сильную корреляцию между количеством нуклеиновой кислоты или антигена PCV2 и тяжестью микроскопических лимфоидных повреждений. Процент смертности для свиней, инфицированных PCV2, может достигать 80%. Помимо PMWS, PCV2 связан с несколькими другими инфекциями, включая псевдобешенство, свиной респираторно-репродуктивный синдром (PRRS), болезнь Глассера, стрептококковый менингит, сальмонеллез, колибациллез после отъема от свиноматки, диетический гепатоз и гнойную бронхопневмонию.

Белок с открытой рамки считывания 2 (ORF2) PCV2, обладающий приблизительной молекулярной массой 30 кДа при прохождении геля для SDS-PAGE, в прошлом использовали в качестве антигенного компонента вакцин против PCV2. Обычные способы получения ORF2 для использования в таких вакцинах, как правило, состоят из амплификации ДНК PCV2, кодирующей ORF2, трансфекции вирусного вектора ДНК ORF2, инфекции клеток вирусным вектором, содержащим ДНК ORF2, обеспечения возможности для вируса экспрессировать белок ORF2 в клетке и выделения белка ORF2 из клеток посредством лизиса клеток. Эти способы, как правило, занимают до приблизительно четырех суток после инфекции клеток вирусным вектором. Однако эти способы обладают тем недостатком, что способы выделения являются как дорогостоящими, так и трудоемкими. Кроме того, количество ORF2, выделенного из клеток, не является очень большим; следовательно, необходимо инфицировать большое число клеток большим числом вирусных векторов, чтобы получить достаточные количества экспрессированного рекомбинантного белка для использования в вакцинах и т.п.

Современные способы иммунизации PCV2 включают в себя вакцины на основе ДНК, такие как описаны в патенте США № 6703023. Однако, такие вакцины являлись неэффективными для обеспечения защитного иммунитета против инфекции PCV2 и связанных с ней клинических признаков.

Соответственно, в данной области существовала необходимость способа получения белка ORF2, не требующего выделения белка ORF2 из внутреннего пространства инфицированных клеток. Кроме того, существовала необходимость в способах получения рекомбинантного белка ORF2 в количествах, достаточных для эффективного получения композиции вакцины. Кроме того, существовала еще необходимость в способах получения белка ORF2, не требующих сложных и трудоемких методов, необходимых для существующих способов выделения белка ORF2. Наконец, в отношении композиций, в данной области существовала необходимость в иммуногенной композиции, обеспечивающей защитный иммунитет против инфекции PCV2 и снижающей тяжесть связанных с ней клинических признаков или предотвращающей их.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение преодолевает проблемы, присущие уровню техники и предоставляет определенное преимущество в данной области знаний. Конкретно, в одном аспекте настоящее изобретение относится к улучшенным способам получения и/или выделения рекомбинантного белка ORF2 PCV2, i) посредством обеспечения возможности инфекции чувствительных клеток в культуре рекомбинантным вирусным

вектором, содержащим кодирующие последовательности ДНК ORF2 PCV2, где белок ORF2 экспрессирован посредством рекомбинантного вирусного вектора, и ii) последующим выделением ORF2 из супернатанта. Неожиданно обнаружили, что ORF2 высвобождается в супернатант в больших количествах, если позволить инфекции и последующей инкубации инфицированных клеток протекать дольше, чем в обычном предшествующем способе получения ORF2 PCV2, в котором ORF2 PCV2 выделяют из внутреннего пространства клеток. Более того, что удивительно, обнаружили, что белок ORF2 PCV является устойчивым к прототипической деградациии вне продуцирующих клеток. Оба открытия вместе позволяют выделение больших количеств белка ORF2 PCV2 из супернатанта культур клеток, инфицированных рекомбинантными вирусными векторами, содержащими ДНК ORF2 PCV2 и экспрессирующими белок ORF2 PCV2. Большие количества белка ORF2 PCV2 означают более чем приблизительно 20 мкг/мл супернатанта, предпочтительно более чем приблизительно 25 мкг/мл, еще более предпочтительно, более чем приблизительно 30 мкг/мл, даже более предпочтительно, более чем приблизительно 40 мкг/мл, даже более предпочтительно, более чем приблизительно 50 мкг/мл, еще более предпочтительно, более чем приблизительно 60 мкг/мл, еще более предпочтительно, более чем приблизительно 80 мкг/мл, еще более предпочтительно, более чем приблизительно 100 мкг/мл, даже более предпочтительно, более чем приблизительно 150 мкг/мл, наиболее предпочтительно, более чем приблизительно 190 мкг/мл. Таких уровней экспрессии можно также достигать, например, способами, как описаны в примерах 1-3.

Предпочтительные культуры клеток обладают числом клеток приблизительно между $0,3-2,0 \times 10^6$ клеток/мл, более предпочтительно, от приблизительно $0,35-1,9 \times 10^6$ клеток/мл, еще более предпочтительно, от приблизительно $0,4-1,8 \times 10^6$ клеток/мл, даже более предпочтительно, от приблизительно $0,45-1,7 \times 10^6$ клеток/мл, и наиболее предпочтительно, от приблизительно $0,5-1,5 \times 10^6$ клеток/мл. Специалист в данной области может определить предпочтительные клетки. Предпочтительными клетками являются чувствительные к инфекции подходящим рекомбинантным вирусным вектором, содержащим ДНК ORF2 PCV2, и экспрессирующие белок ORF2 PCV2. Предпочтительно, клетки представляют собой клетки насекомых, и более предпочтительно, они включают в себя клетки насекомых, продаваемые под торговым наименованием клетки насекомых Sf+ (Protein Sciences Corporation, Meriden, CT).

Специалисты в данной области могут определить также подходящую культуральную среду, где предпочтительной культуральной средой является бессывороточная среда для клеток насекомых, такая как Excell 420 (JRH Biosciences, Inc., Lenexa, KS) и подобные. Предпочтительные вирусные векторы включают в себя бакуловирусы, такие как BaculoGold (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA), особенно если продуцирующими клетками являются клетки насекомых. Хотя бакуловирусная экспрессирующая система является предпочтительной, специалистам в данной области понятно, что другие экспрессирующие системы подходят для целей по настоящему изобретению, а именно, экспрессии ORF2 PCV2 в супернатанте культуры клеток. Такие другие экспрессирующие системы могут требовать использования сигнальной последовательности, чтобы вызывать экспрессию ORF2 в среду. Неожиданно обнаружили, что когда ORF2 получают в бакуловирусной экспрессирующей системе, не требуется никакой сигнальной последовательности или дополнительной модификации, чтобы вызывать экспрессию ORF2 в среду. Считают, что данный белок может независимо формировать вирусоподобные частицы (Journal of General Virology Vol. 81, pp. 2281-2287 (2000)) и

секретироваться в культуральный супернатант. Рекомбинантный вирусный вектор, содержащий последовательности ДНК ORF2 PCV2, обладает предпочтительной множественностью инфекции (MOI) приблизительно между 0,03-1,5, более предпочтительно, от приблизительно 0,05 до 1,3, еще более предпочтительно, от приблизительно 0,09 до 1,1, и наиболее предпочтительно, от приблизительно 0,1 до 1,0 при использовании для инфекции чувствительных клеток. Предпочтительно, вышеупомянутые MOI относятся к одному мл культуральной жидкости.

Предпочтительно, описанный здесь способ включает в себя инфекцию $0,35-1,9 \times 10^6$ клеток/мл, еще более предпочтительно, приблизительно $0,4-1,8 \times 10^6$ клеток/мл, даже более предпочтительно, приблизительно $0,45-1,7 \times 10^6$ клеток/мл, и наиболее предпочтительно, приблизительно $0,5-1,5 \times 10^6$ клеток/мл рекомбинантным вирусным вектором, содержащим ДНК ORF2 PCV2 и экспрессирующим белок ORF PCV2, обладающим MOI (множественностью инфекции) приблизительно между 0,03-1,5, более предпочтительно, от приблизительно 0,05 до 1,3, еще более предпочтительно, от приблизительно 0,09 до 1,1, и наиболее предпочтительно, от приблизительно 0,1 до 1,0.

Затем инфицированные клетки инкубируют в течение периода вплоть до десяти суток, более предпочтительно, от приблизительно двух суток до приблизительно десяти суток, еще более предпочтительно, от приблизительно четырех суток до приблизительно девяти суток, и наиболее предпочтительно, от приблизительно пяти суток до приблизительно восьми суток. Предпочтительные условия инкубации включают в себя температуру приблизительно между 22-32°C, более предпочтительно, от приблизительно 24 до 30°C, еще более предпочтительно приблизительно, от 25 до 29°C, даже более предпочтительно, от приблизительно 26 до 28°C, и наиболее предпочтительно, приблизительно 27°C. Предпочтительно, в клетках Sf+ после инокуляции обследовали индуцированные бакуловирусом характерные изменения. Такие обследования могут включать в себя динамику клеточной плотности и снижение жизнеспособности в течение периода после инфекции. Обнаружили, что пик вирусного титра наблюдают 3-5 суток после инфекции, и пик высвобождения ORF2 из клеток в супернатант получают между 5 и 8 сутками, и/или когда жизнеспособность клеток снижается до менее чем 10%.

Таким образом, в одном аспекте настоящее изобретение относится к улучшенному способу получения и/или выделения рекомбинантного белка ORF2 PCV2, предпочтительно, в описанных выше количествах, посредством i) обеспечения возможности инфекции ряда чувствительных клеток (смотри выше) в культуре рекомбинантным вирусным вектором с MOI, как определено выше, ii) экспрессии белка ORF2 PCV2 посредством рекомбинантного вирусного вектора, и iii) последующим выделением ORF2 PCV2 из супернатанта клеток, полученного между сутками 5 и 8 после инфекции, и/или когда жизнеспособность клеток снижается до менее чем 10%. Предпочтительно, рекомбинантный вирусный вектор представляет собой рекомбинантный бакуловирус, содержащий кодирующие последовательности ДНК ORF2 PCV2, и клетки представляют собой клетки Sf+. Кроме того, является предпочтительным периодически обследовать в культуре макроскопическое и микроскопическое проявление контаминации, или атипичные изменения морфологии клеток в течение периода после инфекции. Любую культуру с какими-либо признаками контаминации следует отбраковывать. Предпочтительно, экспрессированный рекомбинантный белок ORF2 секретруется клетками в окружающую культуральную среду, что поддерживает жизнеспособность клеток. Затем ORF2 выделяют из супернатанта, окружающего клетки, а не собственно из клеток.

Процесс выделения предпочтительно начинается с отделения клеточного дебриса от экспрессированного в среду ORF2 посредством стадии разделения. Предпочтительные стадии разделения включают в себя фильтрацию, центрифугирование при скорости до приблизительно 20000 × g, центрифугирование в непрерывном режиме, хроматографическое разделение с использованием ионного обмена или гель-фильтрации и общепринятые иммуноаффинные способы. Эти способы известны специалистам в данной области, например, по (Harris and Angel (eds.), Protein purification methods - a practical approach, IRL press Oxford 1995). Наиболее предпочтительные способы разделения включают в себя центрифугирование при скорости до приблизительно 20000 × g и фильтрацию. Предпочтительные способы фильтрации включают в себя тупиковую микрофильтрацию и фильтрацию в тангенциальном потоке (или в поперечном потоке), включая тупиковую микрофильтрацию на полых волокнах. Из этого предпочтительной является тупиковая микрофильтрация. Предпочтительный размер пор для тупиковой микрофильтрации представляет собой приблизительно между 0,30-1,35 мкм, более предпочтительно, приблизительно между 0,35-1,25 мкм, еще более предпочтительно, приблизительно между 0,40-1,10 мкм, и наиболее предпочтительно, приблизительно между 0,45-1,0 мкм. Считают, что любая общепринятая фильтрационная мембрана пригодна для целей по настоящему изобретению, и полиэфирсульфоновые мембраны являются предпочтительными. В течение стадии фильтрации удаляют все молекулы нуклеиновой кислоты с малой массой.

Таким образом, в одном из дополнительных аспектов настоящее изобретение относится к улучшенному способу получения и/или выделения рекомбинантного белка ORF2 PCV2, предпочтительно, в количествах, описанных выше, посредством i) обеспечения возможности инфекции ряда чувствительных клеток (смотри выше) в культуре рекомбинантным вирусным вектором с MOI, как определено выше, ii) экспрессии белка ORF2 PCV2 посредством рекомбинантного вирусного вектора, iii) выделения ORF2 PCV2 из супернатанта клеток, полученных между сутками 5 и 8 после инфекции, и/или когда жизнеспособность клеток снижается до менее чем 10%, и iv) отделения клеточного дебриса от экспрессированного ORF2 PCV2 посредством стадии разделения. Предпочтительно, рекомбинантный вирусный вектор представляет собой бакуловирус, содержащий кодирующие последовательности ДНК ORF2, и клетки представляют собой клетки SF+. Предпочтительными стадиями центрифугирования являются описанные выше. Наиболее предпочтительной является тупиковая микрофильтрация с использованием мембраны с размером пор приблизительно между 0,30-1,35 мкм, более предпочтительно, приблизительно между 0,35-1,25 мкм, еще более предпочтительно, приблизительно между 0,40-1,10 мкм, и наиболее предпочтительно, приблизительно между 0,45-1,0 мкм.

Для выделения ORF2 PCV2, который будет использован в иммуногенной или иммунологической композиции, такой как вакцина, является предпочтительным включение стадии инактивации для инактивации вирусного вектора. «Иммуногенная или иммунологическая композиция» относится к композиции, содержащей по меньшей мере один антиген, вызывающий у хозяина иммунологический ответ из клеточного и/или опосредованного антителом иммунного ответа на рассматриваемую композицию или вакцину. Как правило, «иммунологический ответ» включает в себя в качестве неограничивающих примеров один или несколько из следующих эффектов: продукция или активация антител, В-клеток, хелперных Т-клеток, супрессорных Т-клеток, и/или цитотоксических Т-клеток и/или $\gamma\delta$ Т-клеток, направленных специфически против антигена или антигенов, включенных в рассматриваемую композицию или вакцину.

Предпочтительно, у хозяина обнаруживают терапевтический или защитный иммунологический ответ, так что устойчивость к новой инфекции будет увеличена и/или клиническая тяжесть заболевания уменьшена. Такую защиту можно продемонстрировать или по уменьшению, или по отсутствию симптомов, в норме обнаруживаемых для инфицированного хозяина, быстрому времени восстановления и/или низкому вирусному титру у инфицированного хозяина. Таким образом, настоящее изобретение также относится к способу получения и/или выделения рекомбинантного белка ORF2 PCV2, предпочтительно в описанных выше количествах, посредством i) обеспечения возможности инфекции ряда чувствительных клеток (смотри выше) в культуре рекомбинантным вирусным вектором с MOI, как определено выше, ii) экспрессии белка ORF2 PCV2 посредством рекомбинантного вирусного вектора, iii) выделения ORF2 PCV2 из супернатанта клеток, полученного между сутками 5 и 8 после инфекции, и/или когда жизнеспособность клеток снижается до менее чем 10%, iv) отделения клеточного дебриса от экспрессированного ORF2 PCV2 посредством стадии разделения, и v) инактивации рекомбинантного вирусного вектора.

Предпочтительно, данную инактивацию выполняют непосредственно до или сразу после стадии фильтрации, где предпочтительным временем для инактивации является время после стадии фильтрации. Для целей по настоящему изобретению можно использовать любой общепринятый способ инактивации. Так, инактивацию можно проводить посредством химических и/или физических воздействий. В предпочтительных формах определяют объем собранной жидкости и доводят температуру приблизительно до 32-42°C, более предпочтительно, приблизительно до 34-40°C, и наиболее предпочтительно, приблизительно до 35-39°C. Предпочтительные способы инактивации включают в себя добавление циклизованного бинарного этиленimina (BEI), предпочтительно в концентрации от приблизительно 1 до приблизительно 20 мМ, предпочтительно от приблизительно 2 до приблизительно 10 мМ, еще более предпочтительно, от приблизительно 2 до приблизительно 8 мМ, еще более предпочтительно, от приблизительно 3 до приблизительно 7 мМ, наиболее предпочтительно, приблизительно 5 мМ. Например, инактивация включает в себя добавление раствора гидробромида 2-бромэтиленамина, предпочтительно приблизительно 0,4 М, циклизованного до 0,2 М бинарного этиленimina (BEI) в 0,3 н NaOH, к жидкостям до конечной концентрации приблизительно 5 мМ BEI. Предпочтительно, затем жидкости постоянно перемешивают в течение 72-96 часов, и инактивированные собранные жидкости можно хранить замороженными при -40°C или ниже, или приблизительно между 1-7°C. После завершения инактивации добавляют раствор тиосульфата натрия, предпочтительно 1,0 М, для нейтрализации всего остаточного BEI. Предпочтительно, тиосульфат натрия добавляют в эквивалентном количестве по сравнению с BEI, предварительно добавленном для инактивации. Например, в случае, если BEI добавляют до конечной концентрации 5 мМ, добавляют 1,0 М раствор тиосульфата натрия до минимальной конечной концентрации 5 мМ для нейтрализации всего остаточного BEI.

Таким образом, в одном из дополнительных аспектов настоящее изобретение относится к способу получения рекомбинантного белка ORF2 PCV2, предпочтительно в описанных выше количествах, посредством i) обеспечения возможности инфекции ряда чувствительных клеток (смотри выше) в культуре рекомбинантным вирусным вектором с MOI, как определено выше, ii) экспрессии белка ORF2 PCV2 посредством рекомбинантного вирусного вектора, iii) выделением ORF2 PCV2 из супернатанта клеток, полученных между 5 и 8 сутками после инфекции, и/или когда жизнеспособность

клеток снижается до менее, чем 10%, iv) отделения клеточного дебриса от экспрессированного ORF2 PCV2 посредством стадии разделения и v) инактивации рекомбинантного вирусного вектора. Предпочтительно, рекомбинантный вирусный вектор представляет собой бакуловирус, содержащий кодирующие последовательности ДНК ORF2 и клетки представляют собой клетки Sf+. Предпочтительными способами разделения являются описанные выше, и наиболее предпочтительной является стадия фильтрации. Предпочтительными стадиями инактивации являются описанные выше. Предпочтительно, инактивацию проводят приблизительно между 35-39°C и в присутствии 2-8 мМ BEI, еще более предпочтительно, в присутствии приблизительно 5 мМ BEI. Неожиданно обнаружили, что более высокие концентрации BEI отрицательно влияют на белок ORF2 PCV2.

По одному из дополнительных аспектов по настоящему изобретению, описанный выше способ включает в себя также стадию нейтрализации после стадии v). Данная стадия vi) включает в себя добавление эквивалентного количества вещества, нейтрализующего инактивирующее вещество в растворе. Предпочтительно, если инактивирующим веществом является BEI, предпочтительным является добавление тиосульфата натрия до эквивалентного количества. Таким образом, в дополнительном аспекте, стадия vi) включает в себя добавление раствора тиосульфата натрия до конечной концентрации от приблизительно 1 до приблизительно 20 мМ, предпочтительно, от приблизительно 2 до приблизительно 10 мМ, еще более предпочтительно, от приблизительно 2 до приблизительно 8 мМ, еще более предпочтительно, от приблизительно 3 до приблизительно 7 мМ, наиболее предпочтительно, приблизительно 5 мМ, где инактивирующим веществом является BEI.

В предпочтительных формах, и особенно в формах с применением рекомбинантного белка ORF2 PCV2 в иммуногенной композиции, такой как вакцина, каждую партию собранного ORF2 будут тестировать по инактивации посредством пассирования в зависимых от прикрепления, чувствительных к бакуловирусу клетках Sf+. В предпочтительной форме данного тестирования, 150 см² монослоя соответствующей культуры клеток инокулируют 1,0 мл инактивированных жидкостей с PCV2 и поддерживают при 25-29°C в течение 14 суток по меньшей мере с двумя пассажами. В конце периода поддержания в монослоях клеток проверяют цитопатогенетический эффект (CPE), типичный для бакуловируса с ORF2 PCV2. Предпочтительно, используют также вирусы для положительного контроля. Такие контроли могут состоять из культуры клеток Sf+, инокулированных не подвергавшимся инактивации контрольным бакуловирусом с ORF2 PCV2, и одного флакона клеток Sf+, оставленных без инокуляции. После инкубации и пассажа, отсутствие инфицированных вирусом клеток для обработанных BEI жидкостей с вирусом будет представлять собой удовлетворительный тест инактивации. Контрольные клетки, инокулированные контрольным вирусом, должны обладать CPE, типичными для бакуловируса с ORF2 PCV2, а во флаконе без инокуляции не должны наблюдать никаких признаков CPE бакуловируса с ORF2 PCV2. Альтернативно, в конце периода поддержания можно собрать образцы супернатанта и инокулировать в Sf+ в 96-луночный планшет, который наполняют клетками Sf+ и затем поддерживают при 25-29°C в течение 5-6 суток. Затем планшет фиксируют и окрашивают антителом против ORF2 PCV2, конъюгированным с FITC. Отсутствие CPE и экспрессии ORF2, как детектируют IFA микроскопией, для обработанных BEI жидкостей с вирусом представляет собой удовлетворительный тест инактивации. Для контрольных клеток, инокулированных контрольным вирусом, должны наблюдать CPE и активность в IFA, а флакон без инокуляции не должен обладать никакими

признаками СРЕ бакуловirusа с ORF2 PCV2 и не должен обладать активностью в IFA.

Таким образом, дополнительный аспект настоящего изобретения относится к тесту инактивации для определения эффективности инактивации рекомбинантного вирусного вектора, включающего в себя стадии: i) контактирования по меньшей мере части культуральной жидкости, содержащей рекомбинантный вирусный вектор, с инактивирующим веществом, предпочтительно, как описано выше, ii) добавление нейтрализующего вещества для нейтрализации инактивирующего вещества, предпочтительно как описано выше, и iii) определение остаточной инфекционности в анализах, как описано выше.

После инактивации относительное количество рекомбинантного белка ORF2 PCV2 в образце можно определить рядом способов. Предпочтительные способы количественного определения включают в себя денситометрию после SDS-PAGE, ELISA и исследования вакцинации животных, устанавливающие корреляцию известных количеств вакцины с клиническими исходами (серологией, и т.д.). При использовании для количественной оценки SDS-PAGE образец материала, содержащий неизвестное количество рекомбинантного белка ORF2 PCV2, разделяют в геле вместе с образцами, содержащими различные известные количества рекомбинантного белка ORF2 PCV2. Затем можно получить калибровочную кривую на основе известных образцов, и количество рекомбинантного ORF2 PCV2 в неизвестном образце можно определить посредством сравнения с этой калибровочной кривой. Поскольку анализы ELISA, как правило, являются общепринятыми в качестве промышленного стандарта для определения количества антигена, они являются предпочтительными для количественной оценки.

Таким образом, в дополнительном аспекте настоящее изобретение также относится к ELISA для количественной оценки рекомбинантного белка ORF2 PCV2.

Предпочтительный ELISA, как представлено здесь, как правило, начинают с разведения антитела для захвата 1:6000 или до подходящего рабочего разведения в покрывающем буфере. Предпочтительным антителом для захвата является свиное анти-PCV2 PAb, очищенное белком G, а предпочтительным покрывающим буфером является 0,05 М карбонатный буфер, который можно получить объединением 2,93 г NaHCO_3 (Sigma Cat № S-6014, или эквивалентный) и 1,59 г NaCO_3 (Sigma Cat. №. S-6139, или эквивалентный).

Смесь объединяют с дистиллированной водой, или эквивалентом для получения одного литра при pH $9,6 \pm 0,1$. Затем антитело для захвата разводят 1:6000, или до любого другого рабочего разведения в покрывающем буфере. Например, для четырех планшетов необходимо 42 мл покрывающего буфера и семь мкл антитела для захвата. С использованием способа обратного пипетирования по 100 мкл разведенного антитела для захвата добавляли ко всем лункам. Чтобы получить ровное покрытие, следует осторожно постучать по сторонам каждого планшета. Затем планшеты заклеивали пленками для герметизации перед штабелированием и накрывали стопку пустым 96-луночным планшетом. Планшеты инкубировали в течение ночи (14-24 часов) при 35-39°C. Затем каждый планшет промывали три раза буфером для промывки с использованием системы для промывки титрационных микропланшетов ультра плюс при 250 мкл/промывку с тремя промывками и без времени отмачивания. После последней промывки планшетами следует постучать по бумажному полотенцу. Опять с использованием способа обратного пипетирования во все лунки следует добавить 250 мкл блокирующего раствора. Тестовые планшеты следует заклеить и инкубировать в течение приблизительно одного часа (\pm пять минут) при 35-37°C. Предпочтительно, после этой стадии планшеты не штабелируют. В течение стадии блокирования все

опытные образцы следует достать и оттаять при комнатной температуре. Затем следует подготовить четыре отдельных планшета для разведения посредством добавления 200 мкл разбавляющего раствора ко всем оставшимся лунками, за исключением ряда А и ряда Н, колонки 1-3. Затем шесть пробирок следует пометить следующим образом, 5 низкий титр, средний титр, высокий титр, инактивированный/фильтрованный (1:240), инактивированный/фильтрованный (1:480) и внутренний контроль. В обозначенных пробирках следует приготовить соответствующее разведение для следующих тестируемых образцов. Оттаявшие опытные образцы перед использованием следует перемешать со встряхиванием. Для четырех планшетов следует выполнить следующие 10 разведения: А) низкий титр не следует разводить: 3,0 мл с низким титром; В) отрицательный контроль с разведением 1:30 (клетки SF+): 3,77 мл разбавителя + 130 мкл отрицательного контроля; С) средний титр с разведением 1:30 (8 мкг/мл): 3,77 мл разбавителя + 130 мкл со средним титром; D) высокий титр с разведением 1:90 (16 мкг/мл): 2,967 мл разбавителя + 33 мкл с высоким титром; Е) инактивированный/ 15 фильтрованный с разведением 1:240: 2,39 мл разбавителя + 10 мкл инактивированного/фильтрованного образца; F) инактивированный/фильтрованный с разведением 1:480: 1,0 мл разбавителя + 1,0 мл инактивированного/фильтрованного подготовленного образца (1:240) из Е выше; G) внутренний контроль с разведением 1:30: 3,77 мл разбавителя + 130 мкл внутреннего контроля. Затем добавляют 300 мкл подготовленных 20 образцов к соответствующим пустым лункам в планшетах для разведения для планшетов 1-4. Затем устанавливают многоканальную пипетку на 100 мкл, содержимое ряда А перемешивают пипетированием вверх и вниз по меньшей мере 5 раз и затем 100 мкл переносят в ряд В с использованием способа обратного пипетирования. Наконечники следует сменить и ту же самую процедуру повторить по планшету до ряда G. Образцы 25 в этих планшетах для разведения теперь готовы для переноса в тестовые планшеты, как только тестовые планшеты промоют 3 раза буфером для промывки с использованием системы для промывки титрационных микропланшетов ультра плюс (установка на 250 мкл/промывку, 3 промывки, без времени отмачивания). После 30 последней промывки планшетами следует постучать по бумажному полотенцу. Затем содержимое планшетов для разведения переносят в тестовый планшет с использованием простого способа переноса. Более конкретно, начиная с ряда Н, 100 мкл/лунку переносят из планшета(планшетов) для разведения в соответствующие лунки тестового планшета (планшетов) с использованием способа обратного пипетирования. После каждого переноса наконечники пипеток следует менять. От ряда G в планшете(планшетах) для 35 разведения переносят 100 мкл/лунку в соответствующие лунки тестового планшета (планшетов) с использованием способа обратного пипетирования. Тот же самый набор наконечников для пипетки можно использовать для остального переноса. Чтобы обеспечить гомогенность раствора для переноса, раствор следует пипетировать вверх и вниз по меньшей мере 3 раза перед переносом. Затем тестовый планшет(ы) заклеивают 40 и инкубируют в течение 1,0 часа \pm 5 минут при $37^{\circ}\text{C} \pm 2,0^{\circ}\text{C}$. Снова является предпочтительным не штабелировать планшеты. Затем планшеты промывают 3 раза буфером для промывки с использованием системы для промывки титрационных микропланшетов ультра плюс (установка на 250 мкл/промывку, 3 промывки, и без 45 времени отмачивания). После последней промывки планшетами постукивают по бумажному полотенцу. С использованием способа обратного пипетирования 100 мкл антитела для детекции, разведенного 1:300, или в соответствующем рабочем разведении в растворе для разведения добавляют во все лунки тестового планшета(планшетов). Например, для четырех планшетов необходимо 42 мл раствора для разведения с 140

мкл антитела для захвата. Затем тестовый планшет(ы) заклеивают и инкубируют в течение 1,0 часа±5 минут при 37°C±2,0°C. Затем планшеты снова промывают 3 раза буфером для промывки с использованием системы для промывки титрационных микропланшетов ультра плюс (установка на 250 мкл/промывку, 3 промывки, и без времени отмачивания). После последней отмывки планшетами постукивают по бумажному полотенцу. Затем получают разбавитель для конъюгата добавлением 1% нормальной сыворотки кролика к разбавителю. Например, для четырех планшетов 420 мкл нормальной сыворотки кролика добавляют к 42 мл разбавителя. Конъюгированное антитело разводят 1:10000, или в любом другом подходящем рабочем разведении в свежеприготовленном растворе для разведения конъюгата для всех лунок тестового планшета(планшетов). С использованием способа обратного пипетирования, 100 мкл данного разбавленного конъюгата антитела добавляют во все лунки. Затем тестовый планшет(ы) заклеивают и инкубируют в течение 45±5 минут при 37°C±2,0°C. Предпочтительно, планшеты не штабелируют. Затем планшеты промывают 3 раза буфером для промывки с использованием системы для промывки титрационных микропланшетов (установка на 250 мкл/промывку, 3 промывки, и без времени отмачивания). После последней промывки планшетами постукивают по бумажному полотенцу. Затем непосредственно перед использованием перемешивают равные объемы субстрата для пероксидазы ТМВ (реагент А) с раствором пероксидазы В (реагент В). Смешиваемое количество будет меняться в зависимости от количества планшетов, но для каждого планшета будет необходимо 10 мл/планшет + 2 мл. Таким образом, для 4 планшетов это будет составлять 21 мл реагента А + 21 мл реагента В. С использованием способа обратного пипетирования 100 мкл субстрата добавляют ко всем лункам тестового планшета(планшетов). Затем планшеты инкубируют при комнатной температуре в течение 15 минут ± 15 секунд. Реакцию останавливают добавлением 100 мкл 1 н раствора HCl во все лунки с использованием способа обратного пипетирования. Затем включают спектрофотометр для прочтения планшетов после ELISA и позволяют проходить его обычным фазам диагностики и тестирования общепринятым образом.

В дополнительном аспекте изобретение относится к способу конструирования рекомбинантного вирусного вектора, содержащего ДНК ORF2 PCV2 и экспрессирующего белок ORF2 PCV2 в больших количествах при инфекции чувствительных клеток. Неожиданно обнаружили, что рекомбинантный вирусный вектор, представленный здесь, экспрессирует большие количества, как определено выше, ORF2 PCV2 после инфекции чувствительных клеток. Таким образом, настоящее изобретение также относится к улучшенному способу получения и/или выделения белка ORF2 PCV2, предпочтительно включающему в себя стадию: конструирования рекомбинантного вирусного вектора, содержащего ДНК ORF2 PCV2 и экспрессирующего белок ORF2 PCV2. Предпочтительно, вирусный вектор представляет собой рекомбинантный бакуловирус. Подробности способа для конструирования рекомбинантных вирусных векторов, содержащих ДНК ORF2 PCV2 и экспрессирующих белок ORF2 PCV2, как представлено здесь, описаны в следующем: в предпочтительных формах рекомбинантный вирусный вектор, содержащий ДНК ORF2 PCV2 и экспрессирующий белок ORF2 PCV2, применяемый для инфекции клеток, получают трансфекцией вектора-переносчика, обладающего клонированным в нем геном ORF2, в вирусный вектор. Предпочтительно, в вирусный вектор трансфицируют только часть вектора-переносчика, содержащую ДНК ORF2. Термин «трансфицировать в вирусный вектор» означает и использован как синоним для «вставлять» или «клонировать»

гетерологичную ДНК в вирусный вектор, например, такой как бакуловирусный вектор. Вирусный вектор предпочтительно, но не обязательно, является бакуловирусом.

Таким образом, согласно дополнительному аспекту по настоящему изобретению, рекомбинантный вирусный вектор получают рекомбинацией между вектором-переносчиком, содержащим гетерологичную ДНК ORF2 PCV2, и вирусным вектором, предпочтительно бакуловирусом, даже более предпочтительно, линейаризованным дефектным по репликации бакуловирусом (таким как Vaculo Gold ДНК). «Вектор-переносчик» означает молекулу ДНК, содержащую по меньшей мере одну точку начала репликации, гетерологичный ген, в настоящем случае, ORF2 PCV2, и последовательности ДНК, позволяющие клонировать указанный гетерологичный ген в вирусный вектор. Предпочтительно, последовательности, позволяющие клонирование гетерологичного гена в вирусный вектор, фланкируют гетерологичный ген. Даже более предпочтительно, эти последовательности являются, по меньшей мере частично, гомологичными последовательностям вирусного вектора. Гомология последовательности затем позволяет рекомбинацию обоих молекул, вирусного вектора и вектора-переносчика, для получения рекомбинантного вирусного вектора, содержащего гетерологичный ген. Одним из предпочтительных векторов-переносчиков является вектор pVL1392 (BD Biosciences Pharmingen), разработанный для котрансфекции с VaculoGold ДНК в предпочтительную линию клеток Sf+. Предпочтительно, указанный вектор-переносчик содержит ДНК ORF2 PCV2. Конструкция для котрансфекции составляет в длину приблизительно 10387 пар оснований.

В более предпочтительных формах способы по настоящему изобретению начинают с выделения ДНК ORF2 PCV2. Как правило, это можно осуществлять из известного или неизвестного штамма, так как ДНК ORF2, по-видимому, является высоко консервативной с по меньшей мере приблизительно 95% идентичностью последовательности между различными изолятами. Любой ген ORF2 PCV2, известный в данной области, можно использовать для целей по настоящему изобретению, так как каждый будет экспрессироваться в супернатант. ДНК PCV ORF2 предпочтительно амплифицируют с использованием способов PCR, даже более предпочтительно, вместе с введением 5'-фланкирующей консенсусной последовательности Козака (CCGCCAUG) (SEQ ID NO 1) и/или 3'-фланкирующего участка EcoR1 (GAATTC) (SEQ ID NO 2). Таким введением 5'-консенсуса Козака предпочтительно удаляют природный стартовый кодон AUG из ORF2 PCV2. 3'-участок EcoR1 предпочтительно вводят ниже стоп-кодона ORF2 PCV2. Более предпочтительно, его вводят ниже поли А-последовательности терминации транскрипции, которая сама локализована ниже стоп-кодона ORF2 PCV2. Обнаружено, что использование консенсусной последовательности Козака, в частности, как описано выше, увеличивает уровень экспрессии последующего белка ORF2 PCV2.

Амплифицированную ДНК ORF2 PCV2 с этими дополнительными последовательностями клонируют в вектор. Предпочтительным вектором для данной начальной стадии клонирования является вектор pGEM-T-Easy (Promega, Madison, WI). ДНК ORF2 PCV2, включая некоторые последовательности вектора pGEM (SEQ ID NO: 7), предпочтительно вырезают из вектора по участку рестрикции NotI. Полученную ДНК затем клонируют в вектор-переносчик.

Таким образом, в одном аспекте настоящее изобретение относится к способу конструирования рекомбинантного вирусного вектора, содержащего ДНК ORF2 PCV2. Данный способ включает в себя стадии: i) клонирования рекомбинантной ORF2 PCV2 в вектор-переносчик; и ii) переноса части вектора-переносчика, содержащего рекомбинантный ORF2 PCV2, в вирусный вектор для получения рекомбинантного

вирусного вектора. Предпочтительно, вектор-переносчик представляет собой вектор, описанный выше, или сконструированный, как описано выше или как в качестве примера показано на фигуре 1. Таким образом, в дополнительном аспекте вектор-переносчик, применяемый для конструирования рекомбинантного вирусного вектора, как описано
5 здесь, содержит последовательность SEQ ID NO: 7.

В дополнительном аспекте данный способ дополнительно включает в себя перед стадией i) следующую стадию: амплификацию ДНК ORF2 PCV2 *in vitro*, где фланкирующие последовательности ДНК ORF2 PCV2 модифицируют, как описано выше. Способы амплификации ДНК ORF2 PCV2 и модификации фланкирующих
10 последовательностей *in vitro*, клонирования *in vitro* амплифицированной ДНК ORF2 PCV2 в вектор-переносчик и подходящие векторы-переносчики описаны выше, в качестве примера показаны на фигуре 1, или известны специалистам в данной области. Таким образом, в дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к способу конструирования рекомбинантного вирусного вектора, содержащего ДНК ORF2 PCV2
15 и экспрессирующего белок ORF2 PCV2, включающего в себя стадии: i) амплификации ДНК ORF2 PCV2 *in vitro*, где фланкирующие последовательности указанной ДНК ORF2 PCV2 модифицируют, ii) клонирования амплифицированной ДНК ORF2 PCV2 в вектор-переносчик; и iii) трансфекции вектора-переносчика или его части, содержащей рекомбинантную ДНК ORF2 PCV2, в вирусный вектор для получения рекомбинантного
20 вирусного вектора. Предпочтительно, модификацию фланкирующих последовательностей ДНК ORF2 PCV2 проводят, как описано выше, например, введением 5'-последовательности Козака и/или участка EcoR1, предпочтительно, как описано выше.

В дополнительном аспекте предоставлен способ получения и/или выделения
25 рекомбинантного белка, экспрессированного с открытой рамки считывания 2 PCV2. Способ, как правило, включает в себя стадии: i) клонирования рекомбинантной ORF2 PCV2 в вектор-переносчик; ii) трансфекции части вектора-переносчика, содержащей рекомбинантную ORF2 PCV2, в вирус; iii) инфекции клеток в среде трансфицированным вирусом; iv) обеспечения возможности экспрессии рекомбинантного белка с ORF2 PCV2
30 рекомбинантным вирусом; v) отделения клеток от супернатанта; и vi) выделения экспрессированного белка ORF2 PCV2 из супернатанта.

Способы клонирования рекомбинантной ДНК ORF2 PCV2 в вектор-переносчик описаны выше. Предпочтительно, вектор-переносчик содержит последовательность SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:7. Однако вектор-переносчик может содержать
35 любую ДНК ORF2 PCV2, немодифицированную или модифицированную, при условии, что ДНК ORF2 PCV2 при трансфекции в рекомбинантный вирусный вектор экспрессируется в культуре клеток. Предпочтительно, рекомбинантный вирусный вектор содержит последовательность SEQ ID NO:8. Более того, способы инфекции клеток, предпочтительно инфекции клеток насекомых определенным числом
40 рекомбинантных бакуловирусов, содержащих ДНК ORF2 PCV2 и экспрессирующих белок ORF2 PCV2, подробно описаны выше. Более того, стадии отделения клеток от супернатанта, так же как стадии выделения экспрессированного белка ORF2 PCV2, также подробно описаны выше. Любые из этих конкретных стадий способа, как описано здесь, являются частью способа получения и/или выделения рекомбинантного белка, экспрессированного с открытой рамки считывания 2 из PCV2, как описано выше.
45 Предпочтительно, клетки представляют собой клетки SF+. Еще более предпочтительно, культуры клеток обладают числом клеток приблизительно между $0,3-2,0 \times 10^6$ клеток/мл, более предпочтительно приблизительно между $0,35-1,9 \times 10^6$ клеток/мл, еще более

предпочтительно, приблизительно между $0,4-1,8 \times 10^6$ клеток/мл, даже более предпочтительно, приблизительно между $0,45-1,7 \times 10^6$ клеток/мл, и наиболее предпочтительно, приблизительно между $0,5-1,5 \times 10^6$ клеток/мл. Предпочтительно, рекомбинантный вирусный вектор, содержащий ДНК ORF2 PCV2, обладает 5 предпочтительной множественностью инфекции (MOI) приблизительно между 0,03-1,5, более предпочтительно, приблизительно между 0,05-1,3, еще более предпочтительно, приблизительно между 0,09-1,1, еще более предпочтительно, приблизительно между 0,1-1,0, и наиболее предпочтительно, приблизительно 0,5, при использовании для 10 инфекции чувствительных клеток. Предпочтительно выделение белка ORF2 PCV2 из супернатанта клеток, полученного между сутками 5 и 8 после инфекции, и/или при снижении жизнеспособности клеток до менее чем 10%. Предпочтительно, для получения белка ORF2 PCV2, клетки культивируют при 25-29°C. Предпочтительно, стадия 15 разделения представляет собой стадию центрифугирования или стадию фильтрации.

Необязательно, данный способ может включать в себя стадию амплификации ДНК ORF2 PCV2 из штамма PCV2 перед клонированием ДНК ORF2 PCV2 в вектор-переносчик. В предпочтительных формах к амплифицированной последовательности можно добавлять также 5'-последовательность Козака, 3'-участок EcoR1, и их сочетания, 20 предпочтительно, перед амплификацией или во время нее. Предпочтительная 5'-последовательность Козака содержит SEQ ID NO: 1. Предпочтительный 3'-участок EcoR1 содержит SEQ ID NO: 2. Предпочтительная ДНК ORF2 PCV2 содержит нуклеотидную последовательность с инвентарным номером в Genbank AF086834 (SEQ ID NO: 3) и SEQ ID NO: 4. Предпочтительный рекомбинантный белок ORF2 PCV2 25 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, которая представляет собой белок, кодируемый SEQ ID NO: 3 (Genbank Accession No. AF086834) и SEQ ID No: 6, которая представляет собой белок, кодируемый SEQ ID NO: 4. Предпочтительная среда содержит бессывороточную среду для клеток насекомых, еще более 30 предпочтительно, среду Excell 420. Когда проводят необязательную стадию амплификации, является предпочтительным сначала клонировать амплифицированную открытую рамку считывания 2 в первый вектор, вырезать открытую рамку считывания 2 из первого вектора, и использовать вырезанную открытую рамку считывания для 35 клонирования в вектор-переносчик. Предпочтительной линией клеток для котрансфекции является линия клеток SF+. Предпочтительным вирусом для котрансфекции является бакуловирус. В предпочтительной форме данного способа, трансфицированная часть вектора-переносчика содержит SEQ ID NO: 8. Наконец, для 40 данного способа является предпочтительным выделять белок с открытой рамки считывания 2 (ORF2) PCV2 из супернатанта культуры клеток по меньшей мере через 5 суток после инфекции клеток вирусом.

Таким образом, в дополнительном аспекте изобретение относится к способу 40 получения и/или выделения открытой рамки считывания 2 PCV2, включающем в себя стадии: i) амплификации ДНК ORF2 PCV2 *in vitro*, предпочтительно, посредством добавления 5'-последовательности Козака и/или добавлением 3'-участка рестрикции EcoR1, ii) клонирования амплифицированной ORF2 PCV2 в вектор-переносчик; iii) трансфекции части вектора-переносчика, содержащей рекомбинантную ORF2 PCV2, в 45 вирус; iv) инфекции клеток в среде трансфицированным вирусом; v) осуществления экспрессии трансфицированным вирусом рекомбинантного белка с ORF2 PCV2; vi) отделения клеток от супернатанта; и vii) выделения экспрессированного белка ORF2 PCV2 из супернатанта.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к способу получения композиции, содержащей белок ORF2 PCV2 и инактивированный вирусный вектор. Данный способ включает в себя стадии: i) клонирования амплифицированной ORF2 PCV2 в вектор-переносчик; ii) трансфекции части вектора-переносчика, содержащей рекомбинантную ORF2 PCV2, в вирус; iii) инфекции клеток в среде трансфицированным вирусным вектором; iv) осуществления экспрессии трансфицированным вирусом рекомбинантного белка с ORF2 PCV2; v) отделения клеток от супернатанта; vi) выделения экспрессированного белка ORF2 PCV2 из супернатанта; и vii) инактивации рекомбинантного вирусного вектора. Предпочтительно, рекомбинантный вирусный вектор представляет собой бакуловирус, содержащий кодирующие последовательности ДНК ORF2, и клетки представляют собой клетки SF+. Предпочтительными стадиями разделения являются описанные выше стадии, где наиболее предпочтительной является стадия фильтрации. Предпочтительными стадиями инактивации являются описанные выше стадии. Предпочтительно, инактивацию проводят приблизительно между 35-39°C и в присутствии 2-8 мМ BEI, еще более предпочтительно, в присутствии приблизительно 5 мМ BEI. Неожиданно обнаружили, что более высокие концентрации BEI отрицательно влияют на белок ORF2 PCV2, а более низкие концентрации являются неэффективными для инактивации вирусного вектора в пределах 24-72 часов инактивации. Предпочтительно, инактивацию проводят по меньшей мере 24 часа, даже более предпочтительно, от 24 до 72 часов.

В дополнительном аспекте способ получения композиции, содержащей белок ORF2 PCV2 и инактивированный вирусный вектор, как описано выше, включает в себя также стадию нейтрализации после стадии vii). Данная стадия viii) включает в себя добавление эквивалентного количества вещества, нейтрализующего инактивирующее вещество в растворе. Предпочтительно, если инактивирующим веществом является BEI, предпочтительным является добавление тиосульфата натрия до эквивалентного количества. Таким образом, по дополнительному аспекту, стадия viii) включает в себя добавление раствора тиосульфата натрия до конечной концентрации от приблизительно 1 до приблизительно 20 мМ, предпочтительно, от приблизительно 2 до приблизительно 10 мМ, еще более предпочтительно, от приблизительно 2 до приблизительно 8 мМ, еще более предпочтительно, от приблизительно 3 до приблизительно 7 мМ, наиболее предпочтительно, приблизительно 5 мМ, где инактивирующим веществом является BEI.

В дополнительном аспекте способ получения композиции, содержащей белок ORF2 PCV2 и инактивированный вирусный вектор, как описано выше, включает в себя перед стадией i) следующую стадию: амплификацию ДНК ORF2 PCV2 *in vitro*, где фланкирующие последовательности ДНК ORF2 PCV2 модифицируют, как описано выше. Способы амплификации ДНК ORF2 PCV2 и модификации фланкирующих последовательностей *in vitro*, клонирования *in vitro* амплифицированной ДНК ORF2 PCV2 в вектор-переносчик и подходящие векторы-переносчики описаны выше, в качестве примера показаны на фигуре 1, или известны специалистам в данной области. Таким образом, в дополнительном аспекте данный способ включает в себя стадии: i) амплификации ДНК ORF2 PCV2 *in vitro*, где фланкирующие последовательности указанной ДНК ORF2 PCV2 модифицируют, ii) клонирования амплифицированной ДНК ORF2 PCV2 в вектор-переносчик; и iii) трансфекции вектора-переносчика или его части, содержащей рекомбинантную ДНК ORF2 PCV2, в вирусный вектор для получения рекомбинантного вирусного вектора, iv) инфекции клеток в среде трансфицированным вирусом; v) осуществление экспрессии рекомбинантного белка ORF2 PCV2

трансфицированным вирусом; vi) отделения клеток от супернатанта; vii) выделения экспрессированного белка ORF2 PCV2 из супернатанта; viii) инактивации рекомбинантного вирусного вектора, предпочтительно, в присутствии от приблизительно 1 до приблизительно 20 мМ BEI, наиболее предпочтительно, в присутствии приблизительно 5 мМ BEI; и ix) добавления эквивалентного количества вещества, нейтрализующего инактивирующее вещество в растворе, предпочтительно, добавление раствора тиосульфата натрия до конечной концентрации от приблизительно 1 до приблизительно 20 мМ, предпочтительно приблизительно 5 мМ, если инактивирующее вещество представляет собой BEI.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу получения композиции, предпочтительно, антигенной композиции, например, такой как вакцина, чтобы вызывать иммунный ответ против PCV2. Как правило, данный способ включает в себя стадии трансфекции конструкции в вирус, где конструкция содержит i) рекомбинантную ДНК из ORF2 PCV2, ii) инфекции клеток в культуральной среде трансфицированным вирусом, iii) осуществления экспрессии рекомбинантного белка ORF2 PCV2 вирусом, iv) выделение экспрессированного белка ORF2 из супернатанта, v) и получения композиции посредством объединения выделенного белка с подходящим адьювантом и/или другим фармацевтически приемлемым носителем.

«Адьюванты», как применяют здесь, могут включать в себя гидроксид алюминия и фосфат алюминия, сапонины, например, Quil A, QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA), GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, AL), эмульсию типа «вода в масле», эмульсию типа «масло в воде», эмульсию типа «вода в масле в воде». Эмульсия может являться основанной, в частности, на светлом жидком вазелиновом масле (стандарт Европейской Фармакопеи); изопреноидном масле, таком как сквалан или сквален; масле, полученном после олигомеризации алкенов, в частности, изобутена или децена; сложных эфирах кислот или спиртов, содержащих линейную алкильную группу, более конкретно, растительных маслах, этилолеате, ди-(каприлат/капрате) пропиленгликоля, три-(каприлат/капрате) глицерил или диолеате пропиленгликоля; сложных эфирах разветвленных жирных кислот или спиртов, в частности, сложных эфирах изостеариновой кислоты. Для получения эмульсии масло используют в сочетании с эмульгаторами. Эмульгаторы предпочтительно представляют собой неионные сурфактанты, в частности, сложные эфиры сорбитана, маннида (например, олеат ангидроманнита), гликоля, полиглицерина, пропиленгликоля и масляной, изостеариновой, рицинолевой или гидроксистеариновой кислоты, которые являются, необязательно, этоксилированными, и блок-сополимеры полиоксипропилена-полиоксиэтилена, в частности, продукты плуроник, особенно L121. См. Hunter et al., *The Theory and Practical Application of Adjuvants* (Ed. Stewart-Tull, D. E. S.). John Wiley and Sons, NY, pp51-94 (1995) и Todd et al., *Vaccine* 15:564-570 (1997).

Например, можно использовать эмульсию SPT, описанную на странице 147 "Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach" edited by M. Powell and M. Newman, Plenum Press, 1995, и эмульсию MF59, описанную на странице 183 той же книги.

Дополнительным примером адьюванта является соединение, выбранное из полимеров акриловой или метакриловой кислоты и сополимеров малеинового ангидрида и производного алкенила. Предпочтительными адьювантными соединениями являются полимеры акриловой или метакриловой кислоты, являющиеся перекрестно сшитыми, особенно со сложными эфирами полиалкенила с сахарами или полиспиртами. Эти соединения известны под термином карбомер (Pharmeuropa Vol. 8, No. 2, June 1996). Специалисты в данной области могут обратиться также к патенту США №. 2909462,

где описаны такие акриловые полимеры, перекрестно сшитые с полигидроксильированным соединением, обладающим по меньшей мере 3 гидроксильными группами, предпочтительно, не более чем 8, где атомы водорода по меньшей мере трех гидроксильных замещены ненасыщенными алифатическими радикалами, обладающими по меньшей мере 2 атомами углерода. Предпочтительными радикалами являются радикалы, содержащие от 2 до 4 атомов углерода, например винилы, аллилы и другие ненасыщенные по этилену группы. Ненасыщенные радикалы сами могут содержать другие заместители, такие как метил. В частности, пригодны продукты, продаваемые под наименованием карбопол; (BF Goodrich, Ohio, USA). Они являются перекрестно-сшитыми с аллилсахарозой или с аллилпентаэритритолом. Среди них можно упомянуть карбопол 974P, 934P и 971P. Наиболее предпочтительным является применение карбопола 971P. Среди сополимеров малеинового ангидрида и производного алкенила - сополимеров ЕМА (Monsanto), которые являются сополимерами малеинового ангидрида и этилена. Растворением этих полимеров в воде получают кислый раствор, который нейтрализуют, предпочтительно, до физиологического рН, чтобы получить раствор адьюванта, в который можно ввести собственно иммуногенную, иммунологическую или вакцинную композицию.

Дополнительные пригодные адьюванты включают в себя в качестве неограничивающих примеров среди многих других адьювантную систему RIBI (Ribi Inc.), блок-сополимер (CytRx, Atlanta GA), SAF-M (Chiron, Emeryville CA), монофосфорил липид А, липидно-аминный адьювант авридин, термолабильный энтеротоксин из *E.coli* (рекомбинантный или другой), холерный экзотоксин, IMS 1314 или мурамил-дипептид.

Предпочтительно, адьювант добавляют в количестве от приблизительно 100 мкг до приблизительно 10 мг на дозу. Даже более предпочтительно, адьювант добавляют в количестве от приблизительно 100 мкг до приблизительно 10 мг на дозу. Даже более предпочтительно, адьювант добавляют в количестве от приблизительно 500 мкг до приблизительно 5 мг на дозу. Даже более предпочтительно, адьювант добавляют в количестве от приблизительно 750 мкг до приблизительно 2,5 мг на дозу. Наиболее предпочтительно, адьювант добавляют в количестве приблизительно 1 мг на дозу.

Таким образом, в дополнительном аспекте способ получения антигенной композиции, например, такой как вакцина, для вызова иммунного ответа против PCV2, включает в себя i) получение и выделение белка ORF2 PCV2, и ii) смешивание его с подходящим адьювантом. Предпочтительно, адьювант представляет собой карбопол 971P. Даже более предпочтительно, карбопол 971 P добавляют в количестве от приблизительно 500 мкг до приблизительно 5 мг на дозу, даже более предпочтительно, в количестве от приблизительно 750 мкг до приблизительно 2,5 мг на дозу и наиболее предпочтительно, в количестве приблизительно 1 мг на дозу. Предпочтительно, стадия способа i) включает в себя стадию способа, как описано для получения и выделения ORF2 PCV2. Например, в предпочтительных формах данного способа, конструкцию, содержащую ДНК ORF2 PCV2, получают в векторе-переносчике. Подходящие векторы-переносчики и способы их получения описаны выше. Необязательно, способ может включать в стадию амплификации ORF2 из штамма PCV2 посредством PCR перед клонированием ORF2 в вектор-переносчик. Предпочтительная открытая рамка считывания последовательности, последовательности Козака, последовательности 3'-участка EcoR1, последовательности рекомбинантного белка, последовательности трансфицированных конструкций, среда, клетки и вирусы являются такими, как описаны в предыдущих способах. Другая необязательная стадия данного способа включает в себя клонирование амплифицированной ДНК ORF2 PCV2 в первый вектор, вырезание ДНК ORF2 из

первого вектора и использование данной вырезанной ДНК PCV2 ORF2 для клонирования в векторе-переносчике. Как и в случае других способов, является предпочтительным ожидать по меньшей мере 5 суток после инфекции клеток трансфицированным бакуловирусом перед выделением рекомбинантного белка ORF2 из супернатанта. Предпочтительно, стадия выделения по данному способу включает в себя также стадию отделения среды от клеток и клеточного дебриса. Это можно осуществлять множеством способов, однако для простоты и удобства, предпочтительно фильтровать клетки, клеточный дебрис и культуральную среду через фильтр с размером пор в диапазоне от приблизительно 0,45 мкм до приблизительно 1,0 мкм. Наконец, для этого способа, является предпочтительным включать стадию инактивации вируса перед объединением выделенного рекомбинантного белка ORF2 PCV2 в композицию. Это можно осуществить множеством способов, однако в осуществлении настоящего изобретения на практике предпочтительно применять BEI.

Таким образом, в дополнительном аспекте данный способ включает в себя стадии:

- i) амплификации ДНК ORF2 PCV2 *in vitro*, где фланкирующие последовательности указанной ДНК ORF2 PCV2 модифицируют, ii) клонирования амплифицированной ДНК ORF2 PCV2 в вектор-переносчик; и iii) трансфекции вектора-переносчика или его части, содержащей рекомбинантную ДНК ORF2 PCV2, в вирусный вектор для получения рекомбинантного вирусного вектора, iv) инфекции клеток в среде трансфицированным вектором; v) осуществление экспрессии рекомбинантного белка с ORF2 PCV2 трансфицированным вирусом; vi) отделения клеток от супернатанта; vii) выделения экспрессированного белка ORF2 PCV2 из супернатанта; viii) инактивации рекомбинантного вирусного вектора, предпочтительно, в присутствии от приблизительно 1 до приблизительно 20 мМ BEI, наиболее предпочтительно, в присутствии приблизительно 5 мМ BEI; ix) добавления эквивалентного количества вещества, нейтрализующего инактивирующее вещество в растворе, предпочтительно, добавление раствора тиосульфата натрия до конечной концентрации от приблизительно 1 до приблизительно 20 мМ, предпочтительно приблизительно 5 мМ, если инактивирующее вещество представляет собой BEI, и x) добавления подходящего количества адьюванта, предпочтительно, добавление карбопола, более предпочтительно, карбопола 971P, даже более предпочтительно, в количествах, как описано выше (например, от приблизительно 500 мкг до приблизительно 5 мг на дозу, даже более предпочтительно, в количестве от приблизительно 750 мкг до приблизительно 2,5 мг на дозу и наиболее предпочтительно, в количестве приблизительно 1 мг на дозу).

Кроме того, композиция может включать в себя один или несколько фармацевтических приемлемых носителей. Как применяют здесь, «фармацевтический приемлемый носитель» включает в себя все без исключения растворители, диспергенты, покрытия, стабилизаторы, разбавители, консерванты, антибактериальные и антигрибковые вещества, изотонические средства, задерживающие поглощение средства и т.п. Наиболее предпочтительно, композиция, предоставленная здесь, содержит белок ORF2 PCV2, выделенный из супернатанта культивированных *in vitro* клеток, где указанные клетки инфицируют рекомбинантным вирусным вектором, содержащим ДНК ORF2 PCV2 и экспрессирующим белок ORF2 PCV2, и где указанную культуру клеток обрабатывают от приблизительно 2 до приблизительно 8 мМ BEI, предпочтительно, приблизительно 5 мМ BEI для инактивации вирусного вектора, и эквивалентной концентрацией нейтрализующего вещества, предпочтительно, раствором тиосульфата натрия до конечной концентрации от приблизительно 2 до приблизительно

8 мМ, предпочтительно приблизительно 5 мМ, карбополом, более предпочтительно, карбополом 971Р, предпочтительно, в количествах от приблизительно 500 мкг до приблизительно 5 мг на дозу, даже более предпочтительно, в количествах от приблизительно 750 мкг до приблизительно 2,5 мг на дозу и наиболее предпочтительно, в количестве приблизительно 1 мг на дозу, и физиологическим раствором, предпочтительно, в количестве от приблизительно 50 до приблизительно 90% (об./об.), более предпочтительно, приблизительно между 60-80% (об./об.), еще более предпочтительно, приблизительно 70% (об./об.).

Таким образом, дополнительный аспект относится к способу получения антигенной композиции, например, такой как вакцина, чтобы вызывать иммунный ответ против PCV2, включающему в себя стадии: i) амплификации ДНК ORF2 PCV2 *in vitro*, где фланкирующие последовательности указанной ДНК ORF2 PCV2 модифицируют, ii) клонирования амплифицированной ДНК ORF2 PCV2 в вектор-переносчик; и iii) трансфекции вектора-переносчика или его части, содержащей рекомбинантную ДНК ORF2 PCV2, в вирусный вектор для получения рекомбинантного вирусного вектора, iv) инфекции клеток в среде трансфицированным вирусом; v) осуществления экспрессии рекомбинантного белка с ORF2 PCV2 трансфицированным вирусом; vi) отделения клеток от супернатанта; vii) выделения экспрессированного белка ORF2 PCV2 из супернатанта; viii) инактивации рекомбинантного вирусного вектора, предпочтительно, в присутствии от приблизительно 1 до приблизительно 20 мМ BEI, наиболее предпочтительно, в присутствии приблизительно 5 мМ BEI; ix) добавления эквивалентного количества вещества, нейтрализующего инактивирующее вещество в растворе, предпочтительно, добавление раствора тиосульфата натрия до конечной концентрации от приблизительно 1 до приблизительно 20 мМ, предпочтительно, приблизительно 5 мМ, если инактивирующее вещество представляет собой BEI, x) добавления подходящего количества адъювантов, предпочтительно, добавления карбопола, более предпочтительно, карбопола 971Р, еще более предпочтительно, в количествах, как описано выше (например, от приблизительно 500 мкг до приблизительно 5 мг на дозу, даже более предпочтительно, в количестве от приблизительно 750 мкг до приблизительно 2,5 мг на дозу и наиболее предпочтительно, в количестве приблизительно 1 мг на дозу); и xi) добавления физиологического раствора, предпочтительно, в количестве от приблизительно 50 до приблизительно 90% (об./об.), более предпочтительно, приблизительно между 60-80% (об./об.), еще более предпочтительно, приблизительно 70% (об./об.). Необязательно, данный способ может также включать в себя добавление стабилизатора. Стабилизатор, как применяют здесь, относится к противомикробному активному средству, например, такому как гентамицин, мертиолат и т.п. В частности, добавление стабилизатора является наиболее предпочтительным для получения композиции для множественных доз. Эти противомикробные активные средства добавляют в концентрациях, эффективных для предотвращения какой-либо микробиологической контаминации интересующей композиции или для ингибирования какого-либо микробиологического роста в интересующей композиции.

Более того, данный способ может включать в себя также добавление любого стабилизатора, например, такого как сахараиды, трегалоза, маннит, сахароза и т.п., для увеличения и/или поддержания срока хранения. Однако неожиданно обнаружили, что полученный состав является иммунологически эффективным в течение периода по меньшей мере 24 месяца без добавления какого-либо дополнительного стабилизатора.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к продуктам,

полученным способами, описанными выше. В частности, настоящее изобретение относится к композиции, содержащей экспрессированный рекомбинантным способом белок ORF2 PCV2. Более того, настоящее изобретение также относится к композиции, содержащей экспрессированный рекомбинантным способом белок ORF2 PCV2, выделенный из супернатанта культуры клеток насекомых. Более того, настоящее изобретение также относится к композиции, содержащей экспрессированный рекомбинантным способом белок ORF2 PCV2, выделенный из супернатанта культуры клеток насекомых. Предпочтительно, эта композиция содержит также средство для инактивации вирусных векторов. Предпочтительно, указанное средство для инактивации представляет собой ВЕ1. Более того, настоящее изобретение также относится к композиции, содержащей экспрессированный рекомбинантным способом белок ORF2 PCV2, выделенный из супернатанта культуры клеток насекомых, и содержащей средство, пригодное для инактивации вирусных векторов, предпочтительно, ВЕ1 и нейтрализующее средство для нейтрализации инактивирующего средства. Предпочтительно, это нейтрализующее средство представляет собой тиосульфат натрия при использовании ВЕ1 в качестве инактивирующего средства.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к иммуногенной композиции, вызывающей иммунный ответ и, более предпочтительно, обеспечивает защитный иммунитет против клинических признаков инфекции PCV2. Композиция, как правило, содержит полипептид или его фрагмент, экспрессированный с открытой рамки считывания 2 (ORF2) из PCV2 в качестве антигенного компонента композиции.

ДНК и белок ORF2 PCV2, как применяют здесь для получения композиции, а также как применяют в способах, представленных здесь, представляет собой высококонсервативный домен в изолятах PCV2 и вследствие этого, любая ORF2 PCV2 будет эффективной в качестве источника ДНК и/или полипептида ORF2 PCV, как применяют здесь. Предпочтительным белком ORF2 PCV2 является белок SEQ ID NO. 11. Предпочтительный полипептид PCV ORF2 представлен здесь как SEQ ID NO. 5, однако специалистам в данной области понятно, что эта последовательность может меняться настолько сильно, как на 6-10% гомологии последовательности, и еще сохранять антигенные характеристики, делающие ее применимой в иммуногенной композиции. Антигенные характеристики иммунологической композиции можно, например, определить посредством эксперимента заражения, как представлено в примере 4. Более того, антигенные характеристики модифицированного антигена еще сохраняются, когда модифицированный антиген обеспечивает по меньшей мере 70%, предпочтительно, 80%, более предпочтительно, 90% защитного иммунитета по сравнению с белком ORF2 PCV2, кодируемым полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:4. «Иммуногенная композиция», как применяют здесь, обозначает белок ORF2 PCV2, который вызывает у хозяина «иммунологический ответ» из клеточного и/или опосредованного антителом иммунного ответа на белок ORF2 PCV2. Предпочтительно, данная иммуногенная композиция способна обеспечивать защитный иммунитет против инфекции PCV2 и связанных с ней клинических признаков. В некоторых формах иммуногенные части белка ORF2 PCV2 применяют в качестве антигенного компонента композиции. Термин «иммуногенная часть», как применяют здесь, относится к усеченным и/или замещенным формам или фрагментам белка ORF2 PCV2 и/или полинуклеотида, соответственно. Предпочтительно, такие усеченные и/или замещенные формы, или фрагменты содержат по меньшей мере 6 непрерывных аминокислот из полноразмерного полипептида ORF2. Более предпочтительно, усеченные или замещенные формы, или фрагменты будут обладать по меньшей мере 10, более

предпочтительно, по меньшей мере 15, и еще более предпочтительно, по меньшей мере 19 непрерывными аминокислотами из полноразмерного полипептида ORF2. Две предпочтительные в этом отношении последовательности представлены здесь как SEQ ID NO. 9 и 10. Кроме того, понятно, что такие последовательности могут являться частью более крупных фрагментов или усеченных форм. Дополнительный предпочтительный полипептид ORF2 PCV2, представленный здесь, кодируют нуклеотидные последовательности SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4. Однако специалистам в данной области понятно, что данная последовательность может меняться так сильно, как на 6-20% гомологии последовательности, и еще сохранять антигенные характеристики, применимые в иммуногенной композиции. В некоторых формах усеченную или замещенную форму, или фрагмент ORF2 используют в качестве антигенного компонента композиции. Предпочтительно, такие усеченные или замещенные формы, или фрагменты будут содержать по меньшей мере 18 непрерывных нуклеотидов из полноразмерной нуклеотидной последовательности ORF2, например, SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4. Более предпочтительно, усеченные или замещенные формы, или фрагменты будут обладать по меньшей мере 30, более предпочтительно, по меньшей мере 45, и еще более предпочтительно, по меньшей мере 57 непрерывными нуклеотидами полноразмерной нуклеотидной последовательности ORF2, например, SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4.

«Идентичность последовательности», как известно в данной области, относится к связи между двумя или несколькими полипептидными последовательностями или двумя или несколькими полинуклеотидными последовательностями, а именно, контрольной последовательностью и данной последовательностью, подлежащей сравнению с контрольной последовательностью. Идентичность последовательности определяют сравнением данной последовательности с контрольной последовательностью после оптимального выравнивания последовательностей для получения наивысшей степени сходства последовательностей, как определено посредством совпадения между нитями таких последовательностей. При таком выравнивании идентичность последовательности устанавливают на основании положения за положением, например, последовательности являются «идентичными» в конкретном положении, если в этом положении нуклеотиды или аминокислотные остатки являются идентичными. Затем общее число таких идентичных положений делят на общее число нуклеотидов или остатков в контрольной последовательности для получения % идентичности последовательности. Идентичность последовательности можно легко вычислить известными способами, включая, в качестве неограничивающих примеров, способы, описанные в Computational Molecular Biology, Lesk, A. N., ed., Oxford University Press, New York (1988), Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York (1993); Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heine, G., Academic Press (1987); Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York (1991); and Carillo, H., and Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988), содержание которых приведено здесь в качестве ссылки. Предпочтительные способы определения идентичности последовательности разработаны для получения наибольшего совпадения между тестируемыми последовательностями. Способы определения идентичности последовательности закодированы в публично доступных компьютерных программах, определяющих идентичность последовательности между данными последовательностями. Примеры таких программ включают в себя в качестве неограничивающих примеров пакет программ GCG (Devereux, J., et al., Nucleic acids

Research, 12(1):387 (1984)), BLASTP, BLASTN и FASTA (Altschul, S. F. et al., J. Molec. Biol., 215:403-410 (1990)). Программа BLASTX является публично доступной из NCBI и других источников (BLAST Manual, Altschul, S. et al., NCVI NLM NIH Bethesda, MD 20894, Altschul, S. F. et al., J. Molec. Biol., 215:403-410 (1990), содержание которых приведено здесь в качестве ссылки). Эти программы оптимально выравнивают последовательности с использованием весов пропусков по умолчанию для получения наивысшего уровня идентичности последовательности между данной и контрольной последовательностью. В качестве иллюстрации, под полинуклеотидом с нуклеотидной последовательностью, обладающей, например, по меньшей мере, 85%, предпочтительно, 90%, даже более предпочтительно, 95% «идентичностью последовательности» с контрольной нуклеотидной последовательностью, понимают, что нуклеотидная последовательность данного полинуклеотида является идентичной с контрольной последовательностью, за исключением того, что последовательность данного полинуклеотида может содержать вплоть до 15, предпочтительно, вплоть до 10, даже более предпочтительно, вплоть до 5 точечных мутаций на каждые 100 нуклеотидов контрольной нуклеотидной последовательности. Другими словами, в полинуклеотиде с нуклеотидной последовательностью, обладающей по меньшей мере 85%, предпочтительно, 90%, даже более предпочтительно, 95% идентичностью относительно контрольной нуклеотидной последовательности, вплоть до 15%, предпочтительно 10%, даже более предпочтительно, 5% нуклеотидов в контрольной последовательности можно делетировать или заменить другими нуклеотидами, или число нуклеотидов вплоть до 15%, предпочтительно, 10%, даже более предпочтительно, 5% из всех нуклеотидов в контрольной последовательности можно вставить в контрольную последовательность. Эти мутации в контрольной последовательности могут присутствовать в 5'- или 3'-концевых положениях контрольной нуклеотидной последовательности, или в любом месте между этими концевыми положениями, распределяясь либо по отдельности среди нуклеотидов в контрольной последовательности, либо в одной или нескольких непрерывных группах в контрольной последовательности. Аналогично, под полипептидом с данной аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере, например, 85%, предпочтительно, 90%, даже более предпочтительно, 95% идентичностью последовательности с контрольной аминокислотной последовательностью, понимают, что данная аминокислотная последовательность полипептида является идентичной контрольной последовательности, за исключением того, что данная последовательность полипептида может содержать вплоть до 15, предпочтительно вплоть до 10, даже более предпочтительно, вплоть до 5 аминокислотных замен на каждые 100 аминокислот контрольной аминокислотной последовательности. Другими словами, для получения данной полипептидной последовательности, обладающей по меньшей мере 85%, предпочтительно, 90%, даже более предпочтительно, 95% идентичностью последовательности с контрольной аминокислотной последовательностью, вплоть до 15%, предпочтительно, вплоть до 10%, даже более предпочтительно, вплоть до 5% аминокислотных остатков в контрольной последовательности можно делетировать или заместить другими аминокислотами, или число аминокислот, вплоть до 15%, предпочтительно, вплоть до 10%, даже более предпочтительно, вплоть до 5% общего числа аминокислотных остатков в контрольной последовательности можно вставить в контрольную последовательность. Эти изменения в контрольной последовательности могут присутствовать в N- или C-концевых положениях контрольной аминокислотной последовательности или в любом месте между этими концевыми положениями, распределяясь либо по отдельности среди остатков в контрольной последовательности,

либо в одной или нескольких непрерывных группах в контрольной последовательности. Предпочтительно, положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами. Однако, консервативные замены не включают в совпадения при определении идентичности последовательности.

5 «Гомология последовательности», как применяют здесь, относится к способу определения родства двух последовательностей. Для определения гомологии последовательности две или более последовательности оптимально выравнивают, и, если необходимо, вносят пропуски. Однако, в отличие от «идентичности последовательности», консервативные аминокислотные замены считают совпадениями
10 при определении гомологии последовательности. Другими словами, чтобы получить полипептид или полинуклеотид, обладающий 95% гомологией последовательности с контрольной последовательностью, 85%, предпочтительно 90%, даже более предпочтительно 95% аминокислотных остатков или нуклеотидов в контрольной последовательности должно совпадать с другой аминокислотой или нуклеотидом или
15 содержать консервативные замены, или число аминокислот или нуклеотидов вплоть до 15%, предпочтительно вплоть до 10%, даже более предпочтительно, вплоть до 5% от общего числа аминокислотных остатков или нуклеотидов в контрольной последовательности, не включая консервативные замены, можно вставить в контрольную последовательность. Предпочтительно, гомологичная последовательность
20 содержит по меньшей мере отрезок из 50, даже более предпочтительно, из 100, даже более предпочтительно, из 250, даже более предпочтительно, из 500 нуклеотидов.

«Консервативная замена» обозначает замену аминокислотного остатка или нуклеотида другим аминокислотным остатком или нуклеотидом, обладающим сходными характеристиками или свойствами, включая размер, гидрофобность, и т.д., так что
25 общая функциональность существенно не меняется.

«Выделенный» означает измененный «рукой человека» по сравнению с природным состоянием, т.е., если он существует в природе, его изменили, или удалили из его природного окружения, или и то, и другое. Например, полинуклеотид или полипептид, естественно присутствующий в живом организме, не является «выделенным», однако
30 тот же самый полинуклеотид или полипептид, отделенный от веществ, сосуществующих с ним в его природном состоянии, является «выделенным», как термин применяют здесь.

Таким образом, в дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к иммуногенной композиции, эффективной для уменьшения тяжести клинических
35 симптомов, связанных с инфекцией PCV2, содержащей белок ORF2 PCV2.

Предпочтительно, белок ORF2 PCV2 представляет собой один из белков, описанных выше. Предпочтительно, указанный белок ORF2 PCV2 представляет собой

- i) полипептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11;
- 40 ii) любой полипептид, по меньшей мере на 80% гомологичный полипептиду из i);
- iii) любую иммуногенную часть полипептидов из i) и/или ii);
- iv) иммуногенную часть из iii), содержащую по меньшей мере 10 непрерывных аминокислот, входящих в последовательности SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11;
- 45 v) полипептид, кодированный ДНК, содержащей последовательность из SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4;
- vi) любой полипептид, кодированный полинуклеотидом, по меньшей мере на 80% гомологичным полинуклеотиду из v);

vii) любую иммуногенную часть полипептидов, кодируемых полинуклеотидом из v) и/или vi);

viii) иммуногенную часть из vii), где полинуклеотид, кодирующий указанную иммуногенную часть, содержит по меньшей мере 30 непрерывных нуклеотидов, входящих в последовательности SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4.

Предпочтительно, любая из этих иммуногенных частей обладает иммуногенными характеристиками белка ORF2 PCV2, кодируемого последовательностью SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4.

В дополнительном аспекте белок ORF2 PCV2 представлен в иммунологической композиции на уровне содержания антигена, эффективного для индукции желаемого иммунного ответа, а именно, уменьшения частоты возникновения или уменьшения тяжести клинических признаков, вызванных инфекцией PCV2. Предпочтительно уровень содержания белка ORF2 PCV2 составляет по меньшей мере 0,2 мкг антигена/мл конечной иммуногенной композиции (мкг/мл), более предпочтительно, от приблизительно 0,2 до приблизительно 400 мкг/мл, еще более предпочтительно, от приблизительно 0,3 до приблизительно 200 мкг/мл, даже более предпочтительно, от приблизительно 0,35 до приблизительно 100 мкг/мл, еще более предпочтительно, от приблизительно 0,4 до приблизительно 50 мкг/мл, еще более предпочтительно, от приблизительно 0,45 до приблизительно 30 мкг/мл, еще более предпочтительно, от приблизительно 0,6 до приблизительно 15 мкг/мл, даже более предпочтительно, от приблизительно 0,75 до приблизительно 8 мкг/мл, даже более предпочтительно, от приблизительно 1,0 до приблизительно 6 мкг/мл, еще более предпочтительно, от приблизительно 1,3 до приблизительно 3,0 мкг/мл, даже более предпочтительно, от приблизительно 1,4 до приблизительно 2,5 мкг/мл, даже более предпочтительно, от приблизительно 1,5 до приблизительно 2,0 мкг/мл, и наиболее предпочтительно, приблизительно 1,6 мкг/мл.

В дополнительном аспекте уровень содержания антигена ORF2 составляет по меньшей мере 0,2 мкг белка ORF2 PCV2, как описано выше, на дозу конечной антигенной композиции (мкг/дозу), более предпочтительно, от приблизительно 0,2 до приблизительно 400 мкг/дозу, еще более предпочтительно, от приблизительно 0,3 до приблизительно 200 мкг/дозу, даже более предпочтительно от приблизительно 0,35 до приблизительно 100 мкг/дозу, еще более предпочтительно от приблизительно 0,4 до приблизительно 50 мкг/дозу, еще более предпочтительно от приблизительно 0,45 до приблизительно 30 мкг/дозу, еще более предпочтительно от приблизительно 0,6 до приблизительно 15 мкг/дозу, даже более предпочтительно, от приблизительно 0,75 до приблизительно 8 мкг/дозу, даже более предпочтительно, от приблизительно 1,0 до приблизительно 6 мкг/дозу, еще более предпочтительно, от приблизительно 1,3 до приблизительно 3,0 мкг/дозу, даже более предпочтительно, от приблизительно 1,4 до приблизительно 2,5 мкг/дозу, даже более предпочтительно, от приблизительно 1,5 до приблизительно 2,0 мкг/дозу, и наиболее предпочтительно, приблизительно 1,6 мкг/ дозу.

Полипептид ORF2 PCV2, применяемый в иммуногенной композиции по настоящему изобретению, можно получить любым способом, включая выделение и очистку ORF2 PCV2, общепринятый синтез белка и рекомбинантные способы. Предпочтительные способы получения полипептида ORF2 PCV2 описаны в этом документе выше и представлены также в патентной заявке США серийный №. 11/034797, объяснения и содержание которой приведены здесь в качестве ссылки. Кратко, чувствительные клетки инфицируют рекомбинантным вирусным вектором, содержащим кодирующие последовательности ДНК ORF2 PCV2, полипептид ORF2 PCV2 экспрессируют

посредством рекомбинантного вируса, экспрессированный полипептид ORF2 PCV2 выделяют из супернатанта фильтрацией и инактивируют любым общепринятым способом, предпочтительно с использованием бинарного этиленмина, который затем нейтрализуют для остановки процесса инактивации.

5 Таким образом, в дополнительном аспекте иммуногенная композиция содержит i) любой из описанных выше белков ORF2 PCV2, предпочтительно в концентрациях, описанных выше, и ii) по меньшей мере часть вирусного вектора, экспрессирующую указанный белок ORF2 PCV2, предпочтительно рекомбинантного бакуловируса. Более того, в дополнительном аспекте иммуногенная композиция содержит i) любой из
10 описанных выше белков ORF2 PCV2, предпочтительно в концентрациях, описанных выше, ii) по меньшей мере часть вирусного вектора, экспрессирующую указанный белок ORF2 PCV2, предпочтительно, рекомбинантного бакуловируса, и iii) часть супернатанта культуры клеток.

В конкретном варианте осуществления способа получения и выделения белка ORF2
15 PCV2, супернатант культуры клеток фильтруют через мембрану с размером пор предпочтительно приблизительно между 0,45-1 мкм. Таким образом, дополнительный аспект относится к иммуногенной композиции, содержащей i) любой из описанных выше белков ORF2 PCV2, предпочтительно в концентрациях, описанных выше, ii) по
20 меньшей мере часть вирусного вектора, экспрессирующую указанный белок ORF2 PCV2, предпочтительно рекомбинантного бакуловируса, и iii) часть культуры клеток; где приблизительно 90% компонентов обладают размером менее 1 мкм.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к иммуногенной композиции, содержащей i) любой из описанных выше белков ORF2 PCV2, предпочтительно в концентрациях, описанных выше, ii) по меньшей мере часть вирусного
25 вектора, экспрессирующую указанный белок ORF2 PCV2, iii) часть культуры клеток, iv) и инактивирующее средство для инактивации рекомбинантного вирусного вектора, предпочтительно, BEI, где приблизительно 90% компонентов i)-iii) обладают размером менее 1 мкм. Предпочтительно, BEI присутствует в концентрациях, эффективных для инактивации бакуловируса. Эффективные концентрации описаны выше.

30 В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к иммуногенной композиции, содержащей i) любой из описанных выше белков ORF2 PCV2, предпочтительно в концентрациях, описанных выше, ii) по меньшей мере часть вирусного вектора, экспрессирующую указанный белок ORF2 PCV2, iii) часть культуры клеток, iv)
35 инактивирующее средство для инактивации рекомбинантного вирусного вектора, предпочтительно, BEI, и v) нейтрализующее средство для остановки инактивации, опосредованной инактивирующим средством, где приблизительно 90% компонентов i)-iii) обладают размером менее 1 мкм. Предпочтительно, если инактивирующее средство представляет собой BEI, указанная композиция содержит тиосульфат натрия в эквивалентных BEI количествах.

40 Полипептид вводят в композицию, которую можно ввести животному, чувствительному к инфекции PCV2. В предпочтительных формах композиция может содержать также дополнительные компоненты, известные специалистам в данной области (смотри также Remington's Pharmaceutical Sciences. (1990). 18th ed. Mack Publ., Easton). Кроме того, композиция может содержать один или несколько приемлемых в
45 ветеринарии носителей. Как применяют здесь, «приемлемый в ветеринарии носитель» включает в себя все без исключения растворители, диспергенты, покрытия, адъюванты, стабилизаторы, разбавители, консерванты, антибактериальные и антигрибковые вещества, изотонические средства, задерживающие поглощение средства и т.п.

В предпочтительном варианте осуществления иммуногенная композиция содержит белок ORF2 PCV2, как приведено здесь, предпочтительно в концентрациях, описанных выше, в качестве антигенного компонента, который смешивают с адьювантом, предпочтительно карбополом, и физиологическим раствором.

5 Специалистам в данной области будет понятно, что композиция здесь может содержать известные подходящие для инъекции физиологически приемлемые стерильные растворы. Для получения готового к употреблению раствора для парентеральной
10 инъекции или вливания легко доступны водные изотонические растворы, например, такие как солевой раствор или растворы соответствующего белка плазмы. Кроме того, иммуногенные и вакцинные композиции по настоящему изобретению могут содержать растворители, изотонические средства, стабилизаторы или адьюванты. Растворители могут включать в себя воду, солевой раствор, глюкозу, этанол, глицерин, и т.п. Изотонические средства могут включать в себя, среди прочих, хлорид натрия, глюкозу, маннит, сорбит и лактозу. Стабилизаторы включают в себя, среди прочих, альбумин
15 и соли щелочного металла и этилендиаминтетрауксусной кислоты. Подходящими адьювантами являются описанные здесь. Наиболее предпочтительным является применение карбопола, в частности, применение карбопола 971P, предпочтительно в количествах, как описано выше (например, от приблизительно 500 мкг до приблизительно 5 мг на дозу, даже более предпочтительно, в количестве от
20 приблизительно 750 мкг до приблизительно 2,5 мг на дозу и наиболее предпочтительно в количестве приблизительно 1 мг на дозу).

Таким образом, настоящее изобретение также относится к иммуногенной композиции, содержащей i) любой из описанных выше белков ORF2 PCV2, предпочтительно в
25 концентрациях, описанных выше, ii) по меньшей мере часть вирусного вектора, экспрессирующую указанный белок ORF2 PCV2, iii) часть культуры клеток, iv) инактивирующее средство для инактивации рекомбинантного вирусного вектора, предпочтительно, BEI, и v) нейтрализующее средство для остановки инактивации, опосредованной инактивирующим средством, предпочтительно тиосульфат натрия в количествах, эквивалентных количествам BEI; и vi) подходящий адьювант,
30 предпочтительно карбопол 971 в описанных выше количествах; где приблизительно 90% компонентов i)-iii) обладают размером менее 1 мкм. В дополнительном аспекте, данная иммуногенная композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемую соль, предпочтительно соль фосфата в физиологически приемлемой концентрации. Предпочтительно, pH указанной иммуногенной композиции доводят до
35 физиологического pH, что означает приблизительно между 6,5 и 7,5.

Таким образом, настоящее изобретение также относится к иммуногенной композиции, содержащей на один мл i) по меньшей мере 1,6 мкг описанного выше белка ORF2 PCV2,
40 ii) по меньшей мере часть бакуловируса, экспрессирующую указанный белок ORF2 PCV2, iii) часть культуры клеток, iv) приблизительно 2-8 мМ BEI, v) тиосульфат натрия в количествах, эквивалентных количествам BEI; и vi) приблизительно 1 мг карбопола 971, и vii) соль фосфата в физиологически приемлемой концентрации; где приблизительно 90% компонентов i)-iii) обладают размером менее 1 мкм, и pH указанной иммуногенной композиции доводят до приблизительно 6,5-7,5.

Иммуногенные композиции могут дополнительно содержать одно или несколько
45 других иммуномодулирующих веществ, например, таких как интерлейкины, интерфероны или другие цитокины. Иммуногенные композиции могут содержать также гентамицин и мертиолат. В то время как специалист в данной области может легко определить количества и концентрации адьювантов и добавок, применимых в контексте

настоящего изобретения, настоящее изобретение относится к композициям, содержащим от приблизительно 50 мкг до приблизительно 2000 мкг адьюванта и предпочтительно приблизительно 250 мкг/мл дозы вакцинной композиции. В другом предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к вакцинным композициям, содержащим от приблизительно 1 мкг/мл до приблизительно 60 мкг/мл антибиотиков, и более предпочтительно, менее чем приблизительно 30 мкг/мл антибиотиков.

Таким образом, настоящее изобретение также относится к иммуногенной композиции, содержащей i) любой из описанных выше белков ORF2 PCV2, предпочтительно в концентрациях, описанных выше, ii) по меньшей мере часть вирусного вектора, экспрессирующую указанный белок ORF2 PCV2, iii) часть культуры клеток, iv) инактивирующее средство для инактивации рекомбинантного вирусного вектора, предпочтительно BEI, и v) нейтрализующее средство для остановки инактивации, опосредованной инактивирующим средством, предпочтительно тиосульфат натрия в количествах, эквивалентных количествам BEI; vi) подходящий адьювант, предпочтительно, карбопол 971 в описанных выше количествах; vii) фармацевтически приемлемую концентрацию буферного солевого раствора, предпочтительно соли фосфата, и viii) противомикробное активное средство; где приблизительно 90% компонентов i)-iii) обладают размером менее 1 мкм.

Неожиданно обнаружили, что иммуногенная композиция, представленная здесь, являлась высоко стабильной в течение периода 24 месяцев. Обнаружено также, что представленные здесь иммуногенные композиции, содержащие рекомбинантный экспрессированный в бакуловирусе белок ORF2 PCV2, как представлено здесь, являются очень эффективными для уменьшения клинических симптомов, связанных с инфекциями PCV2. Неожиданно обнаружили, что иммуногенные композиции, содержащие рекомбинантный белок ORF2 PCV2, экспрессированный в бакуловирусе, как представлено здесь, являются более эффективными, чем иммуногенные композиции, содержащие целый вирус PCV2 в неинaktivированной форме, или выделенный вирусный антиген ORF2 PCV2. В частности, неожиданно обнаружили, что рекомбинантный белок ORF2 PCV2, экспрессированный в бакуловирусе, является эффективным в очень низких концентрациях, что означает, в концентрациях вплоть до 0,25 мкг/дозу. Этот неожиданно высокий иммуногенный потенциал белка ORF2 PCV2 можно дополнительно увеличить добавлением карбопола.

Дополнительный аспект относится к контейнеру, содержащему по меньшей мере одну дозу иммуногенной композиции белка ORF2 PCV2, как представлено здесь, где одна доза содержит по меньшей мере 2 мкг белка ORF2 PCV2, предпочтительно 2-16 мкг белка ORF2 PCV2. Указанный контейнер может содержать 1-250 доз иммуногенной композиции, предпочтительно, он содержит 1, 10, 25, 50, 100, 150, 200 или 250 доз иммуногенной композиции белка ORF2 PCV2. Предпочтительно, каждый из контейнеров, содержащих более одной дозы иммуногенной композиции белка ORF2 PCV2, дополнительно содержит противомикробное активное средство. Эти средства представляют собой, например, антибиотики, включая антибиотики гентамицин и мертиолат, и т.п. Таким образом, в одном аспекте настоящее изобретение относится к контейнеру, содержащему 1-250 доз иммуногенной композиции белка ORF2 PCV2, где одна доза содержит по меньшей мере 2 мкг белка ORF2 PCV2 и гентамицин и/или мертиолат, предпочтительно, от приблизительно 1 мкг/мл до приблизительно 60 мкг/мл антибиотиков, и более предпочтительно, менее чем приблизительно 30 мкг/мл.

Дополнительный аспект относится к набору, содержащему любой из контейнеров, описанных выше, и инструкцию, содержащую информацию для внутримышечного

применения по меньшей мере одной дозы иммуногенной композиции белка ORF2 PCV2 у поросят для уменьшения тяжести клинических симптомов, связанных с инфекцией PCV2. Более того, в дополнительном аспекте указанная инструкция содержит информацию по второму или последующему введению(введениям) по меньшей мере одной дозы иммуногенной композиции ORF2 PCV2, где второе введение или любое последующее введение происходит по меньшей мере через 14 суток после начального или другого прошлого введения. Предпочтительно, указанная инструкция содержит также информацию по введению иммуностимулятора. Предпочтительно, указанный иммуностимулятор следует вводить по меньшей мере дважды. Предпочтительно, по меньшей мере 3, более предпочтительно, по меньшей мере 5, даже более предпочтительно, по меньшей мере 7 суток проходит между первым и вторым или любым последующим введением иммуностимулятора. Предпочтительно, иммуностимулятор вводят по меньшей мере через 10 суток, предпочтительно, через 15, даже более предпочтительно, 20, даже более предпочтительно, по меньшей мере, 22 суток после начального введения иммуногенной композиции белка ORF2 PCV2. Предпочтительным иммуностимулятором является, например, гемоцианин морского блюдечка (KLH), еще предпочтительнее, эмульгированный с неполным адьювантом Фрейнда (KLH/ICFA). Однако при этом понятно, что можно использовать также любой другой иммуностимулятор, известный специалисту в данной области.

«Иммуностимулятор», как применяют здесь, обозначает любое вещество или композицию, которое может запускать иммунный ответ, предпочтительно, без инициации или увеличения специфического иммунного ответа, например, иммунного ответа против конкретного патогена. Присутствуют дополнительные инструкции для введения иммуностимулятора в подходящей дозе. Более того, набор может содержать также контейнер, содержащий по меньшей мере одну дозу иммуностимулятора, предпочтительно, одну дозу KLH или KLH/ICFA.

Более того, неожиданно обнаружили также, что иммуногенный потенциал иммуногенной композиции, содержащей рекомбинантный белок ORF2 PCV2, экспрессированный в бакуловирусе, предпочтительно в сочетании с карбополом, можно дополнительно усилить введением вакцины IngelVac PRRS MLV (смотри пример 5). Клинические признаки PCV2 и проявления заболевания сильно увеличиваются в присутствии инфекции PRRS. Однако иммуногенные композиции и способы вакцинации, как приведено здесь, значительно снижали этот эффект, и более, чем ожидали. Другими словами, обнаружили неожиданный синергический эффект, когда животных, предпочтительно, свиней, лечили какой-либо из иммуногенных композиций ORF2 PCV2, как представлено здесь, и вакциной Ingelvac PRRS MLV (Boehringer Ingelheim).

Таким образом, в дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к набору, как описано выше, содержащему иммуногенную композицию ORF2 PCV2, как приведено здесь, и инструкцию, где инструкция дополнительно содержит информацию по введению иммуногенной композиции ORF2 PCV2 вместе с иммуногенной композицией, содержащей антиген PRRS, предпочтительно, антиген PRRS с адьювантом. Предпочтительно, антиген PRRS представляет собой IngelVac® PRRS MLV (Boehringer Ingelheim).

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится также к набору, содержащему i) контейнер, содержащий по меньшей мере одну дозу иммуногенной композиции ORF2 PCV2, как представлено здесь, и ii) контейнер, содержащий иммуногенную композицию, содержащую антиген PRRS, предпочтительно, антиген PRRS с адьювантом. Предпочтительно антиген PRRS представляет собой IngelVac®

PRRS MLV (Boehringer Ingelheim). Более предпочтительно, набор дополнительно содержит инструкцию, содержащую информацию по введению обеих фармацевтических композиций. Предпочтительно, она содержит информацию, что композицию, содержащую ORF2 PCV2, вводят раньше по времени, чем композицию, содержащую PRRS.

Дополнительный аспект относится к применению любой из представленных здесь композиций в качестве лекарственного средства, предпочтительно, в качестве лекарственного средства для ветеринарии, даже более предпочтительно, в качестве вакцины. Более того, настоящее изобретение также относится к применению любой из описанных здесь композиций для получения лекарственного средства для уменьшения тяжести клинических симптомов, связанных с инфекцией PCV2. Предпочтительно, лекарственное средство предназначено для предупреждения инфекции PCV2, даже более предпочтительно, у поросят.

Дополнительный аспект относится к способу для (i) предупреждения инфекции или повторной инфекции PCV2 или (ii) уменьшения или прекращения клинических симптомов, вызванных PCV2, у субъекта, включающему введение какой-либо из иммуногенных композиций, представленных здесь, нуждающемуся в этом субъекту. Предпочтительно, субъект представляет собой свинью. Предпочтительно, иммуногенную композицию вводят внутримышечно. Предпочтительно, вводят одну дозу или две дозы иммуногенной композиции, где одна доза предпочтительно содержит по меньшей мере приблизительно 2 мкг белка ORF2 PCV2, даже более предпочтительно, от приблизительно 2 до приблизительно 16 мкг, и по меньшей мере от приблизительно 0,1 до приблизительно 5 мг карбопола, предпочтительно, приблизительно 1 мг карбопола. Дополнительный аспект относится к способу лечения, как описано выше, где включают второе применение иммуногенной композиции. Предпочтительно, осуществляют второе введение той же самой иммуногенной композиции, предпочтительно, обладающей тем же количеством белка ORF2 PCV2. Предпочтительно, второе введение также осуществляют внутримышечно. Предпочтительно, второе введение осуществляют по меньшей мере через 14 суток после начального введения, даже более предпочтительно, по меньшей мере через 4 недели после начального введения.

В дополнительном аспекте способ лечения включает также введение иммуностимулятора. Предпочтительно, указанный иммуностимулятор вводят по меньшей мере дважды. Предпочтительно, по меньшей мере 3, более предпочтительно, по меньшей мере 5 суток, даже более предпочтительно, по меньшей мере 7 суток проходит между первым и вторым введением иммуностимулятора. Предпочтительно, иммуностимулятор вводят по меньшей мере через 10 суток, предпочтительно 15, даже более предпочтительно, 20, даже более предпочтительно, по меньшей мере 22 суток после начального введения иммуногенной композиции ORF2 PCV2. Предпочтительный иммуностимулятор представляет собой, например, гемоцианин морского блюдечка (KLH), еще предпочтительнее, эмульгированный с неполным адьювантом Фрейнда (KLH/ICFA). Однако при этом понятно, что можно использовать также любой другой иммуностимулятор, известный специалисту в данной области. Введение иммуностимулятора в подходящей дозе лежит в обычной компетенции специалиста в данной области.

В дополнительном аспекте способ обработок, описанный выше, включает в себя также введение антигена PRRS. Предпочтительно, антиген PRRS представляет собой IngelVac® PRRS MLV (Boehringer Ingelheim). Предпочтительно, указанный антиген PRRS вводят позже по времени, чем введение иммуногенной композиции белка ORF2 PCV2.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

Фигура 1 представляет схему последовательности операций для предпочтительного конструирования рекомбинантного бакуловируса с ORF2 PCV2; и

Фиг.2а и 2b представляют схему последовательности операций для получения композиции по настоящему изобретению.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ПРЕДПОЧТИТЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

В следующих примерах излагают предпочтительные материалы и способы по настоящему изобретению. Однако следует понимать, что эти примеры приведены только в качестве иллюстрации и ничего там не следует считать ограничивающим общий объем изобретения.

ПРИМЕР 1

В данном примере сравнивают относительные выходы ORF2 с использованием способов по настоящему изобретению и с использованием способов, известных в предшествующей области техники. В каждой из четырех вращающихся колб по 1000 мл засеивали приблизительно $1,0 \times 10^6$ клеток Sf+/мл в 300 мл бессывороточной среды для клеток насекомых Excell 420 (JRH Biosciences, Inc., Lenexa, KS). Исходную культуру клеток идентифицировали как исходный штамм клеток SF+ (*Spodoptera frugiperda*), пассаж 19, Lot#N112-095W. Клетки, используемые для получения исходного штамма клеток SF+, получили от Protein Sciences Corporation, Inc., Meriden, CT. Линию клеток SF+ для данного примера ограничивали пассажами 19 и 59. Для целей настоящего изобретения можно работать с другими пассажами, однако, чтобы масштабировать способ вплоть до крупномасштабного производства, возможно, будет необходимо по меньшей мере 19 пассажей, и пассажи после 59 могут влиять на экспрессию, хотя это не исследовали. Более подробно, исходную культуру клеток SF+ после хранения в жидком азоте выращивали в среде Excell 420 в суспензии в стерильных вращающихся колбах с постоянным встряхиванием. Культуры выращивали во вращающихся колбах от 100 мл до 250 мл с 25-150 мл бессывороточной среды Excell 420. Когда клетки размножились до плотности клеток $1,0-8,0 \times 10^6$ клеток/мл, их разделяли на новые колбы с плотностью посева $0,5-1,5 \times 10^6$ клеток/мл. Последующие расширенные культуры выращивали во вращающихся колбах размером вплоть до 36 литров или в биореакторах из нержавеющей стали вплоть до 300 литров в течение периода 2-7 суток при 25-29°C.

После посева колбы инкубировали при 27°C в течение четырех часов. Затем каждую колбу засеивали рекомбинантным бакуловирусом, содержащим ген ORF2 PCV2 (SEQ ID NO: 4). Рекомбинантный бакуловирус, содержащий ген ORF2 PCV2, получали следующим образом: ген ORF2 PCV2 из Североамериканского штамма PCV2 амплифицировали PCR, чтобы он содержал 5'-последовательность Козака (SEQ ID NO: 1) и 3'-участок EcoR1 (SEQ ID NO: 2), клонировали в вектор pGEM-T-Easy (Promega, Madison, WI). Затем его последовательно вырезали и субклонировали в вектор-переносчик pVL1392 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA). Субклонированная часть представлена здесь как SEQ ID NO: 7. Плазмиду pVL1392, содержащую ген ORF2 PCV2, обозначили N47-064Y и затем котрансфицировали с ДНК бакуловируса VaculoGold® (BD Biosciences Pharmingen) в клетки насекомых Sf+ (Protein Sciences, Meriden, CT) для получения рекомбинантного бакуловируса, содержащего ген ORF2 PCV2. Новая конструкция представлена здесь как SEQ ID NO: 8. Рекомбинантный бакуловирус, содержащий ген ORF2 PCV2, очищали рассевом до отдельных бляшек, и исходный вакцинный вирус (MSV) размножали в линии клеток SF+, разделяли на аликвоты и

хранили при -70°C . MSV положительно определяли как бакуловирус с ORF2 PCV2 посредством PCR-RFLP с использованием специфических для бакуловируса праймеров. Клетки насекомых, инфицированные бакуловирусом с ORF2 PCV2 для получения MSV или рабочего вакцинного вируса, экспрессировали антиген ORF2 PCV2, затем
5 детектировали посредством поликлональной сыворотки или моноклональных антител в непрямом анализе с флуоресцентным антителом. Кроме того, идентичность бакуловируса с ORF2 PCV2 подтверждали секвенированием N-концевых аминокислот. MSV бакуловируса с ORF2 PCV2 тестировали также на чистоту согласно 9 C.F.R. 113.27 (с), 113.28 и 113.55. Все рекомбинантные бакуловирусы, посеянные во вращающиеся
10 колбы, обладали различной множественностью инфекции (MOI). В колбу 1 заседали 7,52 мл посева с MOI 0,088; в колбу 2 заседали 3,01 мл посева с MOI 0,36; в колбу 3 заседали 1,5 мл посева с MOI 0,18; и в колбу 4 заседали 0,75 мл посева с MOI 0,09. Схема последовательности операций, иллюстрирующая основные стадии, использованные для конструирования рекомбинантного бакуловируса с ORF2 PCV2, приведена здесь
15 в качестве фигуры 1.

После засева бакуловирусом, колбы затем инкубировали при $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ в течение 7 суток и в течение этого времени также покачивали при 100 об./мин. Использовали вентилируемые крышки для колб, чтобы обеспечить приток воздуха. Из каждой колбы
20 отбирали образцы каждые 24 часа в течение следующих 7 суток. После выделения каждый образец центрифугировали, разделяли осадок и супернатант, и затем подвергали микрофилтрации через мембрану с размером пор 0,45-1,0 мкм.

Затем в полученных образцах являлось необходимым оценить количество присутствующего в них ORF2 посредством анализа ELISA. Анализ ELISA проводили с антителом для захвата - анти-PCV2 IgG свиньи Pab, очищенное с помощью белка G
25 (разведенное 1:250 в PBS), разведенным до 1:6000 в 0,05 М карбонатном буфере (pH 9,6). Затем 100 мкл антитела помещали в лунки титрационного микропланшета, заклеивали и инкубировали в течение ночи при 37°C . Затем планшет промывали три
30 раза раствором для промывки, содержащим 0,5 мл Tween 20 (Sigma, St. Louis, MO), 100 мл 10X D-PBS (Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA) и 899,5 мл дистиллированной воды. В каждую лунку последовательно добавляли 250 мкл блокирующего раствора (5 г
35 нежирного сухого молока Carnation (Nestle, Glendale, CA) в 10 мл D-PBS QS до 100 мл дистиллированной воды). Следующая стадия представляла собой промывку тестового планшета и затем добавление предварительно разведенного антигена. Предварительно разведенный антиген получали добавлением 200 мкл разбавляющего раствора (0,5 мл
40 Tween 20 в 999,5 мл D-PBS) в каждую лунку планшета для разведения. Затем образец разводили в соотношении 1:240 и в соотношении 1:480, и по 100 мкл каждого из этих разведенных образцов затем добавляли к одной из верхних лунок планшета для
45 разведения (т.е. в одну верхнюю лунку добавляли 100 мкл разведения 1:240, а в другую добавляли 100 мкл разведения 1:480). Затем выполняли серийные разведения для остальной части планшета посредством отбора 100 мкл из каждой последующей лунки и переноса в следующую лунку в планшете. Каждую лунку перемешивали перед выполнением следующего переноса. Промывка тестового планшета включала промывку планшета три раза буфером для промывки. Затем планшет заклеивали и инкубировали в течение часа при 37°C перед промывкой еще три раза буфером для промывки.
Используемое антитело для детекции представляло собой моноклональное антитело к ORF2 PCV. Его разводили до 1:300 в разбавляющем растворе, и затем 100 мкл разведенного антитела для детекции добавляли в лунки. Затем планшет заклеивали и инкубировали в течение одного часа при 37°C перед промывкой три раза буфером для

промывки. Затем получали разбавитель для конъюгата посредством добавления нормальной сыворотки кролика (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) к разбавляющему раствору до концентрации 1%. Конъюгированное антитело козы против мыши (H+1)-HRP (Jackson ImmunoResearch) разводили в разбавителе для конъюгата до 1:10000. Затем 100 мкл разведенного конъюгированного антитела добавляли в каждую лунку. Затем планшет заклеивали и инкубировали в течение 45 минут при 37°C перед промывкой три раза буфером для промывки. 100 мкл субстрата (субстрат для пероксидазы ТМВ, Kirkgaard and Perry Laboratories (KPL), Gaithersberg, MD), смешанного с равным объемом субстрата для пероксидазы В (KPL), добавляли в каждую лунку. Планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут. Затем во все лунки добавляли по 100 мкл 1 н раствора HCl для остановки реакции. Затем планшет сканировали на спектрофотометре для прочтения планшетов после ELISA. Результаты данного анализа представлены в таблице 1 ниже:

Сутки	Колба	ORF2 в осадке (мкг)	ORF2 в супернатанте (мкг)
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

Эти результаты показывают, что при продлении времени инкубации экспрессия ORF2 в супернатанте центрифугированных клеток и среды больше, чем экспрессия в осадке центрифугированных клеток и среды. Соответственно, предоставление возможности экспрессии ORF2 по меньшей мере в течение 5 суток и выделение его из супернатанта по сравнению с предоставлением возможности экспрессии менее чем 5 суток и выделением ORF2 из клеток приводит к большому увеличению выхода ORF2 и значительному улучшению по сравнению с предшествующими способами.

ПРИМЕР 2

В этом примере представлены данные по эффективности изобретения, заявленного в формуле изобретения в этом документе. В 1000 мл вращающуюся колбу засеивали приблизительно $1,0 \times 10^6$ клеток Sf+/мл в 300 мл среды Excell 420. Затем колбу инкубировали при 27°C и покачивали при 100 об./мин. Затем в колбу засеивали 10 мл посева вируса ORF2 PCV2/Vac p+6 (рекомбинантный бакуловирус, содержащий ген ORF2 PCV2, пассированный дополнительно 6 раз в клетках насекомых Sf9) с 0,1 MOI после 24 часов инкубации.

Затем колбу инкубировали при 27°C в течение всего 6 суток. После инкубации колбу центрифугировали, и три образца полученного супернатанта собирали и инактивировали. Супернатант инактивировали доведением его температуры до 37±2°C. К первому образцу супернатанта добавляли 0,4 М раствор гидробромида 2-бромэтиленамина, циклизованного до 0,2 М бинарного этиленимина (ВЕI) в 0,3 н NaOH до получения конечной концентрации ВЕI 5 мМ. К второму образцу супернатанта добавляли 10 мМ ВЕI. К третьему образцу супернатанта ВЕI не добавляли. Образцы непрерывно перемешивали в течение 48 час. Для нейтрализации всего остаточного ВЕI добавляли 1,0 М раствор тиосульфата натрия до получения конечной минимальной концентрации 5 мМ. Затем количество ORF2 в каждом образце оценивали с использованием того же самого анализа ELISA, как описано в примере 1. Результаты этого можно видеть в таблице 2 ниже:

Образец	ORF2 в супернатанте (мкг)
1	78,71
2	68,75
3	83,33

В данном примере показали, что нейтрализация с помощью ВЕI не удаляет или не деградирует значительные количества белкового продукта рекомбинантной ORF2 PCV2. Это подтверждает факт отсутствия большой потери ORF2 в супернатанте из-за ВЕI или повышенных температур. Специалистам в данной области будет понятно, что выделенный ORF2 представляет собой стабильный белковый продукт.

ПРИМЕР 3

В данном примере показано, что настоящее изобретение можно масштабировать от мелкомасштабного получения рекомбинантного ORF2 PCV2 до крупномасштабного получения рекомбинантного ORF2 PCV2. 5,0×10⁵ клеток/мл клеток SF+/мл в 7000 мл среды ExCell 420 заседали в 20000 мл биореактор Applikon. Затем клетки и среду инкубировали при 27°C и покачивали при 100 об./мин в течение следующих 68 часов. На 68-ой час к 7000 мл среды ExCell 420 добавляли 41,3 мл MSV+3 бакуловируса с ORF2 PCV2. Затем полученную смесь добавляли в биореактор. В течение следующих семи суток смесь инкубировали при 27°C и покачивали при 100 об./мин. Образцы из биореактора отбирали каждые 24 часа начиная с суток 4 после инфекции, и каждый образец центрифугировали. Супернатант из образцов сохраняли, и затем оценивали количество ORF2 с использованием денситометрии после SDS-PAGE. Результаты этого можно видеть в таблице 3 ниже:

Сутки после инфекции	ORF2 в супернатанте (мкг/мл)
4	29,33
5	41,33
6	31,33
7	60,67

ПРИМЕР 4

В данном примере тестировали эффективность семи вакцин-кандидатов и дополнительно определяли параметры эффективности после воздействия вирулентного штамма PCV2. Сто восемь (108) извлеченных кесаревым сечением, не получающих молозива (CDCD) поросят в возрасте 9-14 суток случайно распределяли на 9 групп равного размера. В таблице 4 описана общая структура исследования для данного

примера.

Таблица 4. Общая структура исследования

Группа	Число поросят	Обработка	Сутки обработки	KLH/ICFA на сутки 21 или сутки 27	Заражение вирулентным PCV2 на сутки 24	Вскрытие на сутки 49
1	12	PCV2 вакцина № 1 - (vORF2 16 мкг)	0	+	+	+
2	12	PCV2 вакцина № 2 - (vORF2 8 мкг)	0	+	+	+
3	12	PCV2 вакцина № 3 - (vORF2 4 мкг)	0	+	+	+
4	12	PCV2 вакцина № 4 - (rORF2 16 мкг)	0	+	+	+
5	12	PCV2 вакцина № 5 - (rORF2 8 мкг)	0	+	+	+
6	12	PCV2 вакцина № 6 - (rORF2 4 мкг)	0	+	+	+
7	12	PCV2 вакцина № 7 - (убитый вирус с цельными клетками)	0	+	+	+
8	12	Нет - Контроли заражения	N/A	+	+	+
9	12	Нет - Группа строгого отрицательного контроля	N/A	+	-	+

vORF2 = выделенный вирусный ORF2; rORF2 = рекомбинантный экспрессированный в бакуловирусе ORF2; убитый вирус с цельными клетками = вирус PCV2, выращенный в подходящей культуре клеток

В семи из групп (группы 1-7) вводили дозы полипептида ORF2 PCV2, одна из групп служила контролем заражения и не получала ORF2 PCV2, а другая группа служила группой строгого отрицательного контроля и также не получала ORF2 PCV2. На сутки 0, группы с 1 по 7 обрабатывали назначенными вакцинами. Поросятам в группе 7 проводили вторичную обработку на 14 сутки. Поросят обследовали на наличие неблагоприятных событий и реакции в участке инъекции после вакцинации, и на 19 сутки поросят переводили во второй центр проведения исследования. Во втором центре проведения исследования группы 1-8 являлись группами, содержащимися в одном здании, в то время как группу 9 содержали в отдельном здании. Всем поросётам вводили гемоцианин морского блюдечка (KLH)/неполный адъювант Фрейнда (ICFA) на 21 и 27 сутки, и на 24 сутки группы 1-8 заражали вирулентным PCV2.

До и после заражения собирали образцы крови для серологического исследования PCV2. После заражения собирали данные по массе тела для определения среднего ежесуточного прироста массы (ADWG), данные по клиническим симптомам, а также образцы назальных мазков для определения назального выделения PCV2. На 49 сутки всех выживших поросят подвергали вскрытию, оценивали очаги в легких и избранные ткани фиксировали в формалине для иммуногистохимического (ИНС) тестирования позднее.

Материалы и методы

Это являлось частично слепым анализом осуществимости вакцинации-заражения, проведенным на CDCD поросятах в возрасте 9-14 суток на сутки 0. Титры PCV2 по IFA у свиноматок для включения в исследование составляли $\leq 1:1000$. Кроме того, по серологическому статусу свиноматки происходили из известного PRRS-отрицательного стада. У двадцати восьми (28) свиноматок тестировали серологический статус для PCV2. Для четырнадцати (14) показали титр PCV2 ≤ 1000 и перевели их в первый центр исследования. Сто десять (110) поросят извлекли операциями кесарева сечения, и они являлись доступными для данного исследования на сутки -4. 108 поросят CDCD на сутки -3 в первом центре исследования взвешивали, помечали ушными бирками,

группировали по массе и случайно распределяли по группам 1-9, как указано выше в таблице 4. Если какое-либо животное, удовлетворяющее критериям включения, регистрировали для исследования, а затем исключали по какой-либо причине, исследователь и контролер консультировались, чтобы определить применимость данных, собранных для этого животного, в конечном анализе. Дату исключения зарегистрированных поросят и причину исключения документировали. В начальной стадии ни одной из свиноматок не исключили. Всего 108 из доступных 110 поросят случайно записывали в одну из 9 групп на сутки -3. Двух самых маленьких поросят (№ 17 и 19) не записывали в группу, и они являлись доступными в качестве дополнительных при необходимости. За время исследования исключили нескольких животных. Поросенок 82 (группа 9) на сутки -1, поросенок № 56 (группа 6) на сутки 3, поросенок № 53 (группа 9) на сутки 4, поросенок № 28 (группа 8) на сутки 8, поросенок № 69 (группа 8) на сутки 7, и поросенок № 93 (группа 4) на сутки 9, все найдены мертвыми перед заражением. Этих шесть поросят не включали в конечные результаты исследования. Поросенка № 17 (одного из дополнительных поросят) записали в группу 9. Оставшегося дополнительного поросенка № 19 исключили из исследования.

Составы, вводимые в каждой из групп, являлись следующими: Группа 1 являлась предназначенной для введения 1 мл вирусного ORF2 (vORF2), содержащего 16 мкг ORF2/мл. Это осуществляли смешиванием 10,24 мл вирусного ORF2 (256 мкг/25 мкг/мл = 10,24 мл vORF2) с 3,2 мл 0,5% карбопола и 2,56 мл фосфатно-солевого буферного раствора с pH 7,4. Так получили 16 мл состава для группы 1. Группа 2 являлась предназначенной для введения 1 мл vORF2, содержащего 8 мкг vORF2/мл. Это осуществляли смешиванием 5,12 мл vORF2 (128 мкг/25 мкг/мл = 5,12 мл vORF2) с 3,2 мл 0,5% карбопола и 7,68 мл фосфатно-солевого буферного раствора с pH 7,4. Так получили 16 мл состава для группы 2. Группа 3 являлась предназначенной для введения 1 мл vORF2, содержащего 4 мкг vORF2/мл. Это осуществляли смешиванием 2,56 мл vORF2 (64 мкг/25 мкг/мл = 2,56 мл vORF2) с 3,2 мл 0,5% карбопола и 10,24 мл фосфатно-солевого буферного раствора с pH 7,4. Так получили 16 мл состава для группы 3. Группа 4 являлась предназначенной для введения 1 мл рекомбинантного ORF2 (rORF2), содержащего 16 мкг rORF2/мл. Это осуществляли смешиванием 2,23 мл rORF2 (512 мкг/230 мкг/мл = 2,23 мл rORF2) с 6,4 мл 0,5% карбопола и 23,37 мл фосфатно-солевого буферного раствора с pH 7,4. Так получили 32 мл состава для группы 4. Группа 5 являлась предназначенной для введения 1 мл rORF2, содержащего 8 мкг rORF2/мл. Это осуществляли смешиванием 1,11 мл rORF2 (256 мкг/230 мкг/мл = 1,11 мл rORF2) с 6,4 мл 0,5% карбопола и 24,49 мл фосфатно-солевого буферного раствора с pH 7,4. Так получили 32 мл состава для группы 5. Группа 6 являлась предназначенной для введения 1 мл rORF2, содержащего 8 мкг rORF2/мл. Это осуществляли смешиванием 0,56 мл rORF2 (128 мкг/230 мкг/мл = 0,56 мл rORF2) с 6,4 мл 0,5% карбопола и 25,04 мл фосфатно-солевого буферного раствора с pH 7,4. Так получили 32 мл состава для группы 6. Группа 7 являлась предназначенной для введения 2 мл убитой цельноклеточной вакцины PCV2 (PCV2 KV), содержащей MAX PCV2 KV. Это осуществляли смешиванием 56 мл PCV2 KV с 14 мл 0,5% карбопола. Так получили 70 мл состава для группы 7. Наконец, группа 8 являлась предназначенной для введения 0,5 мкг/мл или 1,0 мкг/мл KLN на дозу 2 мл. Это осуществляли смешиванием 40,71 мл KLN (7,0 мкг белка/мл при 0,5 мкг/мл = 570 мл (7,0 мкг/мл)(x) = (0,5)(570 мл)), 244,29 мл фосфатно-солевого буферного раствора с pH 7,4 и 285 мл адьюванта Фрейнда. В таблице 5 описаны временные рамки для ключевых операций из данного примера.

Таблица 5. Операции исследования

Сутки исследования	Операции исследования
-4, 0-49	Общие обследования по общему состоянию здоровья и клиническим признакам
-3	Взвешивали; Случайно распределяли по группам; Собирали образцы крови от всех поросят
0	Обследование состояния здоровья; Вводили IVP № 1-7 группам 1-7, соответственно
0-7	Обследовали поросят на реакции в участке инфекции
14	Проводили вторичное введение вакцины PCV2 № 7 в группе 7; Образцы крови от всех поросят
14-21	Обследовали группу 7 на реакции в участке инфекции
16-19	Обрабатывали всех поросят антибиотиками (данные отсутствуют)
19	Поросят транспортировали из первого центра тестирования во второй центр тестирования
21	Обрабатывали группы 1-9 KLH/ICFA
24	Собирали образцы крови и назальных мазков от всех поросят; взвешивали всех поросят; заражали группы 1-8 материалом для заражения PCV2
25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47	Собирали образцы назальных мазков от всех поросят
27	Обрабатывали группы 1-9 KLH/ICFA
31	Собирали образцы крови от всех поросят
49	Собирали образцы крови и назальных мазков от всех поросят; Взвешивали всех поросят; Проводили вскрытие всех поросят; Отмечали макроскопические повреждения с большей выраженностью желтухи и язвы желудка; Оценивали повреждения в легких; Сохраняли свежие и фиксированные формалином образцы; Завершали прижизненную фазу исследования

После завершения прижизненной фазы исследования фиксированные формалином ткани оценивал патолог посредством иммуногистохимии (ИНС) для детекции антигена PCV2, PCV2 в образцах крови оценивали серологически, оценивали выделение PCV2 в образцах назальных мазков, и определяли средний прирост массы (ADWG) от 24 суток до 49 суток.

В первом центре исследования животных содержали в индивидуальных клетках в пяти комнатах от рождения до возраста приблизительно 11 суток (приблизительно 0 сутки исследования). Все комнаты являлись идентичными по планировке и содержали стеллажи с индивидуальными клетками из нержавеющей стали с подогретым и фильтрованным воздухом, поставляемым отдельно к каждой отдельной единице. Каждая комната обладала отдельным нагреванием и вентиляцией, таким образом предупреждали перекрестную контаминацию воздуха между комнатами. Во втором центре исследования животных содержали в двух различных зданиях. Группу 9 (группу строгого отрицательного контроля) содержали отдельно в переоборудованном разделочном здании, а группы 1-8 содержали в переоборудованном помещении для молодняка. Каждую группу содержали в отдельном загоне (11-12 поросят на загон), и в каждом загоне обеспечивали приблизительно 3,0 квадратных фута на поросенка. Каждый загон находился на приподнятом настиле с полами из пластиковых плит. Углубление под загонами служило резервуаром для экскрементов и мусора. Каждое здание обладало собственными системами нагревания и вентиляции, с небольшой вероятностью перекрестной контаминации воздуха между зданиями.

В первом центре исследования поросят кормили специально составленным молочным рационом от рождения до возраста приблизительно 3 недели. К 19 суткам (возраст приблизительно 4 ½ недели) все поросята потребляли твердый, специально смешанный рацион. Во втором центре исследования всех поросят кормили составленным на заказ не содержащим лекарственных веществ коммерческим смешанным рационом, подходящим для их возраста и массы, по желанию. Вода в обоих центрах исследования также являлась доступной по желанию.

Всем тестируемым поросятам вводили витамин Е на сутки -2, с инъекциями железа на сутки -1, и с NAXCEL® (1,0 мл, IM, в меняющиеся бедра) на сутки 16, 17, 18 и 19.

Кроме того, поросенку № 52 (группа 9) вводили инъекцию железа на сутки 3, поросенку 45 (группа 6) вводили инъекцию железа на сутки 11, поросенку № 69 (группа 8) вводили NAXCEL® на сутки 6, поросенку № 74 (группа 3) вводили дексаметазон и пенициллин на сутки 14, и поросенку № 51 (группа 1) вводили дексаметазон и пенициллин на сутки 13 и NAXCEL® на сутки 14 по различным медицинским причинам.

В это время в обоих центрах исследования поросята находились под наблюдением ветеринара. Обследование состояния здоровья животных проводили на сутки 0 и документировали в форме записи обследования состояния здоровья. Все животные обладали хорошим здоровьем и состоянием питания, как определяли обследованием на сутки 0. Все тестируемые животные, как обследовано, находились с хорошим здоровьем и состоянием питания перед заражением. Скелеты и ткани утилизировали в салотопке. Последнее размещение исследуемых животных записывали в протоколе размещения животных.

На сутки 0 поросятам, записанным в группы 1-6, вводили 1,0 мл вакцин PCV2 1-6, соответственно, IM в область шеи слева с использованием стерильного 3,0 мл шприца с наконечником Люэра и стерильной иглы 20g × ½". Поросятам, записанным в группу 7, вводили 2,0 мл вакцины PCV2 № 7 IM в область шеи слева с использованием стерильного 3,0 мл шприца с наконечником Люэра и стерильной иглы 20g × ½". На сутки 14 поросятам, записанным в группу 7, вводили 2,0 мл вакцины PCV2 № 7 IM в область шеи справа с использованием стерильного 3,0 мл шприца с наконечником Люэра и стерильной иглы 20g × ½".

На сутки 21 всем тестируемым поросятам вводили 2,0 мл KLN/ICFA IM в область правого бедра с использованием стерильного 3,0 мл шприца с наконечником Люэра и стерильной иглы 20g × 1". На сутки 27 всем тестируемым поросятам вводили 2,0 мл of KLN/ICFA в область левого бедра с использованием стерильного 3,0 мл шприца с наконечником Люэра и стерильной иглы 20g × 1".

На сутки 24 поросятам, записанным в группы 1-8, вводили 1,0 мл материала для заражения PCV2 ISUVDL (5,11 log₁₀ TCID₅₀/мл) IM в область шеи слева с использованием стерильного 3,0 мл шприца с наконечником Люэра и стерильной иглы 20g × 1".
 30 Дополнительный 1,0 мл того же самого материала вводили IN каждому поросенку (0,5 мл на ноздрю) с использованием стерильного 3,0 мл шприца с наконечником Люэра и назальной канюли.

Тестируемых животных ежедневно обследовали по общему состоянию здоровья и наличию неблагоприятных событий на сутки -4 и от 0 суток до 19 суток. Обследования документировали в протоколе клинических обследований. Всех тестируемых поросят обследовали от 0 суток до 7 суток, и в группе 7 на сутки 14-21 дополнительно обследовали реакции в участке инъекции. Средний прирост массы определяли взвешиванием каждого поросенка по калибровочной шкале на сутки -3, 24 и 49, или на сутки, в которые поросенка находили мертвым после заражения. Массу тела записывали в форму массы тела. Массу тела на сутки -3 использовали для разделения поросят на группы перед рандомизацией. Данные массы на 24 сутки и 49 сутки использовали для определения среднего ежесуточного прироста массы (ADWG) для каждого поросенка во время этих временных точек. Для поросят, умерших после заражения и перед 49 сутками, ADWG подгоняли, чтобы представлять ADWG от 24 45 суток до суток смерти.

Для серологического определения PCV2 у каждого поросенка отбирали цельную кровь из вены из орбитальных венозных синусов на сутки -3 и 14. У каждого поросенка кровь отбирали из орбитального венозного синуса посредством введения стерильной

капиллярной трубки в срединный угол глазной щели одного из глаз и отвода приблизительно 3,0 мл цельной крови в 4,0 мл пробирку для отделения сыворотки (SST). На сутки 24, 31 и 49 цельную венозную кровь собирали у каждого поросенка из передней 5 поллой вены с использованием стерильной иглы для вакуумного контейнера 18 g × 1½" (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey), держателя иглы для вакуумного контейнера и 13 мл SST. Отборы крови в каждой временной точке регистрировали в протоколе сбора образцов. Крови в каждой SST позволяли свертываться, затем каждую SST центрифугировали и собирали сыворотку. Собранную сыворотку переносили в 10 стерильную защелкивающуюся пробирку и хранили при $-70\pm 10^{\circ}\text{C}$ до тестирования в более поздней дате. В образцах сыворотки персонал BIVI-R&D тестировал присутствие антител к PCV2.

У поросят один раз в сутки от 20 суток до 49 суток наблюдали клинические симптомы, и клинические обследования документировали в протоколе клинических обследований.

Для тестирования назального выделения PCV2, на сутки 24, 25, и затем на каждые 15 сутки исследования с нечетным номером вплоть до суток 49 включительно, стерильный дакроновый тампон вводили интраназально либо в левую, либо в правую ноздрю каждого поросенка (один тампон на поросенка) настолько стерильно, насколько возможно, обмазывали кругом в течение нескольких секунд и затем удаляли. Затем каждый тампон помещали в отдельную стерильную пробирку с защелкивающейся 20 крышкой, содержащую 1,0 мл среды EMEM с 2% IFBS, 500 единиц/мл пенициллина, 500 мкг/мл стрептомицина и 2,5 мкг/мл фунгизона. Тампон в пробирке разделяли на части, защелкнутую пробирку заклеивали и соответствующим образом обозначали на ярлыке номер животного, номер исследования, дату отбора, сутки исследования и «назальный мазок». Заклеенные защелкнутые пробирки сохраняли при $-40\pm 10^{\circ}\text{C}$ до транспортировки 25 в течение ночи во льду в BIVI-St. Joseph. Отборы назальных образцов документировали в форме сбора образцов назальных мазков. В BIVI-R&D проводили тестирование по количественному выделению вируса (VI) PCV2 в образцах назальных мазков. Результаты выражали в значениях \log_{10} . Значение $A 1,3 \log$ или менее считали отрицательным, а любое значение более $1,3 \log$ считали положительным.

30 Поросят (№№ 28, 52, 56, 69, 82, и 93), умерших в первом центре исследования, вскрывали на уровне, необходимом для определения диагноза. Макроскопические повреждения документировали, и ткани от этих поросят не сохраняли. Во втором центре исследования проводили вскрытия поросят, умерших до 49 суток (№ 45, 23, 58, 35), поросят, найденных мертвыми на 49 сутки перед эвтаназией (№ 2, 43) и поросят, 35 подвергнутых эвтаназии на 49 сутки. Отмечали любые макроскопические повреждения, и процент долей легкого с повреждениями документировали в форме протокола вскрытия.

От каждого из 103 поросят, вскрытых во втором центре исследования по образцу 40 ткани из миндалина, легкого, сердца, печени, брыжеечного лимфатического узла, почки и пахового лимфатического узла помещали в отдельный контейнер с забуференным 10% формалином; в то же время другой образец ткани из вышеупомянутых органов помещали в пакет для центрифугирования (M-Tech Diagnostics Ltd., Thelwall, UK) и каждый пакет для центрифугирования помещали в лед. Каждый контейнер соответствующим образом помечали. Сбор образцов документировали в форме 45 протокола вскрытия. Затем фиксированные в формалине образцы и форму диагностического запроса принимали для тестирования ИНС. Тестирование ИНС проводили согласно стандартным лабораторным способам ISU для получения образцов, подготовки образца и стекла и способов окрашивания. Свежие образцы в пакетах для

центрифугирования посылали вместе с пакетами со льдом контролеру исследования для хранения ($-70^{\circ}\pm 10^{\circ}\text{C}$) и возможного будущего использования. Фиксированные в формалине ткани исследовал патолог для детекции PCV2 посредством ИНС и оценивал с использованием следующей системы баллов: 0 = нет; 1 = ограниченное положительное окрашивание, мало участков; 2 = умеренное положительное окрашивание, множественные участки; и 3 = обильное положительное окрашивание, распространенное по всей ткани. Вследствие того, что патолог не мог определенно отличить паховый LN от брыжеечного LN, результаты по этим тканям помечали просто как лимфатический узел, и данный балл для животного представлял собой наивысший балл для каждой из двух тканей.

Результаты

Результаты для данного примера приведены ниже. Отмечено, что один поросенок из группы 9 умер перед сутками 0, и еще 5 поросят умерли после вакцинации (1 поросенок из группы 4; 1 поросенок из группы 6; 2 поросенка из группы 8; и 1 поросенок из группы 9). Патологоанатомическим исследованием показали, что все шесть умерли из-за серьезных инфекций, не связанных с вакцинацией или PMWS. Кроме того, ни в одной из групп не обнаружили неблагоприятных событий или реакций в участке инъекции.

Результаты среднего прироста массы (ADWG) представлены ниже в таблице 6. Группа 9, группа строгого отрицательного контроля, обладала самым высоким ADWG ($1,06\pm 0,17$ фунтов/сутки), за ней следовала группа 5 ($0,94\pm 0,22$ фунтов/сутки), которой вводили одну дозу из 8 мкг rORF2. Группа 3, в которой вводили одну дозу из 4 мкг vORF2, обладала самым низким ADWG ($0,49\pm 0,21$ фунтов/сутки), за ней следовала группа 7 ($0,50\pm 0,15$ фунтов/сутки), в которой вводили 2 дозы убитой вакцины.

25

Таблица 6. Обобщение среднего ежесуточного прироста массы в группах (ADWG)

Группа	Воздействие	N	ADWG - фунтов/сутки (сутки 24 - сутки 49) или с подстановкой для поросят, умерших до 29 суток
1	vORF2 - 16 мкг (1 доза)	12	$0,87\pm 0,29$ фунтов/сутки
2	vORF2 - 8 мкг (1 доза)	12	$0,70\pm 0,32$ фунтов/сутки
3	vORF2 - 4 мкг (1 доза)	12	$0,49\pm 0,21$ фунтов/сутки
4	rORF2 - 16 мкг (1 доза)	11	$0,84\pm 0,30$ фунтов/сутки
5	rORF2 - 8 мкг (1 доза)	12	$0,94\pm 0,22$ фунтов/сутки
6	rORF2 - 4 мкг (1 доза)	11	$0,72\pm 0,25$ фунтов/сутки
7	KV (2 дозы)	12	$0,50\pm 0,15$ фунтов/сутки
8	Контроли заражения	10	$0,76\pm 0,19$ фунтов/сутки
9	Строгие отрицательные контроли	11	$1,06\pm 0,17$ фунтов/сутки

30

35

vORF2 = выделенный вирусный ORF2; rORF2 = рекомбинантный экспрессированный в бакуловире ORF2; убитый вирус с цельными клетками = вирус PCV2, выращенный в подходящей культуре клеток

Серологические результаты для PCV2 представлены ниже в таблице 7. Все девять групп являлись серонегативными по PCV2 на сутки -3. На сутки 14 группы, которым вводили вакцины vORF2, обладали наивысшими титрами, лежащими в диапазоне от 187,5 до 529,2. Поросята после введения убитой вирусной вакцины обладали следующими из наиболее высоких титров, после групп с введением вакцины rORF2. Группы 8 и 9 оставались серонегативными к этому времени. На сутки 24 и сутки 31, для поросят после введения вакцины vORF2 продолжали обнаруживать сильный серологический ответ, следуя близко за группой с введением двух доз убитой вирусной вакцины. Поросята с введением вакцин rORF2 медленнее отвечали серологически, а группы 8 и 9 продолжали оставаться серонегативными. На сутки 49 для поросят с введением вакцины vORF2, 2 доз убитой вирусной вакцины и самой низкой дозы rORF2 показали наиболее сильные серологические ответы. Поросята с введением 16 мкг и 8 мкг вакцин rORF2 обладали немного более высокими титрами в IFA, чем контроли заражения. Для

группы 9 на сутки 49 показали сильный серологический ответ.

Таблица 7. Обобщение титров PCV2 в IFA в группах СРЕДНИЙ ТИТР В IFA

Группа	Воздействие	Сутки -3	Сутки 14	Сутки 24	Сутки 31**	Сутки 49***	
5	1	vORF2 - 16 мкг (1 доза)	50,0	529,2	4400,0	7866,7	11054,5
	2	vORF2- 8 мкг (1 доза)	50,0	500,0	3466,7	6800,0	10181,8
	3	vORF2- 4 мкг (1 доза)	50,0	187,5	1133,3	5733,3	9333,3
	4	rORF2- 16 мкг (1 доза)	50,0	95,5	1550,0	3090,9	8000,0
	5	rORF2- 8 мкг (1 доза)	50,0	75,0	887,5	2266,7	7416,7
	6	rORF2- 4 мкг (1 доза)	50,0	50,0	550,0	3118,2	10570,0
10	7	KV (2 дозы)	50,0	204,2	3087,5	4620,8	8680,0
	8	Контроли заражения	50,0	55,0	50,0	50,0	5433,3
	9	Строгие отрицательные контроли	50,0	59,1	59,1	54,5	6136,4

vORF2 = выделенный вирусный ORF2; rORF2 = рекомбинантный экспрессированный в бакуловирусе ORF2; убитый вирус с цельными клетками = вирус PCV2, выращенный в подходящей культуре клеток
 *Для целей вычисления титр в IFA ≤100 обозначили как титр «50»; титр в IFA ≥6400 обозначили как титр в IFA «12800».
 **Сутки заражения
 ***Сутки вскрытия

Результаты клинических обследований после заражения представлены ниже в таблице 8. Это обобщение результатов включает наблюдения аномального поведения, аномального дыхания, кашля и диареи. Таблица 9 содержит результаты из обобщения общей частоты проявления клинических симптомов в группах, а таблица 10 содержит результаты обобщения уровня смертности из обобщения уровней смертности в группах после заражения. Наиболее распространенным клиническим симптомом, обнаруживаемым в данном исследовании, являлось аномальное поведение, которое оценивали как заторможенность от легкой до тяжелой степени. Поросята после введения 2 более низких доз vORF2, поросята после введения 16 мкг rORF2 и поросята после введения 2 доз вакцины KV обладали частотой проявления ≥27,3%. Поросята после введения 8 мкг rORF2 и группа строгого отрицательного контроля не обладали аномальным поведением. Ни для одного из поросят в данном исследовании не показали какого-либо аномального дыхания. Кашель часто обнаруживали во всех группах (0-25%), так же как диарею (0-20%). Никакие из обнаруженных симптомов не являлись патогномоничными для PMWS.

Общая частота проявления клинических симптомов различалась между группами. Группы после введения любой из вакцин vORF2, группа после введения 16 мкг rORF2, группа после введения 2 доз вакцины KV и группа контрольного заражения обладали наивысшей частотой проявления общих клинических симптомов (≥36,4%). Группа строгого отрицательного контроля, группа после введения 8 мкг rORF2 и группа после введения 4 мкг rORF2 обладали общей частотой проявления клинических симптомов 0%, 8,3% и 9,1%, соответственно.

Общие уровни смертности также отличались между группами. Группа после введения 2 доз вакцины обладала наивысшим уровнем смертности (16,7%); в то время как группы после введения 4 мкг vORF2, 16 мкг rORF2 или 8 мкг rORF2, и группа строгого отрицательного контроля все обладали 0% уровнями смертности.

Таблица 8. Обобщение наблюдений в группах аномального поведения, аномального дыхания, кашля и диареи

Группа	Воздействие	N	Аномальное поведение ¹	Аномальное поведение ²	Кашель ³	Диарея ⁴
1	vORF2 - 16 мкг (1 доза)	12	2/12 (16,7%)	0/12 (0%)	3/12 (25%)	2/12 (16,7%)
2	vORF2 - 8 мкг (1 доза)	12	4/12 (33,3%)	0/12 (0%)	1/12 (8,3%)	1/12 (8,3%)

3	vORF2 - 4 мкг (1 доза)	12	8/12 (66,7%)	0/12 (0%)	2/12 (16,7%)	1/12 (8,3%)
4	rORF2 - 16 мкг (1 доза)	11	3/11 (27,3%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	2/11 (18,2%)
5	rORF2 - 8 мкг (1 доза)	12	0/12 (0%)	0/12 (0%)	1/12 (8,3%)	0/12 (0%)
6	rORF2 - 4 мкг (1 доза)	11	1/11 (9,1%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0/12 (0%)

7	KV (2 дозы)	12	7/12 (58,3)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	1/12 (8,3%)
8	Контроли заражения	10	1/10 (10%)	0/10 (0%)	2/10 (20%)	2/10 (20%)
9	Строгие отрицательные контроли	11	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)

vORF2 = выделенный вирусный ORF2; rORF2 = рекомбинантный экспрессированный в бакуловире ORF2; убитый вирус с цельными клетками = вирус PCV2, выращенный в подходящей культуре клеток

¹ Общее число поросят в каждой группе, для которых показали любое аномальное поведение по меньшей мере в течение одних суток

² Общее число поросят в каждой группе, для которых показали любое аномальное дыхание по меньшей мере в течение одних суток

³ Общее число поросят в каждой группе, для которых показали кашель по меньшей мере в течение одних суток

⁴ Общее число поросят в каждой группе, для которых показали диарею по меньшей мере в течение одних суток

Таблица 9. Обобщение общей частоты проявления клинических симптомов

Группа	Воздействие	N	Доля поросят с клиническими симптомами ¹	Частота проявления
1	vORF2 - 16 мкг (1 доза)	12	5	41,7%
2	vORF2 - 8 мкг (1 доза)	12	5	41,7%

3	vORF2 - 4 мкг (1 доза)	12	8	66,7%
4	rORF2 - 16 мкг (1 доза)	11	4	36,4%
5	rORF2 - 8 мкг (1 доза)	12	1	8,3%
6	rORF2 - 4 мкг (1 доза)	11	1	9,1%
7	KV (2 дозы)	12	7	58,3%
8	Контроли заражения	10	4	40%
9	Строгие отрицательные контроли	11	0	0%

vORF2 = выделенный вирусный ORF2; rORF2 = рекомбинантный экспрессированный в бакуловире ORF2; убитый вирус с цельными клетками = вирус PCV2, выращенный в подходящей культуре клеток

¹ Общее число поросят в каждой группе, для которых показали любые клинические симптомы по меньшей мере в течение одних суток

Таблица 10. Обобщение уровня смертности в группах после заражения

Группа	Воздействие	N	Умерших после заражения	Уровень смертности
1	vORF2 - 16 мкг (1 доза)	12	1	8,3%
2	vORF2 - 8 мкг (1 доза)	12	1	8,3%

3	vORF2 - 4 мкг (1 доза)	12	0	0%
4	rORF2 - 16 мкг (1 доза)	11	0	0%
5	rORF2 - 8 мкг (1 доза)	12	0	0%
6	rORF2 - 4 мкг (1 доза)	11	1	9,1%
7	KV (2 дозы)	12	2	16,7%
8	Контроли заражения	10	1	10%
9	Строгие отрицательные контроли	11	0	0%

vORF2 = выделенный вирусный ORF2; rORF2 = рекомбинантный экспрессированный в бакуловире ORF2; убитый вирус с цельными клетками = вирус PCV2, выращенный в подходящей культуре клеток

Результаты по назальному выделению PCV2 представлены ниже в таблице 11. После заражения на сутки 24, у 1 поросенка в группе 7 началось выделение PCV2 на 27 сутки. Ни один из других групп не испытывал выделения до 33 суток. Основной объем назального выделения обнаружили от 35 суток до 45 суток. Группы после введения

любой из трех вакцин vORF2 и группы после введения либо 4, либо 8 мкг rORF2 обладали самой низкой частотой проявления назального выделения PCV2 ($\leq 9,1\%$). Группа контрольного заражения (группа 8) обладала наибольшей частотой выделения (80%), за ней следовала группа строгого отрицательного контроля (группа 9), обладающая частотой проявления 63,6%.

Таблица 11. Обобщение проявления назального выделения PCV2 в группах

Группа	Воздействие	N	Число поросят с выделением по меньшей мере в течение одних суток	Частота проявления
1	vORF2 - 16 мкг (1 доза)	12	1	8,3%
2	vORF2 - 8 мкг (1 доза)	12	1	8,3%
3	vORF2 - 4 мкг (1 доза)	12	1	8,3%
4	rORF2 - 16 мкг (1 доза)	11	2	18,2%
5	rORF2 - 8 мкг (1 доза)	12	1	8,3%
6	rORF2 - 4 мкг (1 доза)	11	1	9,1%
7	KV (2 дозы)	12	5	41,7%
8	Контроли заражения	10	8	80%
9	Строгие отрицательные контроли	11	7	63,6%

vORF2 = выделенный вирусный ORF2; rORF2 = рекомбинантный экспрессированный в бакуловирусе ORF2; убитый вирус с целевыми клетками = вирус PCV2, выращенный в подходящей культуре клеток

Обобщение частоты проявления желтухи в группах, частоты проявления язвы желудка в группах, средние оценки повреждений легких в группах и частота проявления повреждений легких в группах показаны ниже в таблице 12. Шесть поросят умерли в первом центре исследования во время фазы исследования после вакцинации (группа 4, N=1; группа 6, N=1; группа 8, N=2; группа 9, N=2). Четыре из шести поросят обладали фибринозными повреждениями в одной или нескольких полостях тела, один поросенок (группа 6) обладал повреждениями, связанными с клостридиальным заболеванием, и еще один поросенок (группа 9) не обладал макроскопическими повреждениями. Ни один из поросят, умерших во время стадий исследования после вакцинации, не обладал повреждениями, связанными с PMWS.

Поросят, умерших после заражения, и поросят, подвергнутых эвтаназии на 49 сутки, подвергали вскрытию. Ни в одной из групп при вскрытии не присутствовало желтухи и язвы желудка. Что касается среднего % повреждений легких, группа 9 обладала самым низким средним % повреждений легких (0%), за ней следовала группа 1 с $0,40 \pm 0,50\%$ и группа 5 с $0,68 \pm 1,15\%$. Группы 2, 3, 7 и 8 обладали самым высоким средним % повреждений легких ($\geq 7,27\%$). Каждая из этих четырех групп содержала одного поросенка с % повреждений легких $\geq 71,5\%$, что смещало результаты для этих четырех групп в сторону более высоких. За исключением группы 9 с обнаружением 0% повреждений легких, остальные 8 групп обладали $\leq 36\%$ повреждений легких. Почти все обнаруженные повреждения легких описывали как красные/пурпурные и консолидированные.

Таблица 12. Обобщение частоты проявлений желтухи в группах, частоты проявлений язвы желудка в группах, среднего % баллов повреждений легких в группах и частоты проявлений обнаруженных повреждений легких в группах

Группа	Воздействие	Желтуха	Язвы желудка	Средний % повреждений легких	Частота проявлений обнаруженных повреждений легких
1	vORF2 - 16 мкг (1 доза)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	$0,40 \pm 0,50\%$	10/12 (83%)
2	vORF2 - 8 мкг (1 доза)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	$7,41 \pm 20,2\%$	10/12 (83%)
3	vORF2 - 4 мкг (1 доза)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	$9,20 \pm 20,9\%$	10/12 (83%)
4	rORF2 - 16 мкг (1 доза)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	$1,5 \pm 4,74\%$	4/11 (36%)

5	5	rORF2 - 8 мкг (1 доза)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	0,68±1,15%	9/12 (75%)
6	6	rORF2 - 4 мкг (1 доза)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	2,95±5,12%	7/11 (64%)
7	7	KV (2 дозы)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	7,27±22,9%	9/12 (75%)
8	8	Контроли заражения	0/10 (0%)	0/10 (0%)	9,88±29,2%	8/10 (80%)

9	9	Строгие отрицательные кон- троли	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)
---	---	-------------------------------------	--------------	--------------	--------------	--------------

vORF2 = выделенный вирусный ORF2; rORF2 = рекомбинантный экспрессированный в бакуловирусе ORF2; убитый вирус с
цельными клетками = вирус PCV2, выращенный в подходящей культуре клеток

Обобщение частоты положительных результатов ИНС в группах показано в таблице 13. Группа 1 (vORF2 - 16 мкг) и группа 5 (rORF2 - 8 мкг) обладали самой низкой долей положительных результатов ИНС (16,7%). Группа 8 (контроли заражения) и группа 9 (строгие отрицательные контроли) обладали наивысшей долей положительных результатов ИНС, 90% и 90,9%, соответственно.

Таблица 13. Обобщение частоты положительных результатов ИНС в группах

Группа	Воздействие	N	Число поросят по меньшей мере с одной положительной по PCV2 тканью	Частота проявления
1	vORF2 - 16 мкг (1 доза)	12	2	16,7%
2	vORF2 - 8 мкг (1 доза)	12	3	25,0%
3	vORF2 - 4 мкг (1 доза)	12	8	66,7%
4	rORF2 - 16 мкг (1 доза)	11	4	36,3%

5	rORF2 - 8 мкг (1 доза)	12	2	16,7%
6	rORF2 - 4 мкг (1 доза)	11	4	36,4%
7	KV (2 дозы)	12	5	41,7%
8	Контроли заражения	10	9	90,0%
9	Строгие отрицательные контроли	11	10	90,9%

vORF2 = выделенный вирусный ORF2; rORF2 = рекомбинантный экспрессированный в бакуловирусе ORF2; KV или убитый вирус с
цельными клетками = вирус PCV2, выращенный в подходящей культуре клеток

После заражения группа 5, где вводили одну дозу из 8 мкг антигена rORF2, являлась лучшей, чем другие 6 групп с вакциной. Группа 5 обладала наивысшим ADWG (0,94±0,22 фунтов/сутки), самой низкой частотой проявления аномального поведения (0%), второй из самых низких частот проявления кашля (8,3%), самой низкой частотой проявления общих клинических симптомов (8,3%), самым низким уровнем смертности (0%), самым низким процентом назального выделения PCV2 (8,3%), вторым из самых низких средним % повреждений легких (0,68±1,15%) и самой низкой частотой проявления положительных тканей (16,7%). Группы после введения различных уровней антигена rORF2 в целом являлись лучшими, чем группы после введения различных уровней vORF2, и группа после введения 2 доз убитой цельноклеточной вакцины PCV2 являлась наихудшей. Таблицы 14 и 15 содержат обобщения данных для групп после заражения.

Таблица 14. Обобщение данных для групп после заражения - Часть 1

Группа	N	Воздействие	ADWG (фунтов/сутки)	Аномальное поведение	Кашель	Общая частота проявлений клинических симптомов
1	12	vORF2 - 16 мкг (1 доза)	0,87±0,29	2/12 (16,7%)	3/12 (25%)	41,7%
2	12	vORF2 - 8 мкг (1 доза)	0,70±0,32	4/12 (33,3%)	1/12 (8,3%)	41,7%
3	12	vORF2 - 4 мкг (1 доза)	0,49±0,21	8/12 (66,7%)	2/12 (16,7%)	66,7%
4	11	rORF2 - 16 мкг (1 доза)	0,84±0,30	3/11 (27,3%)	0/11 (0%)	36,4%

5	12	rORF2 - 8 мкг (1 доза)	0,94±0,22	0/12 (0%)	1/12 (8,3%)	8,3%
6	11	rORF2 - 4 мкг (1 доза)	0,72±0,25	1/11 (9,1%)	0/11 (0%)	9,1%
7	12	KV (2 дозы)	0,50±0,15	7/12 (58,3)	0/12 (0%)	58,3%
8	10	Контроли заражения	0,76±0,19	1/10 (10%)	2/10 (20%)	40%
9	11	Строгие отрицательные контро- ли	1,06±0,17	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0%

vORF2 = выделенный вирусный ORF2; rORF2 = рекомбинантный экспрессированный в бакуловирусе ORF2; KV или убитый вирус с цельными клетками = вирус PCV2, выращенный в подходящей культуре клеток

Таблица 15. Обобщение данных для групп после заражения - Часть 2

Группа	N	Воздействие	Уровень смертно- сти	Назальное выде- ление	Средний % поврежде- ний легких	Частота появления по меньшей мере одной тка- ни, положительной по PCV2 в ИНС
1	12	vORF2 - 16 мкг (1 доза)	8,3%	8,3%	0,40±0,50%	16,7%
2	12	vORF2 - 8 мкг (1 доза)	8,3%	8,3%	7,41±20,2%	25,0%
3	12	vORF2 - 4 мкг (1 доза)	0%	8,3%	9,20±20,9%	66,7%
4	11	rORF2 - 16 мкг (1 доза)	0%	18,2%	1,50±4,74%	36,3%
5	12	rORF2 - 8 мкг (1 доза)	0%	8,3%	0,68±1,15%	16,7%
6	11	rORF2 - 4 мкг (1 доза)	9,1%	9,1%	2,95±5,12%	36,4%
7	12	KV (2 дозы)	16,7%	41,7%	7,27±22,9%	41,7%
8	10	Контроли заражения	10%	80%	9,88±29,2%	90,0%
9	11	Строгие отрицательные контроли	0%	63,6%	0/11 (0%)	90,9%

vORF2 = выделенный вирусный ORF2; rORF2 = рекомбинантный экспрессированный в бакуловирусе ORF2; KV или убитый вирус с цельными клетками = вирус PCV2, выращенный в подходящей культуре клеток

Результаты данного исследования показывают, что все дальнейшие работы по получению вакцины должны фокусироваться на вакцине rORF2. В целом, после заражения выявляли назальное выделение PCV2, и вакцинация вакциной PCV2 приводила к уменьшению выделения. Иммуногистохимия выбранных лимфоидных тканей также служила хорошим параметром эффективности вакцины, тогда как больших различий в ADWG, клинических симптомах и макроскопических очагах между группами не обнаружено. Данное исследование осложнялось фактом, что в какой-то точке во время исследования был введен посторонний PCV2, как очевидно по назальному выделению PCV2, сероконверсии PCV2 и положительных по ИНС тканей в группе 9, группе строгого отрицательного контроля.

Обсуждение

В данном исследовании оценивали семь вакцин PCV2, которые включали в себя три различных уровня дозы антигена vORF2, введенные однократно на сутки 0, три различных уровня дозы антигена rORF2, введенные однократно на сутки 0 и один уровень дозы убитой цельноклеточной вакцины PCV2, введенный на сутки 0 и сутки 14. В общем, группа 5, которой вводили 1 дозу вакцины, содержащей 8 мкг антигена rORF2, обладала наилучшими результатами. Группа 5 обладала наивысшим ADWG, самой низкой частотой проявления аномального поведения, самой низкой частотой проявления аномального дыхания, второй из самых низких частот проявления кашля, самой низкой частотой проявления общих клинических симптомов, самым низким уровнем смертности, самой низкой частотой назального выделения PCV2, второй из самых низких долей среднего % повреждений легких и самой низкой частотой

проявления положительных по ИНС тканей.

Интересно, что группа 4, в которой вводили более высокую дозу антигена rORF2, чем в группе 5, не проявляла такие же хорошие, или лучшие, качества, чем группа 5. Группа 4 обладала немного более низкой ADWG, более высокой частотой проявления аномального поведения, более высокой частотой проявления общих клинических симптомов, более высокой частотой назального выделения PCV2, более высоким средним % повреждений легких, и более высокой долей положительных по ИНС тканей, чем группа 5. Статистических анализов, которые могли бы показать, что различия между этими двумя группами не являлись статистически значимыми, для этих данных не проводили, но обнаружили тенденцию, что группа 4 не проявляла такие же хорошие качества, как группа 5.

После вакцинации 6 поросят умерли в первом центре исследования. Четыре из шести поросят происходили из группы 8 или группы 9, которым не вводили вакцины. Ни для одного из шести поросят не показали повреждений, связанных с PMWS, не описано неблагоприятных событий и в общем, все семь вакцин, по-видимому, являлись безопасными при введении поросят в возрасте приблизительно 11 суток. Во время фазы исследования после вакцинации поросята после введения либо вакцины vORF2 на уровне трех доз, либо убитой цельноклеточной вакцины, обладали самыми высокими уровнями IFAT, в то время как группа 5 обладала самыми низкими из групп с вакцинами уровнями IFAT непосредственно перед заражением.

Хотя это формально не доказано, считают, что преобладающим путем переноса PCV2 к молодой свинье вскоре после отъема от свиноматки является непосредственный контакт, и эффективная вакцина, уменьшающая назальное выделение PCV2 при налаживании производства, будет помогать контролировать распространение инфекции. Группы после введения одного из трех уровней антигена vORF2 и группа после введения 8 мкг rORF2 обладали самой низкой частотой проявления назального выделения PCV2 (8,3%). Как и следовало ожидать, группа контроля заражения обладала наивысшей низкой частотой проявления назального выделения (80%).

Макроскопические повреждения у поросят с PMWS, вторичным по отношению к инфекции PCV2, как правило, состоят в генерализованной лимфаденопатии в сочетании с одним или несколькими из следующего: (1) интерстициальной пневмонии с интерлобулярным отеком, (2) бледности кожных покровов или желтухи, (3) мозаичной атрофической печени, (4) язвы желудка и (5) нефрита. При вскрытии желтухи, гепатита, нефрита и язвы желудка не обнаружили ни для одной из групп, а лимфаденопатию специально не обследовали. Средний % степени повреждения легких различался между группами. Группа после введения 16 мкг vORF2 обладала самым низким % степени повреждения легких ($0,40 \pm 0,50\%$), за ней следовала группа после введения 8 мкг rORF2 ($0,68 \pm 1,15\%$). Как ожидали, группа контроля заражения обладала самым высоким средним % степени повреждения легких ($9,88 \pm 29,2\%$). Во всех четырех группах, средние % степени повреждения легких являлись повышенными из-за одного поросенка в каждой из этих групп, обладающего очень высокими степенями повреждения. Большинство повреждений легких описывали как красные/пурпурные и консолидированные. Как правило, повреждения легких, связанные с PMWS, описывают как коричневые и не деформированные интерлобулярным отеком. Повреждения легких, обнаруженные в данном исследовании, либо являлись не связанными с инфекцией PCV2, либо мог присутствовать второй легочный инфекционный агент. В контексте данного исследования % степени повреждения легких не отражает истинного измерения степени инфекции легких из-за PCV2.

Другие исследователи показали прямую корреляцию между присутствием антигена PCV2 по ИНС и гистопатологией. В этом исследовании не проводили гистопатологического исследования избранных тканей. Группа 1 (16 мкг vORF2) и группа 5 (8 мкг rORF2) обладали самой низкой частотой проявления поросят, положительных по антигену PCV2 (8,3%), тогда как группа 9 (группа строгого отрицательного контроля - 90,9%) и группа 8 (группа контроля заражения - 90,0%) обладали самыми высокими частотами проявления поросят, положительных по антигену PCV2. Из-за не субъективного характера этого теста, результаты ИНС, возможно представляют собой одни из лучших параметров для суждения об эффективности вакцины.

Таким образом, в одном аспекте настоящего изобретения определяли минимальную защитную дозу (MPD) как 1 мл/1 дозу рекомбинантного продукта с выделенным антигеном ORF2 PCV2 (rORF2) на модели поросят CDCD под угрозой заражения PCV2. Из трех групп после введения различных уровней антигена rORF2, группа 5 (8 мкг антигена rORF2) явно обладала самым высоким уровнем защиты. Группа 5 либо обладала наилучшими результатами, либо тесно примыкала к наиболее благоприятным результатам по отношению ко всем оцениваемым параметрам. При сравнении группы 5 с другими шестью группами с вакциной группы после заражения, группа 5 обладала самым высоким ADWG (0,94±0,22 фунтов/сутки), самой низкой частотой проявления аномального поведения (0%), второй из самых низких частот проявления кашля (8,3%), самой низкой частотой проявления общих клинических симптомов (8,3%), самым низким уровнем смертности (0%), самым низким уровнем назального выделения PCV2 (8,3%), второй из самых низких степеней среднего % повреждений легких (0,68±1,15%) и самой низкой частотой проявления положительных по ИНС тканей (16,7%).

В другом аспекте настоящего изобретения определяли MPD как 1мл/1 дозу общепринятого продукта, который представляет собой частично очищенный антиген ORF2 PCV2 (vORF2), на модели поросят CDCD под угрозой заражения PCV2. Из трех групп после введения различных уровней антигена vORF2, группа 1 (16 мкг vORF2) обладала наивысшим уровнем защиты. Группа 1 превосходила группы 2 и 3 в отношении ADWG, среднего % повреждений легких и ИНС. Группы 1 и 2 (8 мкг антигена vORF2) являлись одинаковыми по отношению к общей частоте проявления клинических симптомов, группа 3 (4 мкг антигена vORF2) обладала самым низким уровнем смертности, и все три группы являлись одинаковыми по отношению к назальному выделению. В целом, вакцины с vORF не действовали так хорошо, как вакцины rORF.

В другом аспекте настоящего изобретения определяли эффективность максимальной дозы как 2 мл/2 дозы общепринятой убитой вакцины PCV2 на модели поросят CDCD под угрозой заражения PCV2. Из семи вакцин, оцениваемых в данном исследовании, убитая цельноклеточная вакцина PCV2 действовала хуже всего. Поросята после введения двух доз убитой цельноклеточной вакцины PCV2 обладали самым низким ADWG, второй из самых высоких степеней аномального поведения (58,3%), второй из самых высоких общих частот проявления общих клинических симптомов (58,3%), самым высоким уровнем смертности (16,7%), второй из самых высоких частот проявления назального выделения (41,7%), наивысшим средним % повреждений легких (9,88±29,2%), высокой частотой проявления описанных повреждений легких (75%) и умеренной частотой проявления положительной ИНС в тканях (41,7%). Однако, она еще являлась эффективной для вызывания иммунного ответа.

В другом аспекте настоящего изобретения назальное выделение PCV2 оценивали как параметр эффективности и снова подтверждали предшествующие параметры

эффективности PCV2 из предыдущих исследований. Результаты данного исследования показывают, что назальное выделение PCV2 происходит после интраназального заражения, и что вакцины PCV2 снижают назальное выделение PCV2 после заражения. Более того, результаты данного исследования и публикации в литературе показывают, что ИИС следует также продолжать использовать для оценки будущих испытаний вакцины PCV2.

Некоторыми дополнительными заключениями, возникающим из данного исследования, является то, что лимфаденопатия является одним из отличительных признаков PMWS. Другим отличительным признаком PMWS является лимфоидное истощение и многоядерные/гигантские гистиоциты. Кроме того, не обнаружено неблагоприятных событий или реакций в участке инъекции для какой-либо из 7 вакцин PCV2, и все 7 PCV2 вакцин, по-видимому являлись безопасными при введении молодым пороссятам.

ПРИМЕР 5

В этом примере тестировали эффективность восьми вакцин-кандидатов с PCV2 и снова подтверждали параметры заражения PCV2 из предыдущих исследований заражения после воздействия вирулентного штамма PCV2. Сто пятьдесят (150) извлеченных кесаревым сечением, не получающих молозива (CDCD) поросят в возрасте 6-16 суток группировали по массе и случайно распределяли на 10 групп равного размера. В таблице 16 описана общая структура исследования для данного примера.

Таблица 16. Общая структура исследования

Группа	Число поросят	Воздействие	Сутки воздействия	KLH/ICFA на сутки 21 и сутки 28	Заражение вирулентным PCV2 на сутки 25	PRRSV MLV на сутки 46	Вскрытие на сутки 50
1	15	PCV2 вакцина 1 16 мкг rORF2-IMS 1314	0 и 14	+	+	+	+
2	15	PCV2 вакцина 2 16 мкг vORF2-карбопол	0 и 14	+	+	+	+
3	15	PCV2 вакцина 3 16 мкг rORF2-карбопол	0 и 14	+	+	+	+
4	15	PCV2 вакцина 2 16 мкг vORF2-карбопол	0	+	+	+	+
5	15	PCV2 вакцина 3 4 мкг rORF2-карбопол	0 и 14	+	+	+	+
6	15	PCV2 вакцина 3 1 мкг rORF2-карбопол	0 и 14	+	+	+	+
7	15	PCV2 вакцина 3 0,25 мкг rORF2-карбопол	0 и 14	+	+	+	+
8	15	PCV2 вакцина 4 >8,0 log мкг KV-карбопол	0 и 14	+	+	+	+
9	15	Контроли заражения	N/A	+	+	+	+
10	15	Нет - Группа строгого отрицательного контроля	N/A	+	-	+	+

vORF2 = выделенный вирусный ORF2; rORF2 = рекомбинантный экспрессированный в бакуловирусе ORF2; KV или убитый вирус с цельными клетками = вирус PCV2, выращенный в подходящей культуре клеток

Вакцинные составы, введенные в каждой группе, являлись следующими. PCV2 вакцина № 1, введенная в 1×2 мл дозе в группе 1, представляла собой высокую дозу (16 мкг/2 мл дозу) инактивированного рекомбинантного антигена ORF2 с адьювантом IMS 1314 (16 мкг rORF2 - IMS 1314). PCV2 вакцина № 2, введенная в 1×2 мл дозе в группе 2, представляла собой высокую дозу (16 мкг/2 мл дозу) частично очищенного полученного в VIDO R-1 антигена ORF2 PCV2, смешанного с адьювантом карбополом (16 мкг vORF2 - карбопол). PCV2 вакцина № 3, введенная в 1×2 мл дозе в группе 3, представляла собой высокую дозу (16 мкг/2 мл дозу) инактивированного рекомбинантного антигена ORF2,

смешанного с адьювантом карбополом (16 мкг rORF2 - карбопол). PCV2 вакцина № 4, введенная в 1×1 мл дозе в группе 4, представляла собой высокую дозу (16 мкг/1 мл дозу) частично очищенного полученного в VIDO R-1 антигена ORF2 PCV2, смешанного с адьювантом карбополом (16 мкг vORF2 - карбопол). Вакцина № 5, введенная в 1×2 мл в дозе в группе 5, представляла собой 4 мкг/2 мл дозу инактивированного рекомбинантного антигена ORF2, смешанного с адьювантом карбополом (4 мкг rORF2 - карбопол). PCV2 вакцина № 6, введенная в 1×2 мл в дозе в группе 6, представляла собой 1 мкг/2 мл дозу инактивированного рекомбинантного антигена ORF2, смешанного с адьювантом карбополом (1 мкг rORF2 - карбопол). PCV2 вакцина № 7, введенная в 1×2 мл в дозе в группе 7, представляла собой низкую дозу (0,25 мкг/2 мл дозу) инактивированного рекомбинантного антигена ORF2, смешанного с адьювантом карбополом (0,25 мкг rORF2 - карбопол). PCV2 вакцина № 8, введенная в 1×2 мл дозе в группе 8, представляла собой высокую дозу (титр перед инактивацией >8,0 log/2 мл дозу) инактивированного общепринятого убитого полученного в VIDO R-I антигена PCV2 Struve, смешанного с адьювантом карбополом (>8,0 log KV - карбопол). На сутки 0, группы 1-8 обрабатывали предназначенными для них вакцинами. В группах 1-3 и 5-8 снова вводили вторичные инъекции их соответствующих вакцин на сутки 14. Эффективность однократной дозы 16 мкг vORF2 - карбопола тестировали в группе 4, в которой не вводили вторичную инъекцию на сутки 14. У поросят обследовали неблагоприятные события и реакции в участке инъекции после обеих вакцинаций. На 21 сутки поросят переводили во второй центр проведения исследования, где группы 1-9 являлись группами, содержащимися в одном здании, а группу 10 содержали в отдельном здании. Всем поросётам вводили гемоцианин морского блюдечка, эмульгированный с неполным адьювантом Фрейнда (KLH/ICFA) на 22 и 28 сутки. На 25 сутки группы 1-9 заражали приблизительно 4 log вирулентного вируса PCV2. К 46 суткам в группе контрольного заражения произошло очень мало смертей. В попытке иммуностимулировать поросят и увеличить вирулентность материала заражения PCV2 все группы обрабатывали INGELVAC® PRRSV MLV (вакциной свиного респираторно-репродуктивного синдрома, модифицированным живым вирусом) на сутки 46. До и после заражения собирали образцы крови для серологического исследования PCV2. После заражения собирали данные по массе тела для определения среднего ежесуточного прироста массы (ADWG) и данные по обследованию клинических симптомов. На сутки 50 всех выживших поросят подвергали вскрытию, документировали очаги в легких, получали количественную оценку патологии легких и избранные ткани фиксировали в формалине для иммуногистохимического (ИНС) анализа для детекции антигена PCV2 позднее.

Материалы и методы

Это являлось частично слепым анализом осуществимости вакцинации-заражения, проведенным на CDCD поросятах в возрасте 6-16 суток на сутки 0. Титры PCV2 по IFA у свиноматок для включения в исследование составляли $\leq 1:1000$. Кроме того, по серологическому статусу свиноматки происходили из известного PRRS-отрицательного стада. У шестнадцати (16) свиноматок тестировали серологический статус для PCV2, все шестнадцать (16) обладали титром PCV2 ≤ 1000 , и их перевели в первый центр исследования. Сто пятьдесят (150) поросят извлекли операциями кесарева сечения, и они являлись доступными для данного исследования на сутки - 3. На сутки -3 150 поросят CDCD в первом центре исследования взвешивали, помечали ушными бирками, группировали по массе и случайно распределяли по группам 1-10, как указано выше в таблице 16. Если какое-либо животное, удовлетворяющее критериям включения,

регистрировали для исследования, а затем исключали по какой-либо причине, исследователь и контролер консультировались, чтобы определить применимость данных, собранных для этого животного, в конечном анализе. Дату исключения зарегистрированных поросят и причину исключения документировали. Ни одной из свиноматок, удовлетворяющих критериям включения, отобранных для исследования и транспортированных в первый центр исследования, не исключили. Ни одного поросенка не исключили из исследования, и ни одного тестируемого животного не удаляли из исследования перед прекращением. В таблице 17 описаны временные рамки для ключевых операций из данного примера.

Таблица 17. Операции исследования

Сутки исследования	Действительные даты	Операции исследования
-3	4-04-03	Взвешивали поросят; обследовали по состоянию здоровья; Случайно распределяли по группам; Собирали образцы крови
-3, 0-21	4-04-03 4-07-03- 5-27-03	Обследовали общее состояние здоровья и неблагоприятные события после вакцинации
0	4-07-03	Вводили соответствующие IVP группам 1-8
0-7	4-07-03- 4-14-03	Обследовали поросят на реакции в участке инфекции
14	4-21-03	Проводили вторичное введение в группах 1-3, 5-8 соответствующих IVP; Отбирали образцы крови от всех поросят
14-21	4-21-03- 4-28-03	Обследовали поросят на реакции в участке инфекции
19-21	4-26-03- 4-28-03	Обрабатывали всех поросят антибиотиками
21	4-28-03	Поросят транспортировали из Sturbe Labs, Inc в Veterinary Resources, Inc. (VRI)
22-50	4-07-03- 5-27-03	Обследовали поросят на клинические признаки после заражения
22	4-29-03	Обрабатывали группы 1-10 KLN/ICFA
25	5-02-03	Собирали образцы крови от всех поросят; Взвешивали всех поросят; заражали группы 1-9 материалом PCV2 для заражения
28	5-05-03	Обрабатывали группы 1-10 KLN/ICFA
32	5-09-03	Собирали образцы крови от всех поросят
46	5-23-03	Вводили INGELVAC® PRRS MLV во всех группах
50	5-27-03	Собирали образцы крови, взвешивали и проводили вскрытие всех поросят; отмечали макроскопические повреждения; оценивали повреждения легких; сохраняли свежие и фиксированные формалином образцы тканей; Завершали прижизненную фазу исследования

После завершения прижизненной фазы исследования патолог исследовал фиксированные формалином ткани посредством иммуногистохимии (ИНС) для детекции антигена PCV2, PCV2 в образцах крови определяли серологически, и определяли средний прирост массы (ADWG) от 25 суток до 50 суток.

В первом центре исследования животных содержали в индивидуальных клетках в семи комнатах от рождения до возраста приблизительно 11 суток (приблизительно 0 сутки исследования). Все комнаты являлись идентичными по планировке и содержали стеллажи с индивидуальными клетками из нержавеющей стали с подогретым и фильтрованным воздухом, поставляемым отдельно к каждой отдельной единице. Каждая комната обладала отдельным нагреванием и вентиляцией, таким образом предупреждали перекрестную контаминацию воздуха между комнатами. Во втором центре исследования животных содержали в двух различных зданиях. Группу 10 (группу строгого отрицательного контроля) содержали отдельно в переоборудованном помещении для

молодняка, а группы 1-9 содержали в переоборудованном свинарнике для опороса. Каждую группу содержали в отдельном загоне (14-15 поросят на загон), и в каждом загоне обеспечивали приблизительно 2,3 квадратных фута на поросенка. Группы 2, 4 и 8 содержали в трех соседних загонах на одной стороне прохода, а группы 1, 3, 5, 6, 7, и 9 содержали в шести соседних загонах на другой стороне прохода. Разделение групп выполняли из-за опасений контролера исследования, что вакцины, вводимые группам 2, 4 и 8, не являлись полностью инактивированными. Каждый загон находился на приподнятом настиле с полами из пластиковых плит. Углубление под загонами служило резервуаром для экскрементов и мусора. Каждое здание обладало собственными системами нагрева и вентиляции, с небольшой вероятностью перекрестной контаминации воздуха между зданиями.

В первом центре исследования поросят кормили специально составленным молочным рационом от рождения до возраста приблизительно 3 недель. К 21 суткам (возраст приблизительно 4 ½ недели) все поросята потребляли твердый, специально смешанный рацион. Во втором центре исследования всех поросят кормили составленным на заказ не содержащим лекарственных веществ коммерческим смешанным рационом, подходящим для их возраста и массы, по желанию. Вода в обоих центрах исследования также являлась доступной по желанию.

Всем тестируемым поросятам вводили 1,0 мл NAXCEL®, IM, в меняющиеся бедра, на сутки 19, 20 и 21. Кроме того, поросенку № 11 (группа 1) вводили 0,5 мл of NAXCEL® IM на сутки 10, поросенку № 13 (группа 10) вводили 1 мл пенициллина и 1 мл PREDEF® 2X на сутки 10, поросенку № 4 (группа 9) вводили 1,0 мл NAXCEL® IM на сутки 11, и каждому из поросят 1 (группа 1), 4 и 11 вводили 1,0 мл NAXCEL® на сутки 14 по различным медицинским причинам.

В это время в обоих центрах исследования поросята находились под наблюдением ветеринара. Обследование состояния здоровья животных проводили на сутки -3 и документировали в форме записи обследования состояния здоровья. Все животные обладали хорошим здоровьем и состоянием питания перед вакцинацией, как определяли обследованием на сутки 0. Все тестируемые животные, как обследовано, находились с хорошим здоровьем и состоянием питания перед заражением. Скелеты и ткани утилизировали в салотопке. Последнее размещение исследуемых животных записывали в протоколе размещения животных.

На сутки 0 и 14 поросятам, записанным в группы 1-3 и 5-8, вводили 2,0 мл назначенных вакцин PCV2 1-4, соответственно, IM в область шеи справа и слева, соответственно, с использованием стерильного 3,0 мл шприца с наконечником Люэра и стерильной иглы 20g × ½". Поросятам, записанным в группу 4, вводили 1,0 мл вакцины PCV2 № 2, IM в область шеи справа с использованием стерильного 3,0 мл шприца с наконечником Люэра и стерильной иглы 20g × ½" только на сутки 0.

На сутки 22 всем тестируемым поросятам вводили 2,0 мл KLN/ICFA IM в область шеи слева с использованием стерильного 3,0 мл шприца с наконечником Люэра и стерильной иглы 20g × 1". На сутки 28 всем тестируемым поросятам вводили 2,0 мл KLN/ICFA в область правого бедра с использованием стерильного 3,0 мл шприца с наконечником Люэра и стерильной иглы 20g × 1".

На сутки 25 поросятам, записанным в группы 1-9, вводили 1,0 мл материала для заражения PCV2 ISUVDL (3,98 log₁₀ TCID₅₀/мл) IM в область шеи справа с использованием стерильного 3,0 мл шприца с наконечником Люэра и стерильной иглы 20g × 1". Дополнительный 1,0 мл того же самого материала вводили IN каждому поросенку (0,5 мл на ноздрю) с использованием стерильного 3,0 мл шприца с

наконечником Люэра и назальной канюли.

На сутки 46 всем тестируемым пороссятам вводили 2,0 мл INGELVAC® PRRS MLV, IM в область шеи справа с использованием стерильного 3,0 мл шприца с наконечником Люэра и стерильной иглы 20g × 1". PRRSV MLV вводили в попытке увеличить

5

вирулентность материала заражения PCV2. Тестируемых животных ежедневно обследовали по общему состоянию здоровья и наличию неблагоприятных событий на сутки -3 и 0 суток до 21 суток. У каждого поросенка количественно оценивали нормальное или аномальное поведение, дыхание или кашель. Обследования документировали в протоколе клинических обследований. 10 Всех тестируемых пороссят обследовали от суток 0 до суток 7, и группу 7 дополнительно обследовали от 14 до 21 суток по реакциям в участке инъекций. Средний ежесуточный прирост массы определяли взвешиванием каждого поросенка по калибровочной шкале на сутки -3, 25 и 50, или на сутки, в которые поросенка находили мертвым после 15 заражения. Массу тела записывали в форму массы тела. Массу тела на сутки -3 использовали для разделения пороссят на группы перед рандомизацией. Данные массы на 25 сутки и 50 сутки использовали для определения среднего ежесуточного прироста массы (ADWG) для каждого поросенка во время этих временных точек. Для пороссят, умерших после заражения и перед 50 сутками, ADWG подгоняли, чтобы представлять ADWG от 25 суток до суток смерти.

20

Для серологического определения PCV2, у каждого поросенка отбирали цельную кровь из вены из орбитальных венозных синусов на сутки -3 и 14. У каждого поросенка кровь отбирали из орбитального венозного синуса посредством введения стерильной капиллярной трубки в срединный угол глазной щели одного из глаз и отвода 25

25

На сутки 25, 32 и 50, цельную венозную кровь собирали у каждого поросенка из передней 30

30

полной вены с использованием стерильной иглы для Vacutainer® с 20 g × 1½" (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey), держателя иглы для Vacutainer® и 13 мл SST. Отборы крови в каждой временной точке регистрировали в протоколе сбора образцов. Крови в каждой SST позволяли свертываться, затем каждую SST центрифугировали и собирали сыворотку. Собранную сыворотку переносили в стерильную защелкивающуюся пробирку и хранили при -70±10°C до тестирования в более поздней дате. В образцах сыворотки персонал BIVI-R&D тестировал присутствие антител к PCV2.

35

У пороссят один раз в сутки от 22 суток до 50 суток наблюдали клинические симптомы и количественно оценивали нормальное или аномальное поведение, дыхание или кашель. Клинические обследования документировали в протоколе клинических обследований.

Пороссята № 46 (группа 1) и 98 (группа 9) умерли в первом центре исследования. Обе эти смерти классифицировали как смерти от кровотечения, и вскрытия для этих двух пороссят не проводили. Во втором центре исследования проводили вскрытия пороссят, умерших после заражения и до 50 суток, и пороссят, подвергнутых эвтаназии на 50 сутки. Отмечали любые макроскопические повреждения, и процент долей легкого с повреждениями документировали в форме протокола вскрытия.

40

От каждого из пороссят, вскрытых во втором центре исследования, по образцу ткани из миндалина, легкого, сердца, печени, брыжеечного лимфатического узла, почки и пахового лимфатического узла помещали в отдельный контейнер с забуференным 10% формалином; в то же время другой образец ткани из вышеупомянутых органов помещали в Whirl-pak® (M-Tech Diagnostics Ltd., Thelwall, UK) и каждый Whirl-pak® помещали в лед. Каждый контейнер соответствующим образом помечали. Сбор

45

образцов документировали в форме протокола вскрытия. Затем фиксированные в формалине образцы и форму диагностического запроса принимали для тестирования ИНС. Тестирование ИНС проводили согласно стандартным лабораторным способам для получения образцов, подготовки образца и стекла и способов окрашивания. Свежие образцы в Whirl-pak® посылали вместе с пакетами со льдом контролеру исследования для хранения ($-70^{\circ}\pm 10^{\circ}\text{C}$) и возможного будущего использования.

Фиксированные в формалине ткани исследовал патолог для детекции PCV2 посредством ИНС и оценивал с использованием следующей системы баллов: 0 = нет; 1 = ограниченное положительное окрашивание, мало участков; 2 = умеренное положительное окрашивание, множественные участки; и 3 = обильное положительное окрашивание, распространенное по всей ткани. Для аналитических целей балл 0 считали «отрицательным», а балл больше 0 считали «положительным».

Результаты

Результаты для данного примера приведены ниже. Отмечено, что поросята № 46 и 98 умерли на сутки 14 и 25, соответственно. Эти смерти классифицировали как смерти от кровотечения. Поросята № 11 (группа 1) задыхался от частого дыхания на сутки 15. В остальном, все поросята являлись нормальными по поведению, дыханию и кашлю во время этого периода наблюдений, и ни в какой группе не обнаружили системных неблагоприятных событий. После вакцинации на сутки 0 не обнаружили реакций в участке инъекции. После вакцинации на сутки 14 у семи (7) из четырнадцати (14) поросят группы 1 (50,0%) обнаружили припухлость с баллом «2» на сутки 15. Четыре (4) из четырнадцати (14) в группе 1 (28,6%) еще обладали припухлостью с баллом «2» на сутки 16. Никто из других групп не испытывал реакций в участке инъекции после какой-либо вакцинации.

Результаты среднего прироста массы (ADWG) представлены ниже в таблице 18. Поросят № 46 и 98, умерших от кровотечения, исключили из результатов группы. Группа 4, которой вводили одну дозу 16 мкг vORF2-карбопола, обладала самым высоким ADWG ($1,16\pm 0,26$ фунтов/сутки), за ней следовали группы 1, 2, 3, 5, 6 и 10, обладающие ADWG в диапазоне от $1,07\pm 0,23$ фунтов/сутки до $1,11\pm 0,26$ фунтов/сутки. Группа 9 обладала самым низким ADWG ($0,88\pm 0,29$ фунтов/сутки), за ней следовали группы 8 и 7, обладающие ADWG $0,93\pm 0,33$ фунтов/сутки и $0,99\pm 0,44$ фунтов/сутки, соответственно.

Таблица 18. Обобщение среднего ежесуточного прироста массы в группах (ADWG)

Группа	Воздействие	N	ADWG - фунтов/сутки (сутки 25 - сутки 50) или с подстановкой для поросят, умерших до 50 суток
1	rORF2 - 16 мкг - IMS 1314 2 дозы	14	$1,08\pm 0,30$ фунтов/сутки
2	vORF2 - 16 мкг - карбопол 2 дозы	15	$1,11\pm 0,16$ фунтов/сутки
3	rORF2 - 16 мкг - карбопол 2 дозы	15	$1,07\pm 0,21$ фунтов/сутки
4	vORF2 - 16 мкг - карбопол 1 доза	15	$1,16\pm 0,26$ фунтов/сутки
5	rORF2 - 4 мкг - карбопол 1 доза	15	$1,07\pm 0,26$ фунтов/сутки
6	rORF2 - 1 мкг - карбопол 2 дозы	15	$1,11\pm 0,26$ фунтов/сутки
7	rORF2 - 0,25 мкг - карбопол 2 дозы	15	$0,99\pm 0,44$ фунтов/сутки
8	KV >8,0 log - карбопол 2 дозы	15	$0,93\pm 0,33$ фунтов/сутки
9	Контроли заражения	14	$0,88\pm 0,29$ фунтов/сутки
10	Строгие отрицательные контроли	15	$1,07\pm 0,23$ фунтов/сутки

vORF2 = выделенный вирусный ORF2; rORF2 = рекомбинантный экспрессированный в бакуловирусе ORF2; KV или убитый вирус с цельными клетками = вирус PCV2, выращенный в подходящей культуре клеток

Серологические результаты для PCV2 представлены ниже в таблице 19. Все десять (10) групп являлись серонегативными по PCV2 на сутки -3. На сутки 14 титры PCV2 оставались низкими для всех десяти (10) групп (в диапазоне 50-113). На сутки 25 группа

8, которой вводили убитую цельноклеточную вирусную вакцину, обладала самым высоким титром PCV2 (4617), за ней следовала группа 2, которой вводили 16 мкг vORF2 - карбопола, группа 4, которой вводили в однократной дозе 16 мкг vORF2 - карбопола, и группа 3, которой вводили 16 мкг rORF2 - карбопола, обладающие титрами 2507, 1920 и 1503, соответственно. На сутки 32 (одна неделя после заражения), титры для групп 1-6 и группы 8 лежали в диапазоне от 2360 до 7619; в то время как группы 7 (0,25 мкг rORF2 - карбопол), 9 (контроль заражения), и 10 (строгий отрицательный контроль) обладали титрами 382, 129 и 78 соответственно. На сутки 50 (сутки вскрытия), для всех десяти (10) группы показали высокие титры PCV2 (≥ 1257).

На сутки 25, 32, и 50 группа 3, которой вводили две дозы по 16 мкг rORF2-карбопола, обладали более высокими титрами антитела, чем группа 1, которой вводили две дозы по 16 мкг rORF2 - EVIS 1314. На сутки 25, 32 и 50 группа 2, которой вводили две дозы по 16 мкг vORF2, обладала более высоким титром, чем группа 4, которой вводили только одну дозу той же самой вакцины. Группы 3, 5, 6, 7, которым вводили увеличивающиеся уровни rORF2-карбопола по 16, 4, 1 и 0,25 мкг соответственно, обладали соответственно уменьшающимися титрами антитела на сутки 25 и 32

Таблица 19.Обобщение титров PCV2 в IFA в группах

Группа	Воздействие	Сутки -3	Сутки 14**	Сутки 25***	Сутки 32	Сутки 50****
1	rORF2 - 16 мкг - IMS 1314 2 дозы	50	64	646	3326	4314
2	vORF2 - 16 мкг - карбопол 2 дозы	50	110	2507	5627	4005
3	rORF2 - 16 мкг - карбопол 2 дозы	50	80	1503	5120	6720
4	vORF2 - 16 мкг - карбопол 1 доза	50	113	1920	3720	1257
5	rORF2 - 4 мкг - карбопол 1 доза	50	61	1867	3933	4533
6	rORF2 - 1 мкг - карбопол 2 дозы	50	70	490	2360	5740
7	rORF2 - 0,25 мкг - карбопол 2 дозы	50	73	63	382	5819
8	KV >8,0 log - карбопол 2 дозы	50	97	4617	7619	10817
9	Контроли заражения	50	53	50	129	4288
10	Строгие отрицательные контроли	50	50	50	78	11205

vORF2 = выделенный вирусный ORF2; rORF2 = рекомбинантный экспрессированный в бакуловирусе ORF2; KV или убитый вирус с цельными клетками = вирус PCV2, выращенный в подходящей культуре клеток
 *Для целей вычисления титр в IFA ≤ 100 обозначили как титр «50»; титр в IFA ≥ 6400 обозначили как титр в IFA «12800».
 **Сутки заражения
 ***Сутки вскрытия

Результаты клинических обследований после заражения представлены ниже. Таблица 20 содержит наблюдения аномального поведения, аномального дыхания, кашля и диареи. Таблица 21 содержит результаты из обобщения общей частоты проявления клинических симптомов в группах, а таблица 22 содержит результаты обобщения уровня смертности из обобщения уровней смертности в группах после заражения. Частота проявления аномального поведения, дыхания и кашля после заражения являлось низкой у поросят после введения 16 мкг rORF2-IMS 1314 (группа 1), 16 мкг rORF2-карбопола (группа 3), 1 мкг rORF2-карбопола (группа 6), 0,25 мкг rORF2-карбопола (группа 7), и у поросят в группе контроля заражения (группа 9). Частота проявления аномального поведения, дыхания и кашля после заражения равнялась нулю у поросят после введения 16 мкг vORF2-карбопола (группа 2), однократной дозы 16 мкг vORF2-карбопола (группа 4), 4 мкг rORF2-карбопола (группа 5), >8 log KV-карбопола (группа 8), и у поросят в группе строгого отрицательного контроля (группа 10).

Общая частота проявления клинических симптомов различалась между группами. Поросята после введения 16 мкг vORF2-карбопола (группа 2), однократной дозы 16 мкг vORF2-карбопола (группа 4), и поросят в группе строгого отрицательного контроля

(группа 10) обладали частотой проявления 0%; поросята после введения 16 мкг rORF2-карбопола (группа 3), и 1 мкг rORF2-карбопола (группа 6) обладали частотой проявления 6,7%; поросята после введения 16 мкг rORF2-IMS 1314 (группа 1) обладали общей частотой проявления 7,1%; поросята после введения 4 мкг rORF2-карбопола (группа 5), 0,25 мкг rORF2-карбопола (Группа 7), и >8 log вакцины KV обладали частотой проявления 13,3%; и поросята в группе контроля заражения (группа 9) обладали частотой проявления 14,3%.

Общие уровни смертности также отличались между группами. Группа 8, которой вводили 2 дозы вакцины KV, обладала наивысшим уровнем смертности 20,0%; за ней следовала группа 9, группа контроля заражения и группа 7, которым вводили 0,25 мкг rORF2-карбопола и которые обладали уровнями смертности 14,3% и 13,3%, соответственно. Группа 4, которой вводили одну дозу 16 мкг vORF2-карбопола, обладала 6,7% уровнем смертности. Все другие группы 1, 2, 3, 5, 6, и 10 обладали 0% уровнем смертности.

Таблица 20. Обобщение наблюдений в группах после заражения аномального поведения, аномального дыхания и кашля

Группа	Воздействие	N	Аномальное поведение ¹	Аномальное поведение ²	Кашель ³
1	rORF2 - 16 мкг - IMS 1314 2 дозы	14	0/14 (0%)	0/14 (0%)	1/14 (7,1%)
2	vORF2 - 16 мкг - карбопол 2 дозы	15	0/15 (0%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)
3	rORF2 - 16 мкг - карбопол 2 дозы	15	0/15 (0%)	0/15 (0%)	1/15 (6,7%)
4	vORF2 - 16 мкг - карбопол 1 доза	15	0/15 (0%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)
5	rORF2 - 4 мкг - карбопол 1 доза	15	1/15 (6,7%)	1/15 (6,7%)	0/15 (0%)
6	rORF2 - 1 мкг - карбопол 2 дозы	15	0/15 (0%)	0/15 (0%)	1/15 (6,7%)
7	rORF2 - 0,25 мкг - карбопол 2 дозы	15	0/15 (0%)	1/15 (6,7%)	1/15 (6,7%)
8	KV > 8,0 log - карбопол 2 дозы	15	1/15 (6,7%)	1/15 (6,7%)	0/15 (0%)
9	Контроли заражения	14	1/14 (7,1%)	1/14 (7,1%)	2/14 (14/3%)
10	Строгие отрицательные контроли	15	0/15 (0%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)

¹ Общее число поросят в каждой группе, для которых показали любое аномальное поведение по меньшей мере в течение одних суток

² Общее число поросят в каждой группе, для которых показали любое аномальное дыхание по меньшей мере в течение одних суток

³ Общее число поросят в каждой группе, для которых показали кашель по меньшей мере в течение одних суток

Таблица 21. Обобщение общей частоты проявления клинических симптомов

Группа	Воздействие	N	Доля поросят с клиническими симптомами ¹	Частота проявления
1	rORF2 - 16 мкг - IMS 1314 2 дозы	14	1	7,1%
2	vORF2 - 16 мкг - карбопол 2 дозы	15	0	0,0%
3	rORF2 - 16 мкг - карбопол 2 дозы	15	1	6,7%
4	vORF2 - 16 мкг - карбопол 1 доза	15	0	0,0%
5	rORF2 - 4 мкг - карбопол 1 доза	15	2	13,3%
6	rORF2 - 1 мкг - карбопол 2 дозы	15	1	6,7%
7	rORF2 - 0,25 мкг - карбопол 2 дозы	15	2	13,3%
8	KV >8,0 log - карбопол 2 дозы	15	2	13,3%

9	Контроли заражения	14	2	14,3%
10	Строгие отрицательные контроли	15	0	0,0%

vORF2 = выделенный вирусный ORF2; rORF2 = рекомбинантный экспрессированный в бакуловирусе ORF2; KV или убитый вирус с цельными клетками = вирус PCV2, выращенный в подходящей культуре клеток

¹ Общее число поросят в каждой группе, для которых показали любые клинические симптомы по меньшей мере в течение одних суток

5

Таблица 22. Обобщение уровня смертности в группах после заражения

Группа	Воздействие	N	Умерших после заражения	Уровень смертности
1	rORF2 - 16 мкг - IMS 1314 2 дозы	14	0	0,0%
2	vORF2 - 16 мкг - карбопол 2 дозы	15	0	0,0%
	rORF2 - 16 мкг - карбопол 2 дозы	15	0	0,0%
4	vORF2 - 16 мкг - карбопол 1 доза	15	1	6,7%
5	rORF2 - 4 мкг - карбопол 1 доза	15	0	0,0%
6	rORF2 - 1 мкг - карбопол 2 дозы	15	0	0,0%
7	rORF2 - 0,25 мкг - карбопол 2 дозы	15	2	13,3%
8	KV >8,0 log - карбопол 2 дозы	15	3	20,0%
9	Контроли заражения	14	2	14,3%
10	Строгие отрицательные контроли	15	0	0,0%

vORF2 = выделенный вирусный ORF2; rORF2 = рекомбинантный экспрессированный в бакуловирусе ORF2; KV или убитый вирус с цельными клетками = вирус PCV2, выращенный в подходящей культуре клеток

20

Обобщения среднего процента повреждения легких и предварительных диагнозов приведены ниже в таблице 23. Группа 9, группа контроля заражения, обладала самым высоким процентом повреждений легких со средним $10,81 \pm 23,27\%$, за ней следовала группа 7, которой вводили 0,25 мкг rORF2-карбопола и которая обладала средним $6,57 \pm 24,74\%$, группа 5, которой вводили 4 мкг rORF2-карбопола и которая обладала средним $2,88 \pm 8,88\%$, и группа 8, которой вводили вакцину KV и которая обладала средним $2,01 \pm 4,98\%$. Оставшиеся шесть (6) групп обладали более низким средним процентом повреждений легких в диапазоне от $0,11 \pm 0,38\%$ до $0,90 \pm 0,15\%$.

25

Предварительные диагнозы пневмонии различались между группами. Группа 3, которой вводили две дозы по 16 мкг rORF2-карбопола, обладала самым низким процентом предварительного диагноза пневмонии 13,3%. Группа 9, группа контроля заражения, обладала 50% предварительного диагноза пневмонии, за ней следовала группа 10, группа строгого отрицательного контроля и группа 2, которой вводили две дозы 16 мкг vORF2-карбопола, с 46,7% и 40%, соответственно, с предварительным диагнозом пневмония.

30

Группы 1, 2, 3, 5, 9 и 10 обладали 0% из групп с предварительным диагнозом инфекции PCV2; тогда как группа 8, которой вводили две дозы вакцины KV, обладала самой высокой долей в группе предварительного диагноза инфекции PCV2, 20%. Группа 7, которой вводили две дозы 0,25 мкг rORF2-карбопола, и группа 4, которой вводили одну дозу 16 мкг vORF2-карбопола, обладали предварительными диагнозами инфекции PCV2 в группе 13,3% и 6,7% из каждой группы, соответственно.

35

40

Язву желудка диагностировали только у одного поросенка в группе 7 (6,7%); в то время как другие группы оставались свободными от язвы желудка.

Таблица 23. Обобщение среднего % повреждений легких и частоты предварительного диагноза в группах

Группа	Воздействие	N	Число поросят с выделением по меньшей мере в течение одних суток	Частота проявления
1	rORF2 - 16 мкг - IMS 1314 2 дозы	15	0	0%
2	vORF2 - 16 мкг - карбопол 2 дозы	15	1	6,7%
3	rORF2 - 16 мкг - карбопол 2 дозы	15	3	20,0%

45

4	vORF2 - 16 мкг - карбопол 1 dose	15	2	13,3%
5	rORF2 - 4 мкг - карбопол 1 dose	15	3	20,0%
6	rORF2 - 1 мкг - карбопол 2 дозы	15	6	40,0%
7	rORF2 - 0,25 мкг - карбопол 2 дозы	15	7	46,7%
8	KV >8,0 log - карбопол 2 дозы	15	12	80%
9	Контроли заражения	14	14	100,0%
10	Строгие отрицательные контроли	15	14	93,3%

vORF2 = выделенный вирусный ORF2; rORF2 = рекомбинантный экспрессированный в бакуловире ORF2; KV или убитый вирус с цельными клетками = вирус PCV2, выращенный в подходящей культуре клеток

Обобщение частоты положительных результатов ИНС в группах показано ниже в таблице 24. Группа 1 (16 мкг rORF2 - IMS 1314) обладала самой низкой частотой в группе положительных результатов ИНС с 0% поросят, положительных по PCV2, за ней следовала группа 2 (16 мкг vORF2-карбопол) и группа 4 (однократная доза 16 мкг vORF2 - карбопола), обладающие частотами ИНС в группах 6,7% и 13,3%, соответственно. Группа 9, группа контроля заражения, обладала самой высокой долей проявления положительного ИНС с 100% поросят, положительных по PCV2, за ней следовала группа 10, группа строгого отрицательного контроля, и группа 8 (вакцина KV), с 93,3% и 80% поросят, положительных по PCV2, соответственно.

Таблица 24. Обобщение частоты положительных результатов ИНС в группах

Группа	Воздействие	N	Число поросят с выделением по меньшей мере в течение одних суток	Частота проявления
1	rORF2 - 16 мкг - IMS 1314 2 дозы	15	0	0%
2	vORF2 - 16 мкг - карбопол 2 дозы	15	1	6,7%
3	rORF2 - 16 мкг - карбопол 2 дозы	15	3	20,0%
4	vORF2 - 16 мкг - карбопол 1 доза	15	2	13,3%
5	rORF2 - 4 мкг - карбопол 1 доза	15	3	20,0%
6	rORF2 - 1 мкг - карбопол 2 дозы	15	6	40,0%
7	rORF2 - 0,25 мкг - карбопол 2 дозы	15	7	46,7%
8	KV > 8,0 log - карбопол 2 дозы	15	12	80%
9	Контроли заражения	14	14	100,0%
10	Строгие отрицательные контроли	15	14	93,3%

vORF2 = выделенный вирусный ORF2; rORF2 = рекомбинантный экспрессированный в бакуловире ORF2; KV или убитый вирус с цельными клетками = вирус PCV2, выращенный в подходящей культуре клеток

Обсуждение

В этом примере оценивали семь вакцин PCV2, которые включали в себя высокую дозу (16 мкг) антигена rORF2, смешанного с адьювантом IMS 1314, введенную дважды, высокую дозу (16 мкг) антигена vORF2, смешанного с адьювантом карбополом, введенную дважды одной группе поросят и дважды второй группе поросят, высокую дозу (16 мкг) антигена rORF2, смешанного с адьювантом карбополом, введенного дважды, дозы 4 мкг антигена rORF2, смешанного с адьювантом карбополом, введенного дважды, дозы 1 мкг антигена rORF2, смешанного с адьювантом карбополом, введенного дважды, низкую дозу (0,25 мкг) антигена rORF2, смешанного с адьювантом карбополом, введенного дважды, и высокую дозу (>8 log) убитой цельноклеточной вакцины PCV2, смешанной с адьювантом карбополом. В общем, группа 1, которой вводили две дозы по 16 мкг rORF2 - IMS 1314, являлась немного лучшей, чем группы со 2 до 7, которым вводили вакцины, содержащие различные уровни либо антигена vORF2, либо антигена rORF2, смешанного с адьювантом карбополом, и намного лучшей, чем группа 8, которой вводили две дозы убитой цельноклеточной вакцины PCV2. Группа 1 обладала третьим из самых высоких ADWG (1,80±0,30 фунтов/сутки), самой низкой частотой проявления

аномального поведения (0%), самой низкой частотой проявления аномального дыхания (0%), низкой частотой проявления кашля (7,1%), низкой частотой проявления общих клинических симптомов (7,1%), тесно примыкала к трем другим группам по самому низкому уровню смертности (0%), второй из самых низких степеней среднего %
 5 повреждения легких ($0,15 \pm 0,34\%$), второй из самых низких степеней пневмонии (21,4%) и самой низкой частотой проявления положительных по ИНС тканей (0%). Группа 1, однако, являлась только одной группой, в которой обнаружены реакции в участке инъекции, включая 50% вакцинированных через 1 сутки после второй вакцинации. Другие вакцины, введенные в группах со 2 по 7, действовали лучше, чем убитая вакцина
 10 и почти так же хорошо, как вакцина, введенная в группе 1.

Группа 8, которой вводили две дозы убитой вакцины PCV2, смешанной с адьювантом карбополом, обладала худшим набором результатов из всех групп вакцин. Группа 8 обладала самым низким ADWG ($0,93 \pm 0,33$ фунтов/сутки), второй из самых высоких частот проявления аномального поведения (6,7%), самой высокой частотой проявления
 15 аномального дыхания (6,7%), тесно примыкала с тремя другими группами по самой высокой общей частоте проявления клинических симптомов (13,3%), обладала самым высоким уровнем смертности из всех групп (20%), и обладала самой высокой долей положительных по ИНС (80%) из всех групп вакцин. Существовало опасение, что убитая цельноклеточная вакцина PCV2 может являться не полностью инактивированной перед
 20 введением в группе 8, что может объяснять плохие результаты для этой группы. К сожалению, не было доступно определенных данных для подтверждения этого опасения. В общем, в контексте этого примера, общепринятая убитая вакцина не помогла для уменьшения связанного с PCV2 заболевания.

Как упомянуто ранее, не присутствовало неблагоприятных событий, связанных с
 25 тестируемыми вакцинами, за исключением вакцины, смешанной с адьювантом IMS 1314. Реакции в участке инъекции обнаружены у 50,0% поросят через 1 сутки после второй вакцинации вакциной, составленной с IMS 1314 и у 28,6% поросят через 2 суток после второй вакцинации. Ни у одного из поросят не обнаружили реакций после введения вакцин с адьювантом карбополом. В любых дальнейших исследованиях, включающих
 30 поросят, вакцинированных вакцинами с адьювантами IMS 1314, следует продолжать тщательно контролировать у поросят реакции в участке инъекции.

Все поросята являлись серонегативными по PCV2 на сутки -3 и только группа 2 обладала титром выше 100 на сутки 14. На сутки 25 (сутки заражения), группа 8 обладала самым высоким титром антител к PCV2 (4619), за ней следовала группа 2 (2507). За
 35 исключением групп 7, 9 и 10, для всех групп показали сильный ответ антител к 32 суткам. К 50 суткам, для всех групп, включая группы 7, 9 и 10, показали сильный ответ антител.

Одним из отличительных признаков поздней стадии инфекции PCV2 и последующего развития PMWS является задержка роста отнятых от свиноматки поросят, и в тяжелых случаях отмечали потерю массы. Средний прирост массы в группах является
 40 количественным способом демонстрации задержки роста или потери массы. В данном примере не существовало большой разницы в ADWG между группами. Группа 8 обладала самым низким ADWG $0,88 \pm 0,29$ фунтов/сутки, в то время как группа 4 обладала наивысшим ADWG $1,16 \pm 0,26$ фунтов/сутки. В контексте данного исследования не существовало существенной разницы между группами, чтобы обосновать эффективность
 45 будущих вакцин для ADWG.

Помимо потери массы, одышка, заторможенность, бледность кожи и иногда желтуха представляют собой клинические симптомы, связанные с PMWS. В данном примере аномальное поведение, аномальное дыхание и кашель не часто обнаруживали для

каждой группы. Как показали в этом исследовании, эта модель заражения и штамм для заражения не приводили к очень сильным клиническим симптомам и таким образом, это не является строгим параметром, на котором можно основывать эффективность вакцины.

5 В целом, уровни смертности в этом примере не являлись высокими, и отсутствие высокого уровня смертности в группе контроля заражения накладывает ограничения на этот параметр, чтобы основывать на нем эффективность вакцины. Перед 46 сутками в каждой из групп 4 и 7 умер один из пятнадцати поросят, в группе 9 умерли два из четырнадцати поросят, и в группе 8 умерли три из пятнадцати поросят. Вследствие
10 того, что в группе 9, группе контроля заражения, не обнаружили клинических симптомов для PCV2, и в этой группе произошло только две смерти к суткам 46, MLV вакцину свиного респираторно-репродуктивного синдрома (PRRSV), вводили всем пороссятам на сутки 46. В более ранних исследованиях использовали INGELVAC® PRRS MLV в качестве иммуностимулятора для усиления связанного с PCV2 заболевания PMWS, и
15 уровни смертности в этих более ранних исследованиях являлись более высокими. Две смерти произошли вскоре после введения вакцины PRRS на сутки 46 - в группе 4 произошла одна смерть на сутки 46 и в группе 7 произошла одна смерть на сутки 47 - которые, возможно, не являлись связанными с введением вакцины PRRS. К 50 суткам, группа 8, которой вводили две дозы убитой вакцины, обладала самым высоким уровнем
20 смертности (20%), за ней следовала группа 9 (контроль заражения) и группа 7 (0,25 мкг rORF2 - карбопол), с уровнями смертности 14,3% и 13,3%, соответственно. В общем, введение вакцины PRRS в модели заражения в позднее время в фазе обследования в этом примере значительно не увеличивало уровни смертности.

Макроскопические повреждения у поросят с PMWS, вторичные по отношению к
25 инфекции PCV2, как правило, заключаются в генерализованной лимфаденопатии в сочетании с одним или несколькими из следующего: (1) интерстициальной пневмонии с интерлобулярным отеком, (2) бледности кожных покровов или желтухи, (3) мозаичной атрофической печени, (4) язвы желудка и (5) нефрита. При вскрытии (сутки 50) желтухи, гепатита и нефрита не обнаружили ни для одной из групп. Язву желудка обнаружили
30 у одного поросенка в группе 7, однако лимфаденопатию специально не оценивали. На основании присутствия повреждений, соответствующих инфекции PCV2, три группы обладали по меньшей мере одним поросенком с предварительным диагнозом PCV2 (PMWS). Группа 8, которой вводили две дозы убитой вакцины, обладала 20% с предварительным диагнозом PCV2, тогда как группа 7 и группа 4 обладали 13,3% и
35 6,7%, соответственно, с предварительным диагнозом PCV2. При вскрытии средние значения % повреждений легких различались между группами. Группы 1, 2, 3, 4, 6 и 10 обладали низкими значениями % повреждений легких, лежащими в диапазоне от $0,11 \pm 0,38\%$ до $0,90 \pm 0,15\%$. Как ожидали, группа 9, группа контроля заражения, обладала самым высоким средним значением % повреждений легких ($10,81 \pm 23,27\%$). В четырех
40 группах средние значения % повреждений легких являлись завышенными из-за того, что от одного до трех поросят в каждой из этих групп обладали очень высокими баллами повреждений легких. Большинство повреждений легких являлись красными/пурпурными и консолидированными. Как правило, повреждения легких, связанные с PMWS, описывают как коричневые и не деформированные интерлобулярным отеком.

45 Повреждения легких, обнаруженные в данном исследовании, либо являлись не связанными с инфекцией PCV2, либо мог присутствовать второй легочный инфекционный агент. В контексте данного исследования % степени повреждения легких, возможно, не отражает истинного измерения степени инфекции легких из-за PCV2. Подобным

образом, предварительный диагноз пневмонии может также являться чрезмерным. Для всех поросят с повреждениями легких, некоторыми настолько малыми, как 0,10%, записывали предварительный диагноз пневмония. В данном примере не присутствовало существенной разницы между группами по отношению к макроскопическим повреждениям и % повреждений легких, на которых можно основывать эффективность вакцины.

Результаты ИНС показали наибольшие различия между группами. Группа 1 (16 мкг rORF2 - IMS 1314) обладала самыми низкими положительными результатами ИНС для антигена PCV2 (0%); в то время как группы 9 и 10 обладали самыми высокими положительными результатами ИНС с частотой проявления 100% и 93,3%, соответственно. Группы 3, 5, 6 и 7, которым вводили 16, 4, 1 или 0,25 мкг антигена rORF2, соответственно, смешанного с адьювантом карбополом, обладали степенью положительной ИНС 20%, 20%, 40% и 46,7%, соответственно. Группа 2, которой вводили две дозы 16 мкг vORF2 смешанного с адьювантом карбополом, обладала степенью положительной ИНС 6,7%, тогда как группа 4, которой вводили только одну дозу той же самой вакцины, обладала степенью положительной ИНС 13,3%. Из-за объективного характера этого теста и того факта, что результаты ИНС коррелировали с ожидаемыми результатами, тестирование ИНС, возможно, представляет собой один из лучших параметров для суждения об эффективности вакцины.

Таким образом, в одном из аспектов настоящего изобретения, определяли минимальную защитную дозу (MPD) антигена PCV2 rORF2, смешанного с адьювантом карбополом, в модели CDCD поросят под угрозой заражения PCV2. В каждой из групп 3, 5, 6 и 7 вводили две дозы антигена rORF2, смешанного с адьювантом карбополом, однако уровень антигена rORF2 менялся для каждой группы. В каждой из групп 3, 5, 6 и 7 вводили 16, 4, 1 или 0,25 мкг антигена rORF2, соответственно. В общем, снижение уровня антигена rORF2 снижало титры антитела к PCV2 и увеличивало уровень смертности, средний % повреждений легких и частоту проявления положительных по ИНС тканей. Из четырех групп, которым вводили различные уровни rORF2 - карбопола, группы 3 и 5, которым вводили две дозы по 16 или 4 мкг антигена rORF2, соответственно, каждая обладала степенью положительной ИНС только 20%, и все обладали похожими титрами антител. В целом, на основании положительных результатов ИНС, минимальная защитная доза антигена rORF2, введенная дважды, составляла приблизительно 4 мкг.

В другом аспекте настоящего изобретения оценивали антигенность рекомбинантного (rORF2) и VIDO R-1 (vORF2) антигенов PCV2. В группе 2 вводили две дозы по 16 мкг vORF2 и в группе 3 вводили две дозы по 16 мкг rORF2. Обе вакцины являлись смешанными с адьювантом карбополом. Обнаружено, что обе вакцины являлись безопасными и обе обладали 0% уровнем смертности. Группа 2 обладала титром антитела к PCV2 2507 на сутки 25, в то время как группа 3 обладала титром антитела к PCV2 1503. Группа 3 обладала более низким значением % повреждений легких, чем группа 2 ($0,11 \pm 0,38\%$ против $0,90 \pm 0,15\%$), однако группа 2 обладала более низкой частотой проявления положительной ИНС, чем группа 3 (6,7% против 20%). В целом, обе вакцины обладали сходной антигенностью, однако vORF2 являлся связанным с немного лучшими результатами ИНС.

В другом аспекте настоящего изобретения определяли применимость двух различных адьювантов (карбопола и IMS 1314). В обеих группах 1 и 3 вводили две дозы вакцины, содержащие 16 мкг антигена rORF2, но в группе 1 вводили антиген, смешанный с адьювантом IMS 1314, в то время как в группе 3 вводили антиген, смешанный с адьювантом карбополом. Обе группы обладали по существу одинаковым ADWG, по

существованию одинаковой частотой проявления клинических признаков после заражения, одинаковым уровнем смертности, и по существованию одинаковым средним % повреждений легких; однако группа 1 обладала положительной степенью ИНС 0%, тогда как группа 3 обладала положительной степенью ИНС 20%. Однако группа 3, которой вводили вакцину, смешанную с адьювантом карбополом, обладала более высокими титрами IFAT PCV2 на сутки 25, 32 и 50, чем группа 1, которой вводили вакцину, смешанную с адьювантом IMS 1314. В целом, хотя для вакцины PCV2, смешанной с адьювантом IMS 1314, получили более хорошие результаты ИНС, она не обеспечивала несравненно лучшую защиту от инфекции PCV2 и вызывала реакцию в участке введения. В то же время вакцина PCV2, смешанная с адьювантом карбополом, действовала почти так же хорошо, как вакцина с адьювантом IMS 1314, однако не являлась связанной с какими-либо неблагоприятными событиями.

В другом аспекте настоящего изобретения определяли применимость ORF2 PCV2 в форме продукта с 1 дозой 1 мл. В обеих группах 2 и 4 вводили 16 мкг вакцины vORF2, смешанной с адьювантом карбополом на сутки 0, но в группе 2 вводили вторую дозу на сутки 14. Группа 4 обладала немного более высоким ADWG и меньшим средним % повреждений легких, чем группа 2, но группа 2 обладала более высокими титрами EFAT PCV2 на сутки 25, 32 и 50, и немного более низкой частотой проявления положительных по ИНС тканей. Все другие результаты для этих двух групп являлись одинаковыми. В целом, одна доза vORF2, смешанного с адьювантом карбополом, действовала так же, как две дозы той же самой вакцины.

Формула изобретения

1. Применение иммуногенной композиции, которая содержит по меньшей мере 2 мкг рекомбинантного белка PCV2 ORF2 для получения лекарственного средства для индукции иммунного ответа против PCV2, для уменьшения тяжести клинических симптомов, связанных с инфекцией PCV2, или для профилактики инфекции PCV2, где лекарственное средство вводят по одной дозе на свинью.

2. Применение иммуногенной композиции, которая содержит по меньшей мере 2 мкг рекомбинантного белка PCV2 ORF2 для индукции иммунного ответа против PCV2, для уменьшения тяжести клинических симптомов, связанных с инфекцией PCV2, или для профилактики инфекции PCV2 путем введения одной дозы указанной композиции свинье.

3. Применение по п. 1 или 2, где указанный рекомбинантный белок PCV2 ORF2 получен посредством обеспечения возможности инфекции чувствительных клеток в культуре рекомбинантным вирусным вектором, содержащим кодирующие последовательности ДНК ORF2 PCV2, где белок PCV2 ORF2 экспрессирован посредством рекомбинантного вирусного вектора с последующим выделением указанного белка PCV2 ORF2.

4. Применение по п. 1 или 2, где указанный рекомбинантный белок PCV2 ORF2 представляет собой белок ORF2 PCV2, экспрессированный рекомбинантным бакуловирусом.

5. Применение по п. 1 или 2, где указанная иммуногенная композиция содержит инактивированный бакуловирус и супернатант культуры клеток.

6. Применение по п. 3, где указанный вирусный вектор инактивировали путем добавления циклизованного бинарного этиленмина (BEI).

7. Применение по п. 6, где указанный BEI нейтрализовали тиосульфатом натрия.

8. Применение по п. 1 или 2, где указанное лекарственное средство или композиция

содержит адьювант.

9. Применение по п. 8, где указанный адьювант выбран из группы, состоящей из полимеров акриловой кислоты или полимеров метакриловой кислоты.

10. Применение по п. 8, где указанный адьювант представляет собой карбомер.

5 11. Применение по п. 10, где указанный карбомер представляет собой карбопол.

12. Применение по любому из пп. 8-11, где указанный адьювант содержит от приблизительно 500 мкг до приблизительно 5 мг карбопола на дозу.

13. Применение по п. 1 или 2, где указанная иммуногенная композиция, содержащая рекомбинантный белок PCV2 ORF2, содержит от 4 мкг до 200 мкг рекомбинантного
10 белка PCV2 ORF2 на дозу.

14. Применение по п. 1 или 2, где указанная иммуногенная композиция, содержащая рекомбинантный белок PCV2 ORF2, стабильна в течение 24 месяцев.

15. Применение по п. 1 или 2, где указанное лекарственное средство или композицию вводят вместе с иммуногенной композицией, которая содержит антиген свиного респираторно-репродуктивного синдрома (PRRS).
15

16. Применение по п. 15, где указанный антиген PRRS представляет собой антиген, включенный в IngelVac PRRS MLV.

17. Применение по п. 15 или 16, где указанное лекарственное средство или композицию вводят в одной дозе на свинью для предотвращения клинических признаков и
20 проявления болезни PCV2, где у свиньи присутствует инфекция PRRS.

18. Применение по п. 1 или 2, где указанное лекарственное средство или композиция представляет собой вакцину.

19. Применение по п. 1 или 2, где указанный иммунный ответ представляет собой защитный иммунный ответ или терапевтический иммунный ответ.
25

30

35

40

45

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

- <110> Roof, Mike
Eichmeyer, Mark
Nitzel, Greg
Schaeffer, Merrill
Hayes, Phillip
- <120> ИММУНОГЕННЫЕ КОМПОЗИЦИИ РСУ2 И СПОСОБЫ
ПОЛУЧЕНИЯ ТАКИХ КОМПОЗИЦИЙ
- <130> 34816-CIP1
- <140> НЕИЗВЕСТНО
- <141> 2005-01-10
- <150> Неизвестно
- <151> 2004-12-30
- <160> 11
- <170> PatentIn Версии 3.3
- <210> 1
- <211> 8
- <212> ДНК
- <213> Искусственная
- <220>
- <223> Это модифицированная последовательность Козака .

<400> 1
 ccgccatg 8

<210> 2
 <211> 6
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Это рекомбинантная последовательность EcoR1.

<400> 2
 gaattc 6

<210> 3
 <211> 713
 <212> ДНК
 <213> Цирковиром свиной

<400> 3

cagctatgac gtatccaagg aggcgttacc gcagaagaag acaccgcccc cgcagccatc	60
ttggccagat cctccgccgc cggccctggc tcgtccaccc ccgccaccgc taccggtgga	120
gaaggaaaaa tggcatcttc aacacccgcc totcccgcac ctccggatat actgtggaga	180
aggaaaaatg gcatcttcaa caccgcctc tcccgacct tcggatatac tgtgacgact	240
ttgttcccc cggagggggg accaacaaaa tctctatacc ctttgaatac tacagaataa	300
gaaagggttaa ggttgaattc tggccctgct ccccatcac ccagggtgat aggggagtgg	360
gctccactgc tgttattcta gatgataact ttgtaacaaa ggccacagcc ctaacctatg	420
accatattgt aaactactcc tcccgccata caatccccca acccttctcc taccactccc	480
gttacttcac acccaaacct gttcttgact ccactattga ttacttcaa ccaaataaca	540
aaaggaatca gctttggctg aggcatacaa cctctagaaa tgtggaccac gtaggcctcg	600

gcactgcggt cgaaaacagt aaatacgacc aggactacaa tatccgtgta accatgtatg 660
 tacaattcag agaatttaat cttaaagacc ccccaactta accctaaatg aat 713

<210> 4

<211> 713

<212> ДНК

<213> Цирковирус свиней

<400> 4

ccgccatgac gtatccaagg aggcgttacc gcagaagaag acaccgcccc cgcagccatc 60
 ttggccagat cctccgccgc cgcccctggc tcgtccaccc ccgccaccgc taccgttggg 120
 gaaggaaaaa tggcatcttc aacaccgcc tctcccgcac cttcggatat actgtcaagg 180
 ctaccacagt cacaaacgccc tcctgggcgg tggacatgat gagatttaat attgacgact 240
 ttgttcccc gggagggggg accaacaataa tctctatacc ctttgaatac tacagaataa 300
 gaaagggttaa ggttgaattc tggccctgct ccccatcac ccagggtgat aggggagtgg 360
 gctccactgc tgttattcta gatgataact ttgtaacaaa ggccacagcc ctaacctatg 420
 acccatatgt aaactactcc tcccgccata caatccccca acccttctcc taccactccc 480
 gttacttcac acccaaacct gttcttgact ccactattga ttacttcaa ccaaataaca 540
 aaaggaatca gctttggctg aggctacaaa cctctagaaa tgtggaccac gtaggcctcg 600
 gcactgcggt cgaaaacagt aaatacgacc aggactacaa tatccgtgta accatgtatg 660
 tacaattcag agaatttaat cttaaagacc ccccaactga accctaagaa ttc 713

<210> 5

<211> 233

<212> PRT

<213> Цирковирус свиней

<400> 5

Met Thr Tyr Pro Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg

RU 2575615 C2

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> Цирковирол свиной

<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> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> Это последовательность из цирковируса свиней типа 2, открытая рамка считывания 2, вместе с частью вектора pGEM-T-easy.

<400> 7

```

gcggccgcgg gaattcgatc cgccatgacg tatccaagga ggcgttaccg cagaagaaga      60
caccgcccc gcagccatct tggccagatc ctccgcccgc gccctggct cgtccacccc      120
cgccaccgct accgttggag aaggaaaaat ggcattctca acaccgcct ctcccgcacc      180
ttcggatata ctgtcaaggc taccacagtc acaacgccct cctgggcggt ggacatgatg      240
agatttaata ttgacgactt tgttcccccg ggagggggga ccaacaaaat ctctataccc      300
tttgaatact acagaataag aaaggtaag gttgaattct ggcctgctc ccccatcacc      360
cagggtgata ggggagtggg ctccactgct gttattctag atgataactt tgtaacaaag      420
gccacagccc taacctatga cccatatgta aactactcct cccgccatac aatcccccaa      480
cccttctcct accactcccg ttacttcaca cccaaacctg ttcttgactc cactattgat      540
tacttccaac caaataacaa aaggaatcag ctttggtgga ggctacaaac ctctagaaat      600
gtggaccacg taggcctcgg cactgcgttc gaaaacagta aatacgacca ggactacaat      660
atccgtgtaa ccatgtatgt acaattcaga gaatttaatc ttaaagacct cccacttgaa      720
ccctaagaat tctatcacta gtgaattcgc ggccgc      756
    
```

<210> 8

<211> 10387

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> Это конструкция с ORF2 из цирковируса свиней типа 2, содержащая кодирующие последовательности бакуловируса и pGEM T-easy.

<400> 8

```

aagctttact cgtaaagcga gttgaaggat catathtagt tgcgtttatg agataagatt      60
gaaagcacgt gtaaaatggt tcccgcgcgt tggcacaact atttacaatg cggccaagtt      120
ataaaagatt ctaatctgat atgttttaaa acacctttgc ggccccgagtt gtttgcgtag      180
gtgactagcg aagaagatgt gtggaccgca gaacagatag taaaacaaaa ccctagtagt      240
ggagcaataa tcgatttaac caacacgtct aaatattatg atggtgtgca ttttttgcgg      300
gcgggcctgt tatacaaaaa aattcaagta cctggccaga ctttgccgcc tgaaagcata      360
gttcaagaat ttattgacac ggtaaaagaa tttacagaaa agtgtcccgg catggtgggtg      420
ggcgtgcact gcacacacgg tattaatcgc accggttaca tgggtgtgag atatttaatg      480
cacaccctgg gtattgcgcc gcaggaagcc atagatagat tcgaaaaagc cagaggtcac      540
aaaattgaaa gacaaaatta cgttcaagat ttattaattt aattaatatt atttgcattc      600
tttaacaaat actttatcct attttcaaat tgttgcgctt cttccagcga accaaaaacta      660
tgcttcgctt gctccgttta gctttagacc gatcagtggc gttgttcaa tcgacggtag      720
gattaggccg gatattctcc accacaatgt tggcaacggt gatgttacgt ttatgctttt      780
ggttttccac gtaegtcttt tggccggtaa tagccgtaaa cgtagtgccg tcgcgcgtca      840
cgcacaacac cggatgtttg cgcttgtccg cggggatttg aaccgcgcga tccgacaaat      900
ccaccacttt ggcaactaaa tcggtgacct gcgcgtcttt tttctgcatt atttctctt      960
tcttttgcat ggtttctgga aagccgggtg acatgcgggt tagatcagtc atgacgcgcg     1020
tgacctgcaa atccttggcc tcgatctgct tgtccttgat ggcaacgatg cgttcaataa     1080
actcttgttt tttaacaagt tcctcggttt tttgcgccac caccgcttgc agcgcggttg     1140
tgtgctcggg gaatgtcgca atcagcttag tcaccaactg tttgctctcc tctcccgtt     1200
gtttgatcgc gggatcgtac ttgccgggtg agagcacttg aggaattact tcttctaaaa     1260
gccattcttg taattctatg gcgtaaggca atttggactt cataatcagc tgaatcacgc     1320
cggatttagt aatgagcact gtatgcggct gcaaatacag cgggtcgcgc cttttcacga     1380
cgctgttaga ggtagggccc ccattttgga tggctctgctc aaataacgat ttgtatttat     1440
tgtctacatg aacacgtata gctttatcac aaactgtata ttttaaactg ttagcgacgt     1500
ccttggccac gaaccggacc tgttggctgc gctctagcac gtaccgcagg ttgaacgtat     1560
cttctccaaa tttaaattct ccaattttaa cgcgagccat tttgatacac gtgtgtcgat     1620

```

tttgcaacaa ctattgtttt ttaacgcaaa ctaaacttat tgtggtaagc aataattaa 1680
 tatgggggaa catgcgccgc tacaacactc gtcgttatga acgcagacgg cgccgggtctc 1740
 ggcgcaagcg gctaaaaacgt gttgcgcggt caacgcggca aacatcgcaa aagccaatag 1800
 tacagttttg atttgcatat taacggcgat tttttaaat atcttattta ataaatagtt 1860
 atgacgccta caactccccg cccgcggtga ctcgctgcac ctcgagcagt tcgttgacgc 1920
 cttcctccgt gtggccgaac acgtcgagcg ggtggtcgat gaccagcggc gtgccgcacg 1980
 cgacgcacaa gtatctgtac accgaatgat cgtcgggcga aggcaagtcg 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
 gcgcgtatth taacaaacta gccatcttgt aagttagttt catttaatgc aactttatcc 2340
 aataatatat tatgtatcgc acgtcaagaa ttaacaatgc gcccgttgtc gcactctcaac 2400
 acgactatga tagagatcaa ataaagcgcg aattaaatag cttgcgacgc aacgtgcacg 2460
 atctgtgcac gcgttccggc acgagctttg attgtaataa gtttttacga agcgatgaca 2520
 tgacccccgt agtgacaacg atcacgcca aaagaactgc cgactacaaa attaccgagt 2580
 atgtcgggta cgtaaaaact attaagccat ccaatcgacc gttagtcgaa tcaggaccgc 2640
 tggtgcgaga agccgcgaag tatggcgaat gcatcgtata acgtgtggag tccgctcatt 2700
 agagcgtcat gtttagacaa gaaagctaca tatttaattg atcccgatga ttttattgat 2760
 aaattgaccc taactccata cacggtattc tacaatggcg gggttttggt caaaatttcc 2820
 ggactgcatgct 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
 aactgttaca ttgcaaacgt ggtttcgtgt gccaaagtgtg aaaaccgatg tttaatcaag 3120
 gctctgacgc atttctacaa ccacgactcc aagtgtgtgg gtgaagtcat gcacttttta 3180
 atcaaatccc aagatgtgta taaaccacca aactgccaaa aatgaaaac tgtcgacaag 3240
 ctctgtccgt ttgctggcaa ctgcaagggt ctcaatccta tttgtaatta ttgaataata 3300
 aaacaattat aaatgctaaa tttgtttttt attaacgata caaaccaaac gcaacaagaa 3360
 catttgtagt attatctata attgaaaacg cgtagttata atcgtgagg taatatttaa 3420
 aatcattttc aaatgattca cagttaattt gcgacaatat aattttattt tcacataaac 3480
 tagacgcctt gtcgtcttct tcttcgtatt ccttctcttt ttcatttttc tctcataaa 3540

aattaacata gttattatcg tatccatata tgtatctatc gtatagagta aatTTTTTgt 3600
tgtcataaat atatatgtct tttttaatgg ggtgtatagt accgctgcgc atagTTTTtc 3660
tgtaatttac aacagtgcta ttttctggta gttcttcgga gtgtgTTgct ttaattatta 3720
aatttatata atcaatgaat ttgggatcgt cggTTTTgta caatatgTTg ccggcatagt 3780
acgcagcttc ttctagttca attacacat ttttagcag caccggatta acataacttt 3840
ccaaaatggt gtacgaaccg ttaaacaana acagttcacc tccTTTTct atactattgt 3900
ctgcgagcag ttgTTTgTTg ttaaaaataa cagccattgt aatgagacgc acaactaat 3960
atcacaaact ggaaatgtct atcaatatat agttgctgat atcatggaga taattaaaat 4020
gataaccatc tcgcaataa ataagtattt tactgTTTTc gtaacagTTt tgtaataaaa 4080
aaacctataa atattccgga ttattcatac cgtcccacca tcgggcgcgg atcagatctg 4140
cagcggccgc ggaattcga tccgcatga cgtatccaag gaggcgTTac cgcagaagaa 4200
gacaccgccc ccgcagccat cttggccaga tccctccgccg ccgcccctgg ctogtccacc 4260
cccgccaccg ctaccgTTg agaaggaaa atggcatctt caacaccgc ctctcccgca 4320
ccttcggata tactgtcaag gctaccacag tcacaacgcc ctctgggcg gtggacatga 4380
tgagatttaa tattgacgac tttgttcccc cgggaggggg gaccaaaaa atctctatac 4440
cctttgaata ctacagaata agaaaggTTa aggttgaatt ctggccctgc tccccatca 4500
cccagggTTa taggggagtg ggtccactg ctgTTattct agatgataac tttgtaaaa 4560
aggccacagc ctaacctat gacctatg taaactact ctcccgccat acaatcccc 4620
aaccctctc ctaccactcc cgTTacttca caccaaac tgTTcttgac tccactattg 4680
attacttcca accaaataac aaaaggaatc agctttggct gaggtacaa acctctagaa 4740
atgtggacca cgtaggctc ggcactgctc tcgaaaacag taaatcgc caggactaca 4800
atatccgtgt aaccatgtat gtacaattca gagaatttaa tcttaaagac cccccactg 4860
aaccctaaga attctatcac tagtgaattc gcgccgccc gccgctccag aattctagaa 4920
ggtaccggg atcctttctt gggaccggc aagaacaaa aactcactct cttcaaggaa 4980
atccgtaatg ttaaaccga cagatgaag cttgtcgttg gatggaaagg aaaagattc 5040
tacagggaaa cttggaccg cttcatggaa gacagcttc ccattgTTa cgaccaagaa 5100
gtgatggatg ttttcttgt tgtcaacatg cgtcccacta gaccaaccg ttgttcaaaa 5160
ttctggccc aacacgctct gcgttgac ccgactatg tacctcatga cgtgattagg 5220
atcgtogagc cttcatgggt gggcagcaac aacgagtacc gcatcagct ggctaagaag 5280
ggcggcggt gcccaataat gaacctcac tctgagtaca ccaactcgtt cgaacagttc 5340
atcgatcgtg tcatctggga gaactctac aagccatcg tttacatcg taccgactct 5400
gctgaagagg aggaaattct ccttgaagt tccctggtgt tcaaagtaa ggagTTTgca 5460

ccagacgcac ctctgttcac tggccggcg tattaaaaca cgatacattg ttattagtac 5520
 atttattaag cgctagattc tgtgcgttgt tgatttacag acaattggtg tacgtatttt 5580
 aataattcat taaatttata atcttttaggg tggtagtatta gagcgaaaat caaatgattt 5640
 tcagcgtctt tatactgaa tttaaatatt aaatcctcaa tagatttgta aaataggttt 5700
 cgattagttt caacaaggg ttgtttttcc gaaccgatgg ctggactatc taatggattt 5760
 tcgctcaacg ccacaaaact tgccaaatct tgtagcagca atctagcttt gtcgatattc 5820
 gtttgtgttt tgttttgtaa taaaggttcg acgtcgttca aaatattatg cgcttttgta 5880
 tttctttcat cactgtcgtt agtgtacaat tgactcgacg taaacacgtt aaataaagct 5940
 tggacatatt taacatcggg cgtgttagct ttattagggc gattatcgtc gtcgtcccaa 6000
 ccctcgtcgt tagaagttgc ttccgaagac gattttgcca tagccacacg acgcctatta 6060
 attgtgtcgg ctaacacgtc cgcatcaaa tttgtagttg agctttttgg aattatttct 6120
 gattgcgggc gtttttgggc gggtttcaat ctaactgtgc ccgattttaa ttcagacaac 6180
 acgttagaaa gcgatggtgc aggcggtggt aacatttcag acggcaaadc tactaatggc 6240
 ggcggtggtg gagctgatga taaatctacc atcgggtggag gcgcaggcgg ggctggcggc 6300
 ggaggcggag gcggaggtgg tggcgtgat gcagacggcg gtttaggctc aaatgtctct 6360
 ttaggcaaca cagtcggcac ctcaactatt gtactggttt cgggcgccgt ttttggtttg 6420
 accggtctga gacgagtgcg atttttttcg tttctaatag cttccaacaa ttgttgtctg 6480
 tcgtctaaag gtgcagcggg ttgaggttcc gtcggcattg gtggagcggg cggcaattca 6540
 gacatcgatg gtgggtggtg tgggtggaggc gctggaatgt taggcacggg agaagggtgg 6600
 ggcggcggtg ccgccggtat aattgttctt ggttttagttt gttcgcgcac gattgtgggc 6660
 accggcgcag gcgccgctgg ctgcacaacg gaaggtcgtc tgcttcgagg cagcgtttgg 6720
 ggtggtggca attcaatatt ataattggaa tacaaatcgt aaaaatctgc tataagcatt 6780
 gtaatttcgc tatcgtttac cgtgccgata tttacaacc gctcaatgta agcaattgta 6840
 ttgtaaagag attgtctcaa gctcgcgca ccgcgataac aagccttttc atttttacta 6900
 cagcattgta gtggcgagac acttcgctgt cgtcgcgta catgtatgct ttgtgtcaa 6960
 aaacgtcgtt ggcaagcttt aaaatattta aaagaacatc tctgttcagc accactgtgt 7020
 tgcgtaaat gttgtttttg ataatttgcg cttccgcagt atcgacacgt tcaaaaaatt 7080
 gatgcgcac aattttgttg ttcctattat tgaataaata agattgtaca gattcatatc 7140
 tacgattcgt catggccacc acaaatgcta cgtgcaaac gctggtacaa ttttacgaaa 7200
 actcaaaaa cgtaaaaact cggataaaaa taatcaacgg gcgctttggc aaaatatcta 7260
 ttttatcgca caagcccact agcaaattgt atttgcagaa aacaatttcg gcgcacaatt 7320

ttaacgctga	cgaaataaaa	gttcaccagt	taatgagcga	ccacccaaat	tttataaaaa	7380
tctattttta	tcacggttcc	atcaacaacc	aagtgatcgt	gatggactac	attgactgtc	7440
ccgattttatt	tgaaacacta	caaattaaag	gcgagctttc	gtaccaactt	gttagcaata	7500
ttattagaca	gctgtgtgaa	gcgctcaacg	atttgacaaa	gcacaatttc	atacacaacg	7560
acataaaaact	cgaaaatgtc	ttatatttcg	aagcacttga	tcgctgtgat	gtttgcgatt	7620
acggattgtg	caaacacgaa	aactcactta	gcgtgcacga	cggcacgttg	gagtatttta	7680
gtccggaaaa	aattcgacac	acaactatgc	acgtttcgtt	tgactggtac	gcggcgtggt	7740
aacatacaag	ttgctaacgt	aatcatggtc	atagctgttt	cctgtgtgaa	attgttatcc	7800
gctcacaatt	ccacacaaca	tacgagccgg	aagcataaag	tgtaaagcct	ggggtgcccta	7860
atgagtgagc	taactcacat	taattgcggt	gcgctcactg	cccgtttcc	agtcgggaaa	7920
cctgtcgtgc	cagctgcatt	aatgaatcgg	ccaacgcgcg	gggagaggcg	gtttgcgtat	7980
tgggcgctct	tccgcttcct	cgctcactga	ctcgtgcgc	tcggtcgctc	ggctgcggcg	8040
agcggtatca	gctcactcaa	aggcgtaat	acggttatcc	acagaatcag	gggataacgc	8100
aggaaagaac	atgtgagcaa	aaggccagca	aaaggccagg	aaccgtaaaa	aggccgcggt	8160
gctggcgttt	ttccataggc	tccgcccccc	tgacgagcat	cacaaaaatc	gacgctcaag	8220
tcagaggtgg	cgaaaccgca	caggactata	aagataccag	gcgtttcccc	ctggaagctc	8280
cctcgtgcgc	tctcctgttc	cgaccctgcc	gcttaccgga	tacctgtccg	cctttctccc	8340
ttcgggaagc	gtggcgcttt	ctcatagctc	acgctgtagg	tatctcagtt	cggtgtaggt	8400
cgttcgtcc	aagctgggct	gtgtgcacga	acccccggt	cagcccagacc	gctgcgcctt	8460
atccggtaac	tatcgtcctg	agtcacaacc	ggtaagacac	gacttatcgc	cactggcagc	8520
agccactggt	aacaggatta	gcagagcgag	gtatgtaggc	ggtgctacag	agttcttgaa	8580
gtggtggcct	aactacggct	acactagaag	gacagtattt	ggtatctgog	ctctgctgaa	8640
gccagttacc	ttcggaaaaa	gagttggtag	ctcttgatcc	ggcaaaaaaa	ccaccgctgg	8700
tagcggtggt	ttttttggtt	gcaagcagca	gattacgcgc	agaaaaaaag	gatctcaaga	8760
agatcctttg	atcttttcta	cggggtctga	cgctcagtgg	aacgaaaact	cacgttaagg	8820
gattttggtc	atgagattat	caaaaaggat	cttcacctag	atccttttaa	attaataatg	8880
aagttttaaa	tcaatctaaa	gtatatatga	gtaaacttgg	tctgacagtt	accaatgctt	8940
aatcagtgag	gcacctatct	cagcgatctg	tctatttcgt	tcatccatag	ttgcctgact	9000
cccogtcgtg	tagataacta	cgatacggga	gggcttacca	tctggccccca	gtgctgcaat	9060
gataccgcga	gaccacgct	caccggctcc	agatttatca	gcaataaacc	agccagccgg	9120
aagggccgag	cgcagaagtg	gtcctgcaac	tttatccgcc	tccatccagt	ctattaattg	9180
ttgccgggaa	gctagagtaa	gtagttcgcc	agttaatagt	ttgcgcaacg	ttgttgccat	9240

```

tgctacaggc atcgtggtgt cacgctcgtc gtttggtagt gcttcattca gctccggttc 9300
ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc catgttgtgc aaaaaagcgg ttagctcctt 9360
cggctcctccg atcgttgtca gaagtaagtt ggcgcagtg ttatcactca tggttatggc 9420
agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc atccgtaaga tgcttttctg tgactgggta 9480
gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg tatgcccgca ccgagttgct cttgcccggc 9540
gtcaatacgg gataataccg cgccacatag cagaacttta aaagtgctca tcattggaaa 9600
acgttcttcg gggcgaaaac tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta 9660
accactcgt gcacccaact gatcttcagc atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg 9720
agcaaaaaaca ggaaggcaaa atgccgcaaa aaaggggaata agggcgacac ggaaatggtg 9780
aatactcata ctcttccttt ttcaatatta ttgaagcatt tatcagggtt attgtctcat 9840
gagcggatac atatttgaat gtatttagaa aaataaaca ataggggttc cgcgcacatt 9900
tccccgaaaa gtgccacctg acgtctaaga aaccattatt atcatgacat taacctataa 9960
aaataggcgt atcacgaggc cctttcgtct cgcgcgtttc ggtgatgacg gtgaaaacct 10020
ctgacacatg cagctcccgg agacggtcac agcttgtctg taagcggatg cggggagcag 10080
acaagcccgt cagggcgcgt cagcgggtgt tggcgggtgt cggggctggc ttaactatgc 10140
ggcatcagag cagattgtac tgagagtgca ccatatgcgg tgtgaaatac cgcacagatg 10200
cgtaaggaga aaataccgca tcaggcgcca ttcgccattc aggctgcgca actgttggga 10260
agggcgatcg gtgcgggcct cttegctatt acgccagctg gcgaaagggg gatgtgctgc 10320
aaggcgatta agttgggtaa cgccagggtt tccccagtca cgacgttgta aaacgacggc 10380
cagtgcc 10387

```

<210> 9

<211> 20

<212> PRT

<213> Цирковирс свиной

<400> 9

Ser Tyr Pro 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> Цирковирол свиней

<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> Искусственная

<220>

<223> Это аминокислотная последовательность цирковирол свиней типа 2,
открытой рамки считывания 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

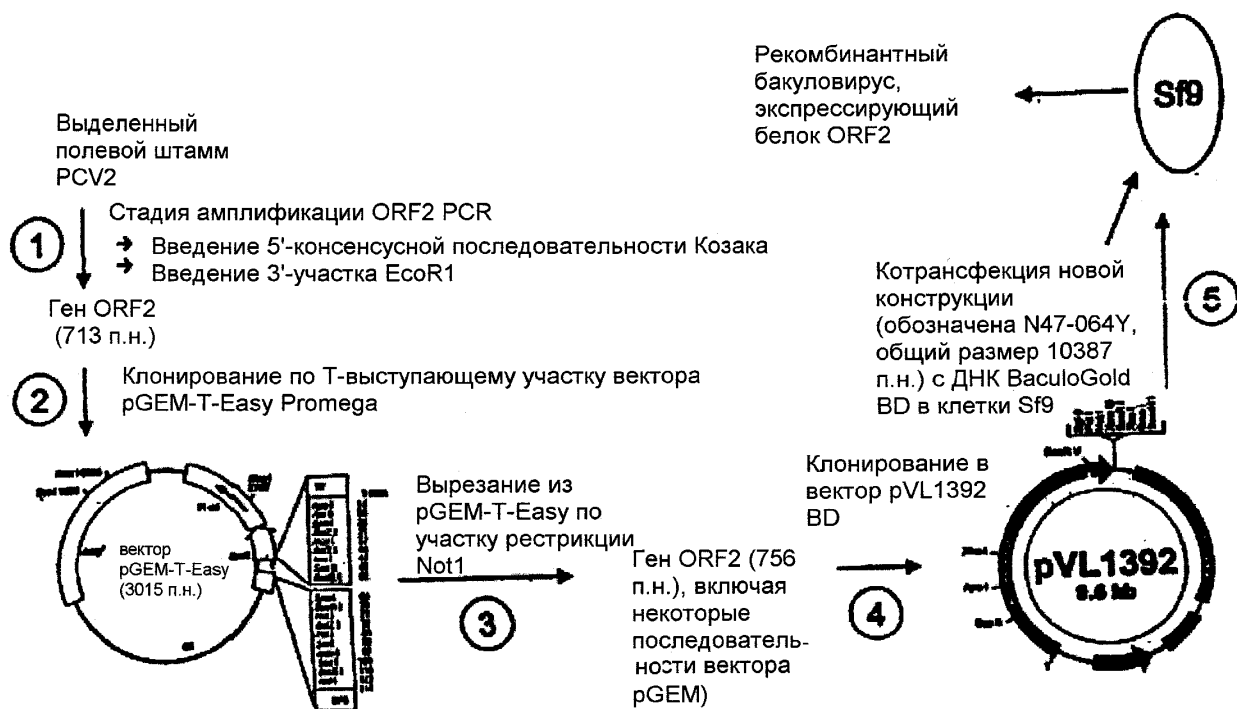
215

220

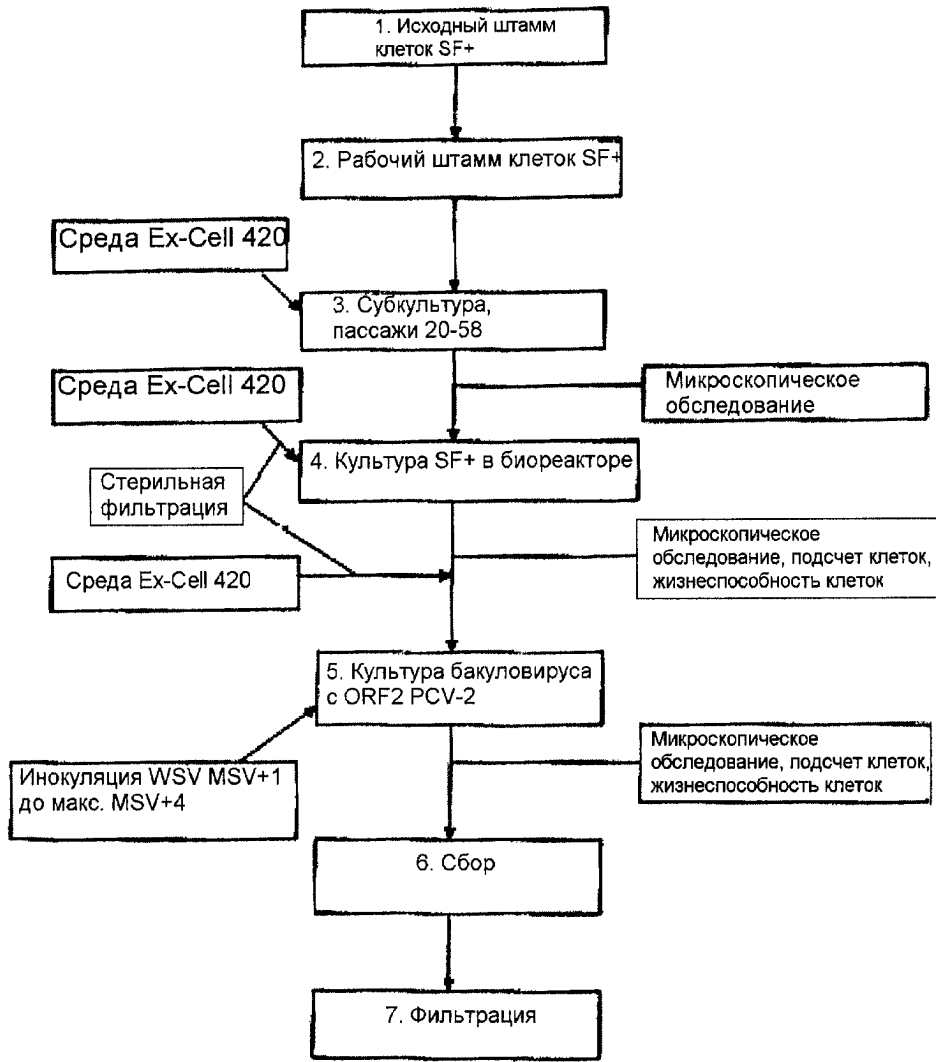
Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Lys Pro

225

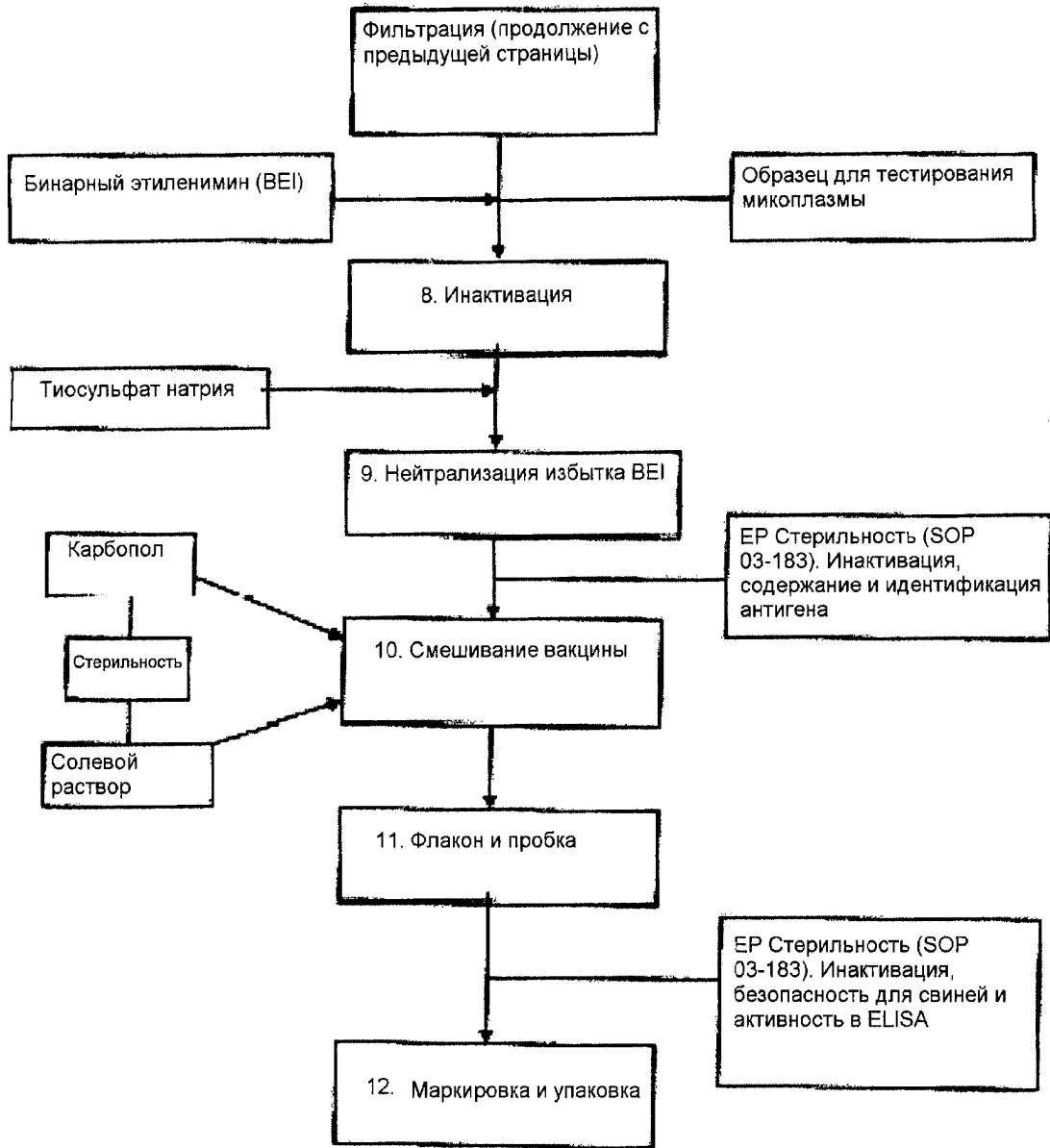
230



ФИГ.1



ФИГ.2(a)



ФИГ.2(b)