



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **113192** (13) **C2**

(51) МПК

C07K 14/01 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

A61P 31/20 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

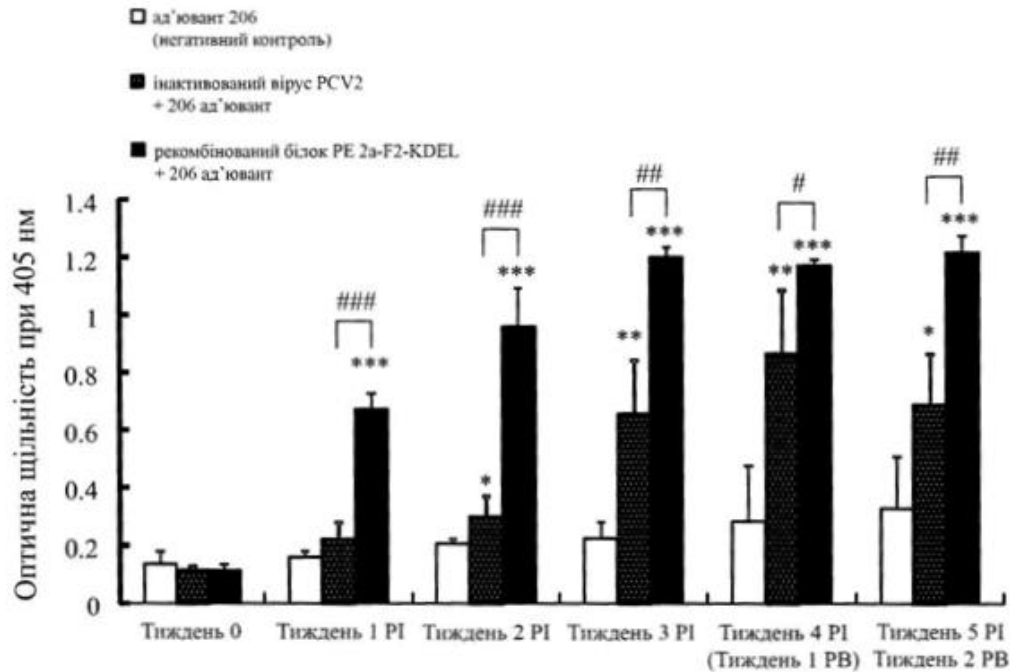
(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2014 07508	(74) Представник:	Михайлюк Ганна Валентинівна, реєстр. №184
(22) Дата подання заявки:	05.12.2012	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO 9929871 A2, 17.06.1999. US 2009017064 A1, 15.01.2009. US 2012164170 A1, 28.06.2012. Zhong-Zi L. et al. Procarvotic expression and potential application of the truncated PCV-2 capsid protein / Lou Zhong-Zi et al. // Virologica Sinica. - Vol. 25. - № 2. - 1 April 2010 (2010-04-01). - P. 86-97. Fang Wang et al. Genetic variation analysis of Chinese strains of porcine circovirus type 2 / Wang Fang et al. // Virus research. - Vol. 145. - № 1. - 1 October 2009 (2009-10-01). - P. 151-156. DATABASE UniProt. Database accession no. Q80QW2. DATABASE UniProt. Database accession no. A9QMC6. DATABASE UniProt. Database accession no. A5A446. DATABASE UniProt. Database accession no. Q20QW2. DATABASE UniProt. Database accession no. Q5XVM5. DATABASE UniProt. Database accession no. F8V1X0. Guo L. et al. Identification of antigen epitope located at the N terminal nuclear localization signal region in capsid protein of porcine circovirus type 2 (PCV2) / Long-jun Guo et al. // Scientia Agricultura Sinica. - July 2010. - Vol. 43. - № 7. - P. 1480-1486 (реферат). Shang S. B. et al. Fine mapping of antigenic epitopes on capsid proteins of porcine circovirus, and antigenic phenotype of porcine circovirus Type 2 / Shao -Bin Shang et al. // Molecular immunology. - Pergamon. - GB. - Vol. 46. - № 3. - 1 January 2009 (2009-01-01). - P. 327-334. Dupont K. et al. Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotypes with time / K. Dupont et al. // Veterinary microbiology. - Elsevier BV. - NL. - Vol. 128. - № 1-2. - 6 February 2008 (2008-02-06). - P. 56-64. CN 101180406 A, 14.05.2008 CN 101884787 A, 17.11.2010 CN 101936993 A, 05.01.2011 CN 102127533 A, 20.07.2011
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	26.12.2016		
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	61/567,248		
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	06.12.2011		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US		
(41) Публікація відомостей про заявку:	10.10.2014, Бюл.№ 19		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	26.12.2016, Бюл.№ 24		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/CN2012/085907, 05.12.2012		
(72) Винахідник(и): Ко Тсунь-Юньг (CN), Чень Хсу-Чун Габріель (CN), Ян Шу-Хсиан (CN), Чень Юй-Сань (CN)			
(73) Власник(и): СБК ВІРБАК ЛІМІТЕД, FLAT/RM 2201-2207 Tower Two Times Square, 1 Matheson Street, Causeway Bay, Hong Kong (HK)			

UA 113192 C2

(54) ІМУНОГЕННА КОМПОЗИЦІЯ ПРОТИ ЦИРКОВІРУСУ СВИНЕЙ ТИПУ 2 (PCV2)**(57) Реферат:**

Винахід стосується імуногенної композиції проти цирковірусу свиней типу 2 (PCV2), яка містить антигенний пептид, який є незбагаченим аргініном пептидом ORF2 з PCV2, або рекомбінантним химерним білком, що включає від аміно-кінця до карбоксильного кінця рекомбінантного химерного білка пептид PE, незбагачений аргініном пептид з ORF2 з PCV2, та сигнальний пептид KDEL. Винахід також стосується способу отримання фрагмента PCV2, що включає розташування послідовності ДНК, що кодує незбагачений аргініном пептид з ORF2 з PCV2, і експресію зазначеної послідовності ДНК з отриманням фрагмента антигену імуногенної композиції проти PCV2.



ФІГ. 7

ПЕРЕДУМОВИ ВІНАХОДУ

1. ГАЛУЗЬ ТЕХНІКИ

Даний винахід відноситься до субодиничної вакцини проти цирковірусу свиней типу 2 (PCV2), конкретно, до субодиничної вакцини проти PCV2, що містить пептид відкритої рамки зчитування (ORF2) з PCV2, який може надмірно експресуватися у якості антигена, і додатково придатний носій або ад'ювант.

2. ОПИС РІВНЯ ТЕХНІКИ

Відомо, що цирковірус свиней типу 2 (PCV2) пов'язаний з синдромом мультисистемного виснаження після відлучення (PMWS) і синдромом дерматиту і нефропатії у свиней (PDNS). PMWS вперше був виявлений у свиней в Канаді в 1991 році, а згодом було повідомлено про його зустрічальність в усьому світі. Синдром призвів до великої втрати в свинарській індустрії у всьому світі. Головні симптоми PMWS включають прогресуючу втрату ваги, тахіпное, диспное, розлиття жовчі і т. д. Візуальні патологічні зміни в тканині включають лімфоцитарний та гранулематозний інфільтрат, лімфаденопатію, лімфоцитарний та гранулематозний гепатит і нефрит.

Цирковірус свиней (PCV) вперше був виявлений в лінії клітин нирки свині (PK-15, ATCC CCL33) в 1982 році. Хоча цирковірус свиней може постійно інфікувати клітини PK-15, вірус не спричиняє цитопатичного ефекту (CPE) в інфікованих клітинах PK-15. Навіть, незважаючи на те, що цирковірус свиней може інфікувати свиней, він не призводить до уражень в інфікованих свиней. Вірус назвали цирковірусом свиней типу 1 (PCV1). PCV1 є дванадцятигранним вірусом з одноланцюговою ДНК з кільцевим геномом з 1759 п. о. Отриманий з PK-15 PCV класифікували в сімейство *Circoviridae* в 1995 році.

Отриманий з PK-15 PCV1 вважається апатогенним. На відміну від цього, вірусний мутант, виділений із свиней з PMWS в 1997 році, є патогенним і називається цирковірус свиней типу 2 (PCV2). Синдром мультисистемного виснаження після відлучення (PMWS) є високо контагіозним захворюванням свиней. Він головним чином інфікує порослих свиноматок та їх поросят і серйозно впливає на здоров'я свиней.

PCV2 є вірусом з одноланцюговою кільцевою ДНК діаметром 17 нм, і розмір його геному складає 1,76 т. н. Геномний аналіз за допомогою програмного забезпечення показує сумарно 11 відкритих рамок зчитування (ORF), що транскрибуються в напрямках за годинниковою стрілкою та проти годинникової стрілки. Серед 11 ORF, ORF1 і ORF2 імовірно являють собою найбільш важливі гени. Ген ORF1 кодує білки Rep і Rep', які пов'язані з реплікацією вірусу. Відомо, що ген ORF2 кодує імуногенний структурний білок капсида з PCV2, який застосовують для індукції імунної відповіді в організмів.

Інактивована вакцина проти PCV2 є найбільш розповсюдженою комерційно доступною вакциною проти PCV2. Однак розробка інактивованої вакцини потребує, щоб лінії клітин не містили забруднювача, а можливість неповної інактивації вірусу за допомогою хімічних реактивів є найбільш значним недоліком інактивованої вакцини. Іншим недоліком є те, що антигенні структури вірусу можуть бути змінені шляхом хімічної обробки, що призведе до неможливості індукції достатньої імунної відповіді для знищення вірусу і неможливості захисту свиней від інфікування захворюванням. Таким чином, розробка інактивованої вакцини може бути складною і дорогою, а безпека вакцини може викликати питання.

На відміну від інактивованої вакцини, в якій цілий вірус є вакцинним антигеном, в субодиничній вакцині застосовують частину білків із патогена у якості білка-антигена і білок-антиген вводять щепленням тваринам або людям для індукції імунітету. Субодиничну вакцину можна отримувати шляхом клонування генів, що кодують білки-антигени з патогенів, а потім отримання великих кількостей білків-антигенів за допомогою генної інженерії. Безпека є найбільш значною перевагою субодиничної вакцини, оскільки в ній застосовують частини патогена замість цілого патогена для щеплення свиней з відсутністю проблеми неповної інактивації. В традиційній субодиничній вакцині проти PCV2 застосовують білок ORF2 з PCV2 у якості білка-антигена; тим не менш, рівень експресії повнорозмірного білка ORF2 з PCV2 в прокаріотичних системах експресії є достатньо низьким і не відповідає вимогам отримання вакцини. Таким чином, розробка фрагментів антигена з ORF2 з PCV2, які можуть характеризуватися високим рівнем експресії в біологічних системах експресії, доцільна для комерційного застосування субодиничної вакцини проти PCV2.

КОРОТКИЙ ОПИС ВІНАХОДУ

Дане розкриття відноситься до послідовностей ДНК, що кодують фрагменти білка з ORF2 з PCV2, і фрагменти білка з ORF2 з PCV2 можуть характеризуватися високим рівнем експресії в біологічних системах експресії.

Дане розкриття також відноситься до субодиничної вакцини проти PCV2, в якій фрагменти

білка з ORF2 з PCV2, які можуть характеризуватися високим рівнем експресії в біологічних системах експресії, застосовують в якості білків-антигенів для введення щепленням тваринам для індукції відповідного імунітету проти інфекції PCV2 у тварин.

Дане розкриття додатково відноситься до субодиночної вакцини, розробленої шляхом генної інженерії для отримання за допомогою простого способу недорогої, високоочищеної, з хорошим рівнем безпеки субодиночної вакцини проти PCV2.

У зв'язку з тим фактом, що рівень експресії повнорозмірного білка ORF2 з PCV2 в біологічних системах експресії є достатньо низьким, для досягнення зазначених вище цілей застосовують генну інженерію. Послідовності ДНК (такі як SEQ ID NO: 1), які кодують повнорозмірні білки ORF2 з PCV2, розрізали на фрагменти різних розмірів і фрагменти ДНК вставляли в вектори експресії, а потім експресували в хазяїнах. Вимірювали рівні експресованих білків для визначення того, які фрагменти ДНК можуть давати високі рівні білків в системах експресії білків.

Результати аналізу білкової послідовності і досліджень експресії білка показують, що в повнорозмірному білку ORF2 з PCV2 є приблизно 30 аргінінів, з яких щонайменше дві треті аргінінів виявлені на N-кінці білка ORF2 з PCV2, і що чим більша кількість аргінінів на N-кінці буде видалена, тим вище буде рівень експресії фрагмента білка ORF2. Крім того, після того як перші 234 нуклеотиди на 5'-кінці повнорозмірної послідовності ДНК з ORF2 з PCV2 були видалені, фрагмент білка, що кодується фрагментом ДНК, що залишився (тобто від нуклеотиду 235 на 5'-кінці до стоп-кодона), можна експресувати у великому масштабі.

Внаслідок цього, субодиночна вакцина проти PCV2, представлена в даному розкритті, містить антигенний пептид з PCV2 з придатним носієм або ад'ювантом. Антигенний пептид може експресуватися в великому масштабі в системах експресії і є незбагаченим аргініном пептидом з ORF2 з PCV2. Кількості аргінінів незбагаченого аргініном пептиду з ORF2 з PCV2 складають не більше половини (1/2) кількостей аргінінів збагаченого аргініном домену на N-кінці повнорозмірного ORF2 з PCV2. В одному варіанті здійснення, якщо число аргінінів збагаченого аргініном домену на N-кінці повнорозмірного ORF2 з PCV2 складає 20, то число аргінінів незбагаченого аргініном пептиду з ORF2 з PCV2 становить одне з цілих чисел від 0 до 10. В іншому варіанті здійснення, якщо число аргінінів збагаченого аргініном домену на N-кінці повнорозмірного ORF2 з PCV2 складає 21, то число аргінінів незбагаченого аргініном пептиду з ORF2 з PCV2 становить одне з цілих чисел від 0 до 10. В ще одному варіанті здійснення, якщо число аргінінів збагаченого аргініном домену на N-кінці повнорозмірного ORF2 з PCV2 складає 22, то число аргінінів незбагаченого аргініном пептиду з ORF2 з PCV2 становить одне з цілих чисел від 0 до 11.

В одному варіанті здійснення збагачений аргініном домен характеризується залишками 1-78 на N-кінці повнорозмірного ORF2 з PCV2 (який кодується нуклеотидами 1-234 на 5'-кінці повнорозмірної послідовності ДНК з ORF2 з PCV2). В одному варіанті здійснення збагачений аргініном пептид характеризується пептидною послідовністю від залишку 79 до останнього амінокислотного залишку на C-кінці повнорозмірного ORF2 з PCV2 (який кодується послідовністю ДНК від нуклеотиду 235 на 5'-кінці до стоп-кодона на 3'-кінці повнорозмірної послідовності ДНК з ORF2 з PCV2).

Розкритий в даному документі ORF2 з PCV2 має повнорозмірну пептидну послідовність, що характеризується щонайменше 80%, переважно 85%, більш переважно 90%, ще більш переважно 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% або 99% гомології з однією з SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 51 і SEQ ID NO: 53. У переважному варіанті здійснення розкритий в даному документі ORF2 з PCV2 характеризується повнорозмірною пептидною послідовністю однією з SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 51 і SEQ ID NO: 53.

На додаток до цього, дане розкриття відноситься до химерного білка ORF2 з PCV2 в якості антигенного пептиду із застосуванням функціональних елементів рецептор-зв'язувального домену I і трансмембранного домену II, що націлює, екзотоксину A з *Pseudomonas aeruginosa* (тобто "білка PE") і сигналу затримки в ендоплазматичному ретикулумі (ER) (тобто "сигнального пептиду KDEL").

Білок PE з *Pseudomonas aeruginosa* можна застосовувати в якості гіда цільового білка до його цільового положення, згідно з наведеним далі способом. Спочатку, рецептор-зв'язувальний домен екзотоксину A з *Pseudomonas aeruginosa* забезпечує зв'язування з рецепторами на мембрані клітин-мішеней (CD8+ Т-клітин), а потім ліганд-рецепторні комплекси проникають в ендосоми клітин-мішеней шляхом ендоцитозу. Після ферментативного відщеплення за допомогою протеази в ендосомах укорочені фрагменти білка (що містять трансмембранний домен, що націлює, і зв'язаний цільовий білок) доставляються в тільця

Гольджі та ендоплазматичний ретикулум (ER) і далі переміщуються в цитоплазму клітин-мішеней за допомогою трансмембранного домену, що націлює.

Крім того, при приєднанні сигнального пептиду KDEL на С-кінець цільового білка цільовий білок буде транспортуватися в ER за допомогою сигнального пептиду KDEL, а потім взаємодіяти в ER.

Таким чином, дане розкриття відноситься до химерного білка ORF2 з PCV2 в якості антигенного пептиду шляхом застосування функціональних елементів білка PE і сигнального пептиду KDEL. Білок PE і сигнальний пептид KDEL зливаються з фрагментом білка ORF2 з PCV2 на N- та С-кінцях, відповідно, з отриманням химерного білка (PE-фрагмент ORF2-KDEL) для введення щепленням тваринам з метою індукції достатньої імунної відповіді проти інфекції PCV2 у тварин.

В деяких варіантах здійснення застосовувані в даному документі антигенні пептиди включають без обмежень фрагменти ORF2 з PCV2. Фрагменти ORF2 мають пептидну послідовність, що характеризується щонайменше 80%, переважно 85%, більш переважно 90%, ще більш переважно 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% або 99% гомології з однією з SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 55 та SEQ ID NO: 57. В переважному варіанті здійснення фрагменти ORF2 з PCV2 мають пептидну послідовність однієї з SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 55 та SEQ ID NO: 57, і були отримані за допомогою генної інженерії. Послідовності ДНК (SEQ ID NO: 5, 7, 9, 11, 17, 21, 54, 56), що кодують фрагменти ORF2 з PCV2, клонували в вектори експресії з отриманням плазмід, що містять фрагмент ДНК, який кодує антигенний пептид. Плазміді потім трансформували в клітини-хазяїни для експресії антигенних пептидів.

Розкриті в даному документі химерні білки (PE-фрагмент ORF2-KDEL) отримували за допомогою генної інженерії. Послідовності ДНК (SEQ ID NO: 5, 7, 9, 11, 17, 21, 54, 56), що кодують фрагменти ORF2 з PCV2, послідовність ДНК (SEQ ID NO: 34), що кодує білок PE, і послідовність ДНК (SEQ ID NO: 30), що кодує сигнальний пептид KDEL, клонували у вектори експресії з отриманням плазмід, які містять фрагмент ДНК, що кодує химерний білок. Плазміді потім трансформували в клітини-хазяїни для експресії химерних білків.

Вектори експресії включають без обмеження вектори pET і вектори pGEX. В одному варіанті здійснення вектором експресії є pET24a. Системи експресії (клітини-хазяїни) включають без обмеження прокаріотичні системи експресії (такі як *Escherichia coli*), еукаріотичні системи експресії (такі як клітини тварин (наприклад, клітина CHO) і клітини рослин). В одному варіанті здійснення системою експресії є *E. coli*.

Ад'ювант включає без обмеження водний ад'ювант (такий як гідроксид алюмінію), алюмокалійовий галун, неповний ад'ювант Фрейнда, масляний ад'ювант, розчинний у воді ад'ювант або ад'ювант за типом емульсії "вода-в-маслі-у-воді" (W/O/W). В одному варіанті здійснення ад'ювантом є масляний ад'ювант.

Розкрита в даному документі імуногенна композиція додатково містить антигенні пептиди з інших ORF з PCV2. Інші ORF з PCV2 включають без обмеження ORF1 та ORF3. На додаток до цього, розкрита в даному документі імуногенна композиція додатково містить патогенний антиген. Патогенний антиген обраний з групи, що включає антиген вірусу свинячого грипу (SIV), антиген вірусу репродуктивного та респіраторного синдрому свиней (PRRSV), антиген мікоплазми, антиген парвовірусу свиней (PPV), антиген бешихи свиней і антиген вірусу псевдоскажу (хвороби Ауєскі).

На додаток до цього, розкрита в даному документі імуногенна композиція додатково містить одне або декілька з наступного: наповнювачі, розчинник, емульгатор, суспендуючий засіб, засіб для розкладання, зв'язувальний засіб, середовище для ліків, стабілізуючий засіб, хелатоутворюючий засіб, розріджувач, загусник, консервант, засіб, що обумовлює плинність, поверхнево-активну речовину, ад'ювант і біологічні носії.

Значення технічних і наукових термінів, які описані в даному документі, зможе легко зрозуміти кожний фахівець в даній галузі.

Даний винахід більш докладно описаний у наведених далі ілюстративних прикладах. Хоча приклади можуть являти собою тільки обрані варіанти здійснення даного винаходу, слід розуміти, що наведені далі приклади є ілюстративними, а не обмежувачими.

КОРОТКИЙ ОПИС ГРАФІЧНИХ МАТЕРІАЛІВ

На фіг. 1 представлені результати філогенетичного аналізу геномних послідовностей PCV2.

На фіг. 2 проілюстрована схематична діаграма фрагментів ORF2 з PCV2, в яких праймерами для ПЛР є pF1, pF2, pF3, pF4, pR1, pR2 та pR3.

На фіг. 3 показані результати аналізу SDS-PAGE рекомбінантних білків різних фрагментів

2a-ORF2 з PCV2, експресованих в *E. coli*. Цілі білки *E. coli* збирали через 6 годин після індукції за допомогою IPTG і потім розділяли за допомогою 15% SDS-PAGE, в якому доріжки 1-9 показують маркери молекулярної ваги, порожній вектор pET24a (в якості негативного контролю), фрагмент ORF2 2a-F1 з PCV2 (12,7 кДа), фрагмент ORF2 2a-F2 з PCV2 (11,6 кДа), фрагмент ORF2 2a-F3 з PCV2 (12,1 кДа), фрагмент ORF2 2a-F4 з PCV2 (16,5 кДа), фрагмент ORF2 2a-F5 з PCV2 (21,4 кДа), фрагмент ORF2 2a-F6 з PCV2 (20,8 кДа) і повнорозмірний 2a-ORF2 з PCV2 (27,5 кДа), відповідно.

На фіг. 4 представлені результати вестерн-блотингу рекомбінантних білків різних фрагментів 2a-ORF2 з PCV2. Доріжки 1-9 показують маркери молекулярної ваги, порожній вектор pET24a (в якості негативного контролю), фрагмент ORF2 2a-F1 з PCV2 (12,7 кДа), фрагмент ORF2 2a-F2 з PCV2 (11,6 кДа), фрагмент ORF2 2a-F3 з PCV2 (12,1 кДа), фрагмент ORF2 2a-F4 з PCV2 (16,5 кДа), фрагмент ORF2 2a-F5 з PCV2 (21,4 кДа), фрагмент ORF2 2a-F6 з PCV2 (20,8 кДа) і повнорозмірний 2a-ORF2 з PCV2 (27,5 кДа), відповідно.

На фіг. 5 представлені результати ELISA PCV2 зразків сироватки, зібраних в різні моменти часу у щурів, вакцинованих рекомбінантними білками різних фрагментів 2a-ORF2 з PCV2, відповідно. *, $p < 0,05$. (PI: після імунізації; PB: після бустер-ін'єкції)

На фіг. 6 проілюстровані результати ELISA PCV2 зразків сироватки, зібраних в різні моменти часу у мишей, вакцинованих рекомбінантними білками фрагмента 2a-F2 і рекомбінантними білками фрагмента PE-2a-F2-KDEL, відповідно. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; #, $p < 0,05$; ##, $p < 0,01$; ###, $p < 0,001$. (PI: після імунізації; PB: після бустер-ін'єкції).

На фіг. 7 показані результати ELISA PCV2 зразків сироватки, зібраних в різні моменти часу у мишей, вакцинованих рекомбінантними білками фрагмента PE-2a-F2-KDEL і вакциною з цілим вірусом PCV2, відповідно. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; #, $p < 0,05$; ##, $p < 0,01$; ###, $p < 0,001$. (PI: після імунізації; PB: після бустер-ін'єкції)

ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС ПЕРЕВАЖНОГО ВАРІАНТА ЗДІЙСНЕННЯ

Приклад 1. Будівництво та визначення антигенних пептидів субодичинної вакцини проти PCV2

У зв'язку з тим фактом, що рівень експресії повнорозмірного білка ORF2 з PCV2 в біологічних системах експресії є досить низьким, послідовності ДНК, що кодують повнорозмірні білки ORF2 з PCV2, розрізали на фрагменти різних розмірів і фрагменти ДНК вбудовували в вектори експресії, а потім експресували в хазяїнах. Рівні експресованих білків вимірювали для визначення того, які фрагменти ДНК можуть давати високі рівні білків в білкових системах експресії.

Широко застосовувану прокаріотичну систему експресії (*Escherichia coli*) застосовували у наведених далі прикладах для аналізу і в ілюстративних цілях.

1. Ампліфікація фрагментів гена ORF2 з PCV2 різних розмірів

Повнорозмірний ген ORF2 з PCV2, застосовуваний в даному прикладі, характеризується послідовністю SEQ ID NO: 1. Послідовності гена ORF2 з PCV2, представлені у Wang et al. (Wang et al., Virus Research 2009, Genetic variation analysis of Chinese strains of porcine circovirus type 2.), застосовували в якості стандартних послідовностей для філогенетичного аналізу SEQ ID NO: 1. Результат показав, що послідовність ORF2 з PCV2 (SEQ ID NO: 1) належить до підгрупи PCV2 2a (яка показана на фіг. 1). Праймери (які описані в таблиці 1) призначені для ампліфікації фрагментів різних розмірів гена ORF2 з PCV2 2a (2a-ORF2) за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

Як показано на фіг. 2, повнорозмірний ген 2a-ORF2 ампліфікували за допомогою специфічних праймерів rF1 (прямий праймер) і rR1 (зворотний праймер) шляхом ПЛР. Повнорозмірний ген 2a-ORF2 (2a-ORF2) характеризується послідовністю ДНК SEQ ID NO: 1, а фрагменти різних розмірів 2a-ORF2 з PCV2 називали 2a-F1, 2a-F2, 2a-F3, 2a-F4, 2a-F5 і 2a-F6, відповідно. Фрагмент 2a-F1 характеризується послідовністю ДНК SEQ ID NO: 3, яка є нуклеотидами 1-234 на 5'-кінці 2a-ORF2. Фрагмент 2a-F2 характеризується послідовністю ДНК SEQ ID NO: 5, яка є нуклеотидами 235-468 на 5'-кінці 2a-ORF2. Фрагмент 2a-F3 характеризується послідовністю ДНК SEQ ID NO: 7, яка є нуклеотидами 469-699 на 5'-кінці 2a-ORF2. Фрагмент 2a-F4 характеризується послідовністю ДНК SEQ ID NO: 9, яка є нуклеотидами 349-699 на 5'-кінці 2a-ORF2. Фрагмент 2a-F5 характеризується послідовністю ДНК SEQ ID NO: 11, яка є нуклеотидами 235-699 на 5'-кінці 2a-ORF2. Фрагмент 2a-F6 характеризується послідовністю ДНК SEQ ID NO: 13, яка є нуклеотидами 1-468 на 5'-кінці 2a-ORF2. Усі прямі праймери містили сайт рестрикції *Hind* III, а всі зворотні праймери містили сайт рестрикції *Xho* I.

Таблиця 1. Перелік послідовностей праймерів для ампліфікації фрагментів гена ORF2 з PCV2 різних розмірів

Фрагмент	Праймер	Послідовність	примітка
ORF2	pF1	Прямий праймер	CCCAAGCTTGCATGACGTATCCAAGGA GGCG SEQ ID NO: 23
	pR1	Зворотний праймер	CCGCTCGAGGGGTTTAAGTGGGGGGTCTT TTTA SEQ ID NO: 24
F1	pF1	Прямий праймер	CCCAAGCTTGCATGACGTATCCAAGGA GGCG SEQ ID NO: 23
	pR3	Зворотний праймер	CCGCTCGAGGTCGTAAATATTAATCTCATC ATC SEQ ID NO: 28
F2	pF2	Прямий праймер	CCCAAGCTTGCTTTGTTCCCCCGGGAG GGGG SEQ ID NO: 25
	pR2	Зворотний праймер	CCGCTCGAGGTAGGAGAAGGGTTGGGG GGATT SEQ ID NO: 26
F3	pF3	Прямий праймер	CCCAAGCTTGCCACTCCCGGTACTTTAC CCC SEQ ID NO: 27
	pR1	Зворотний праймер	CCGCTCGAGGGGTTTAAGTGGGGGGTCTT TTTA SEQ ID NO: 24
F4	pF4	Прямий праймер	CCCAAGCTTGCGGAGTGGGCTCCACTG CTGT SEQ ID NO: 29
	pR1	Зворотний праймер	CCGCTCGAGGGGTTTAAGTGGGGGGTCTT TTTA SEQ ID NO: 24
F5	pF2	Прямий праймер	CCCAAGCTTGCTTTGTTCCCCCGGGAG GGGG SEQ ID NO: 25
	pR1	Зворотний праймер	CCGCTCGAGGGGTTTAAGTGGGGGGTCTT TTTA SEQ ID NO: 24
F6	pF1	Прямий праймер	CCCAAGCTTGCATGACGTATCCAAGGA GGCG SEQ ID NO: 23
	pR2	Зворотний праймер	CCGCTCGAGGTAGGAGAAGGGTTGGGG GGATT SEQ ID NO: 26

Примітка: послідовності, позначені знизу "____", є послідовностями сайту рестрикції *Hind* III (AAGCTT), а послідовності, позначені знизу "~~~~~", є послідовностями сайту рестрикції *Xho* I (CTCGAG).

Умови для реакції ПЛР включали 95°C протягом 5 хвилин, 25 циклів 95°C протягом 30 секунд, 55°C протягом 30 секунд, і 72°C протягом 30 секунд, і 72°C протягом 5 хвилин для елонгації. Розміри продуктів ПЛР 2а-ORF2, 2а-F1, 2а-F2, 2а-F3, 2а-F4, 2а-F5 і 2а-F6 становили 699 п. о., 234 п. о., 234 п. о., 231 п. о., 351 п. о., 465 п. о. і 468 п. о., відповідно, і підтверджені за допомогою електрофорезу в 2% агарозному гелі. Після підтвердження, продукти ПЛР очищали за допомогою набору для очищення PCR-M (Viogene).

2. Будування плазмід рЕТ24а, що містять фрагменти ORF2 з PCV2 різних розмірів.

Один (1) мкг очищених продуктів ПЛР і 1 мкг вектора експресії рЕТ24а (Novagen) розщеплювали за допомогою двох ферментів рестрикції (New England Biolabs) 1 мкл *Hind* III і 1 мкл *Xho* I, відповідно, протягом 8 годин при 37°C. Після реакції розщеплення за допомогою ферментів рестрикції розщеплені продукти ПЛР і вектор експресії рЕТ24 очищали за допомогою системи PCR-M Clean up System (Viogene), відповідно. Очищені продукти ПЛР лігували з очищеним вектором експресії рЕТ24а з отриманням плазмід рЕТ24а-2а-F1, рЕТ24а-2а-F2, рЕТ24а-2а-F3, рЕТ24а-2а-F4, рЕТ24а-2а-F5, рЕТ24а-2а-F6 і рЕТ24а-2а-ORF2, а потім плазмід трансформували в клітини-хазяїни (*E. coli*). Відбирали трансформантів, що містять продукти ПЛР, і послідовності ДНК підтверджували за допомогою секвенування ДНК. Потім отримували бактерії, що містять зазначені вище плазмід.

3. Експресія білка і підтвердження фрагментів ORF2 з PCV2 різних розмірів

Бактерії, що містять зазначені вище плазміди, інкубували в 2 мл середовища LB при 37°C протягом 16-18 годин і потім інокулювали в співвідношенні 1:50 в середовище LB, що містить 25 мкг/мл канаміцину, для наступного інкубування при 37°C в інкубаторі з 200 об./хв. до тих пір, поки O.D. при 600 нм не становила 0,6. Після цього, β -D-тригалактозид (IPTG) додавали до кінцевої концентрації 1 мМ і клітини-хазяїни *E. coli* інкубували при 37°C в інкубаторі з 200 об./хв. протягом ще 6 годин. Потім 1 мл клітин хазяїнів *E. coli* центрифугували при 10000xg, і осад обробляли шляхом B-PERTM Bacterial Protein Extraction (придбаним у PIERCE) для перевірки того, чи є рекомбінантні білки розчинними білками або знаходяться в тільцях включення, за допомогою наступних етапів. Осад додавали в 40 мкл реагенту, перемішували за допомогою вортексного шейкера протягом 1 хвилини і центрифугували при 10000 xg для відділення розчинних білків (верхня частина) від нерозчинних тілець включень (нижня частина). Розчинні білки розчиняли в 1x буфері для розведення зразка для SDS-PAGE, а осад додавали в 2x буфера для розведення зразка для SDS-PAGE. Зразки поміщали в термоблок з температурою 100°C на 20 хвилин, а потім центрифугували. Супернатант аналізували за допомогою 15% SDS-PAGE для вимірювання експресії рекомбінантних білків.

Рекомбінантні білки отримували шляхом індукції бактеріальної культури за допомогою IPTG. Рекомбінантний білок 2a-ORF2 характеризується амінокислотою послідовністю SEQ ID NO: 2. Рекомбінантний білок 2a-F1 характеризується амінокислотою послідовністю SEQ ID NO: 4. Рекомбінантний білок 2a-F2 характеризується амінокислотою послідовністю SEQ ID NO: 6. Рекомбінантний білок 2a-F3 характеризується амінокислотою послідовністю SEQ ID NO: 8. Рекомбінантний білок 2a-F4 характеризується амінокислотою послідовністю SEQ ID NO: 10. Рекомбінантний білок 2a-F5 характеризується амінокислотою послідовністю SEQ ID NO: 12. Рекомбінантний білок 2a-F6 характеризується амінокислотою послідовністю SEQ ID NO: 14.

Експресію рекомбінантних білків аналізували за допомогою SDS-PAGE, і результати показані на фіг. 3, причому доріжка 1 показує маркер молекулярної ваги, доріжка 2 показує негативний контроль (пустий вектор pET24a), доріжка 3 показує рекомбінантний білок 2a-F1 (12,7 кДа), доріжка 4 показує рекомбінантний білок 2a-F2 (11,6 кДа), доріжка 5 показує рекомбінантний білок 2a-F3 (12,1 кДа), доріжка 6 показує рекомбінантний білок 2a-F4 (16,5 кДа), доріжка 7 показує рекомбінантний білок 2a-F5 (21,4 кДа), доріжка 8 показує рекомбінантний білок 2a-F6 (20,8 кДа) і доріжка 9 показує повнорозмірний рекомбінантний білок 2a-ORF2 (27,5 кДа). Серед 6 фрагментів 2a-ORF2 фрагменти 2a-F2, 2a-F3, 2a-F4 і 2a-F5 експресувалися в великих кількостях (фіг. 3, доріжки 4-7). Розраховані розміри фрагментів білків 2a-F2, 2a-F3, 2a-F4 і 2a-F5 відповідали їх фактичним розмірам, що становили 11,6 кДа, 12,1 кДа, 16,5 кДа і 21,4 кДа, відповідно.

Далі, застосовували вестерн-блотинг для перевірки, чи були експресовані рекомбінантні білки фрагментами 2a-ORF2 з PCV2. Після електрофорезу SDS-PAGE переносили на поліамідну мембрану PVDF. Отриману мембрану блокували за допомогою блокувального буфера, який являє собою TBST (10 мМ трис-HCl, pH 8,0, 150 мМ NaCl, 0,1% Твін 20), що містить 5% знежиреного молока протягом 1 години при кімнатній температурі для запобігання неспецифічного зв'язування білків. Після цього білки виявляли за допомогою моноклональних антитіл миші, кон'югованих з лужною фосфатазою (AP), до химерних білків з 6X гістидиновою міткою протягом 1 години при кімнатній температурі з наступним шестиразовим промиванням за допомогою TBST, по 5 хвилин кожне. Після промивання додавали субстрат NBT/BCIP (Bio-Rad). Через 10 хвилин реакцію зупиняли шляхом додавання води.

Результати вестерн-блотинга показані на фіг. 4, причому доріжка 1 показує маркер молекулярної ваги, доріжка 2 показує негативний контроль (пустий вектор pET24a), доріжка 3 показує рекомбінантний білок 2a-F1 (12,7 кДа), доріжка 4 показує рекомбінантний білок 2a-F2 (11,6 кДа), доріжка 5 показує рекомбінантний білок 2a-F3 (12,1 кДа), доріжка 6 показує рекомбінантний білок 2a-F4 (16,5 кДа), доріжка 7 показує рекомбінантний білок 2a-F5 (21,4 кДа), доріжка 8 показує рекомбінантний білок 2a-F6 (20,8 кДа), і доріжка 9 показує повнорозмірний рекомбінантний білок 2a-ORF2 (27,5 кДа). Результати вестерн-блотинга співпадали з результатами аналізу SDS-PAGE (який показаний на фіг. 3). Повнорозмірний рекомбінантний білок 2a-ORF2 не міг експресуватися (фіг. 4, доріжка 9). Серед 6 фрагментів з 2a-ORF2 фрагменти 2a-F2, 2a-F3, 2a-F4 і 2a-F5 експресувалися в великих кількостях (фіг. 4, доріжки 4-7). Розраховані розміри фрагментів білків 2a-F2, 2a-F3, 2a-F4 і 2a-F5 відповідали їх фактичним розмірам, що становили 11,6 кДа, 12,1 кДа, 16,5 кДа і 21,4 кДа, відповідно. Однак, була відсутня експресія рекомбінантного білка 2a-F1 або рекомбінантного білка 2a-F6 (фіг. 4, доріжки 3 і 8). Оскільки як рекомбінантний білок 2a-F1, так і рекомбінантний білок 2a-F6 містили нуклеотиди 1-234 на 5'-кінці повнорозмірної послідовності ДНК з 2a-ORF2 з PCV2 (див. фіг. 2), деякі послідовності в нуклеотидах 1-234 могли зачіпати експресію білка ORF2 з PCV2. Аналіз

амінокислотних послідовностей фрагмента 2a-F1 (нуклеотиди 1-234 на 5'-кінці 2a-ORF2 з PCV2, SEQ ID NO: 3) і фрагмента 2a-F2 + 2a-F3 (нуклеотиди 235-699 (без стоп-кодона) на 5'-кінці 2a-ORF2 з PCV2, SEQ ID NO: 11) показував, що кількості аргінінів в амінокислотній послідовності (SEQ ID NO: 4) фрагмента 2a-F1 в два рази або більше перевищували кількості аргінінів в амінокислотній послідовності (SEQ ID NO: 12) фрагмента 2a-F2 + 2a-F3 (як показано в таблиці 2). Аналіз додавання або делеції аргініну показував, що делеція надлишкового аргініну могла підвищувати експресію білка з ORF2 з PCV2.

Таблиця 2. Аналіз кількостей аргінінів в амінокислотній послідовності 2a-ORF2 з PCV2

2a-F1			2a-F2 + 2a-F3		
Кодон	Амінокислота	Кількість	Кодон	Амінокислота	Кількість
AGA	Аргінін	5	AGA	Аргінін	3
AGG	Аргінін	3	AGG	Аргінін	3
CGA	Аргінін	1	CGC	Аргінін	1
CGC	Аргінін	10	CGG	Аргінін	1
CGT	Аргінін	2	CGT	Аргінін	1
Загалом		21	Загалом		9

Приклад 2. Аналіз імуногенності антигенних пептидів субодиночної вакцини проти PCV2

1. Імунізація щурів

Отримували субодиночну вакцину проти PCV2 з рекомбінантними білками 2a-F2, 2a-F3, 2a-F4 та 2a-F5, отриманими в прикладі 1, відповідно, і повним ад'ювантом Фрейнда. Щурів вакцинували субодиночною вакциною проти PCV2 для аналізу імуногенності антигенних пептидів субодиночної вакцини проти PCV2.

Здорових щурів, які не мали конкретних патогенів, віком від п'яти до шести тижнів рандомно розділяли на 5 груп по 3 щури в кожній. Твердофазний імуноферментний аналіз (ELISA) показував, що всі 15 щурів були негативними за антитілами до PCV2. Кожному щуру з 4 груп вакцинації (групи 1-4) вводили ін'єкцією підшкірно 200 мкг рекомбінантного білка, і загальний об'єм кожної ін'єкції становив 300 мкл при співвідношенні 1:1 (об./об.) білка до ад'ювантної композиції. Щурам з групи 5 вводили ін'єкцією 300 мкл PBS і використовували в якості негативного контролю. Через два тижні після первинної імунізації (p.i.) щурам з 4 груп вакцинації повторно вводили таку ж дозу 4 різних рекомбінантних білків, відповідно. Зразки сироватки збирали через 0, 2, 4 і 8 тижнів після первинної імунізації. Всі зразки сироватки тестували за допомогою ELISA для вимірювання титру антитіл до PCV2.

2. Визначення антитіл до PCV2 за допомогою ELISA

В даному прикладі використовували планшети з дев'яноста шістьма лунками, що містять патогенний антиген PCV2 (300 нг/лунка), в якості планшетів для ELISA. Планшети для ELISA промивали 3 рази 50 ммоль/л PBS (pH 7,2), що містить 500 мкл/л Твін-20 (тобто PBST) протягом від 3 до 5 хвилин кожен раз. Для блокування планшетів для ELISA додавали 200 мкл 0,15% блокувального розчину BSA в кожен лунку планшетів для ELISA, і потім планшети для ELISA інкубували протягом 2 годин при 37°C. Після чого планшети для ELISA промивали PBS. Зразки сироватки щурів розводили в п'ятдесят разів (1:50) за допомогою PBS, а потім послідовно розводили в два рази. Кожен зразок мав 8 повторів. Розведені зразки сироватки додавали в лунки планшетів (100 мкл/лунка) для ELISA і планшети інкубували протягом 1 години при 37°C. Після інкубування планшети промивали PBS. Потім в лунки додавали антитіло до IgG щура, кон'юговане з лужною фосфатазою (AP). Після інкубування протягом 1 години при 37°C планшети промивали PBS. Для візуалізації результатів в лунки додавали паранітрофенілфосфат (pNPP). Після інкубації реакцію зупиняли шляхом додавання 1M NaOH. Оптичну щільність кожної лунки зчитували за допомогою пристрою для зчитування оптичної щільності при 405 нм. Кожен зразок аналізували у двох повторностях і значення O.D. від дублів усереднювали.

Результати ELISA показані на фіг. 5. Всі рекомбінантні білки 2a-F2, 2a-F3, 2a-F4 та 2a-F5, отримані в прикладі 1, були здатні індукувати сироваткові антитіла до PCV2 у тестованих тварин. Серед рекомбінантних білків рекомбінантний білок 2a-F2 (SEQ ID NO: 6) індукував найбільш високий рівень сироваткового антитіла до PCV2. Для статистичного аналізу всі групи порівнювали з негативним контролем PBS у різних моментах забору зразка, і виявляли значущі відмінності між негативним контролем і кожною групою вакцинації ($p < 0,05$).

Крім того, свиней вакцинували рекомбінантними білками 2a-F2, 2a-F3, 2a-F4 та 2a-F5, відповідно, і всі рекомбінантні білки були здатні індукувати сироваткові антитіла до PCV2 у свиней. На додаток до цього вакцинованих свиней заражали вірусом PCV2 для оцінки

ефективності рекомбінантних білків. Спочатку рекомбінантні білки складали в якості субодиночної вакцини і вводили ін'єкцією свиням. Потім, свиней заражали вірусом PCV2. Результати показували, що ступені захисту груп імунізації були вищими, ніж такі у негативного контролю (без вакцинації). В контексті даного документа ступені захисту включають зниження вірусемії і пом'якшення симптомів, спричинених PCV2. Таким чином, результати показували, що субодиночна вакцина PCV2, отримана за допомогою рекомбінантних білків, могла ефективно індукувати імунітет у тварин і збільшувати показник виживаності тварин.

Приклад 3. Будування та експресія антигенних пептидів субодиночної вакцини проти PCV2 2a

Результати в прикладі 2 показували, що серед рекомбінантних білків пептид F2 з ORF2 з PCV2 індукував найвищий рівень сироваткового антитіла до PCV2. Для того щоб посилити імуногенність субодиночної вакцини проти PCV2, рецептор-зв'язувальний домен I і трансмембранний домен II, що націлює, екзотоксину A з *Pseudomonas aeruginosa* (тобто білка PE) і сигнал затримки в ER - сигнальний пептид KDEL зливали з пептидом 2a-F2, отриманим в прикладі 1, на N- і C-кінцях, відповідно, з отриманням химерного білка (PE-2a-F2-KDEL) для індукції відповідного імунітету до інфекції PCV2 у тварин.

В даному прикладі рекомбінантний білок (PE-2a-F2-KDEL) отримували за допомогою генної інженерії. Послідовності ДНК, що кодують білки, що представляють інтерес, клонували у вектор експресії для будування плазмиди рЕТ24а-PE-2a-F2-KDEL. У плазмиді індукували експресію рекомбінантного білка PE-2a-F2-KDEL. Спочатку, послідовність ДНК (SEQ ID NO: 30), що кодує сигнальний пептид KDEL, клонували у вектор рЕТ24а з отриманням плазмиди рЕТ24а-KDEL. Після чого, послідовність ДНК (SEQ ID NO: 5) фрагмента 2a-F2, отриманого в прикладі 1, клонували в плазмиду рЕТ24а-KDEL з отриманням плазмиди рЕТ24а-2a-F2-KDEL. Нарешті, послідовність ДНК (SEQ ID NO: 34), що кодує білок PE, клонували в плазмиду рЕТ24а-2a-F2-KDEL з отриманням плазмиди рЕТ24а-PE-2a-F2-KDEL.

1. Будування рЕТ24а-KEDL

Послідовність ДНК, що кодує сигнальний пептид KDEL, (SEQ ID NO: 31) показана як SEQ ID NO: 30. Послідовність ДНК ампліфікували за допомогою ПЛР. Далі наведені послідовності специфічних до KEDL праймерів.

Прямий праймер (з сайтом рестрикції *Hind* III)

5'-CCCAAGCTTCTCAAAAAAGACGAAGTGAAGATGAAGTGAAGAGA-3' (SEQ ID NO: 32)
Hind III

Зворотний праймер (з сайтом рестрикції *Xho*)

5'-GTGCTCGAGCAGTTCGTCTTTCAGTTCATCT-3' (SEQ ID NO: 33)
Xho I

Умови для реакції ПЛР включали 94°C протягом 3 хвилин, 5 циклів 95°C протягом 1 хвилини, 55°C протягом 1 хвилини, і 72°C протягом 20 секунд, і 72°C протягом 1 хвилини для елонгації. Продукт ПЛР і вектор рЕТ24а піддавали подвійному розщепленню ферментами рестрикції за допомогою *Hind* III і *Xho* I. Потім, розщеплені продукти ПЛР і вектор рЕТ24а очищали, відповідно, з наступним лігуванням для клонування продукту ПЛР в рЕТ24а з отриманням рЕТ24а-KDEL. Потім, конструкт рЕТ24а-KEDL трансформували в клітини-хазяїни (*E. coli*) для здійснення масової реплікації. Репліковані продукти ПЛР додатково підтверджували за допомогою секвенування.

2. Будування рЕТ24а-2a-F2-KDEL

Послідовність ДНК 2a-F2 (SEQ ID NO: 5), отриману в прикладі 1, ампліфікували за допомогою ПЛР. Далі показані праймери ПЛР.

Прямий праймер рF2-1 (з сайтом рестрикції *Sac* I)

5'-CGAGCTCTTTGTTCCCCCGGGAGGGGGG-3' (SEQ ID NO: 38)
Sac I

Зворотний праймер рR2-1 (з сайтом рестрикції *Hind* III)

5'-CCCAAGCTTGTAGGAGAAGGGTTGGGGGATT-3' (SEQ ID NO: 39)
Hind III

Умови для реакції ПЛР включали 95°C протягом 5 хвилин, 25 циклів 95°C протягом 30 секунд, 55°C протягом 30 секунд, і 72°C протягом 30 секунд, і 72°C протягом 5 хвилин для елонгації. Продукт ПЛР і плазмиду рЕТ24а-KDEL піддавали подвійному розщепленню ферментами рестрикції за допомогою *Sac* I і *Hind* III. Потім, розщеплені продукти ПЛР і плазмиду рЕТ24а-KDEL очищали, відповідно, з наступним лігуванням для клонування продукту ПЛР в рЕТ24а-KDEL з отриманням рЕТ24а-2a-F2-KDEL. Потім, конструкт трансформували в клітини-хазяїни (*E. coli*) для здійснення масової реплікації. Репліковані продукти ПЛР додатково підтверджували за допомогою секвенування.

3. Будування рЕТ24а-РЕ-2а-F2-KDEL

Послідовність ДНК, що кодує білок РЕ (SEQ ID NO: 35), показана як SEQ ID NO: 34. Послідовність ДНК ампліфікували за допомогою ПЛР. Далі наведені послідовності специфічних до РЕ праймерів.

5 Прямий праймер (з сайтом рестрикції *Bam*H I)

5'- CGGGATCCGAAGAAGCGTTCGAC -3' (SEQ ID NO: 36)

*Bam*H I

Зворотний праймер (з сайтами рестрикції *Eco*RI і *Sac* I)

5'- CGGAATTCGAGCTCGCAGGTCAGGCTCACCAC-3' (SEQ ID NO: 37)

10 *Eco*RI *Sac* I

Умови для реакції ПЛР включали 94°C протягом 5 хвилин, 30 циклів 95°C протягом 1 хвилини, 55°C протягом 1 хвилини, і 72°C протягом 1,5 хвилини, і 72°C протягом 7 хвилин для елонгації. Продукт ПЛР і плазмиду рЕТ24а-2а-F2-KDEL піддавали подвійному розщепленню ферментами рестрикції за допомогою *Bam*H I і *Sac* I. Потім, розщеплені продукти ПЛР і плазмиду рЕТ24а-2а-F2-KDEL очищали, відповідно, з наступним лігуванням для клонування продукту ПЛР в рЕТ24а-2а-F2-KDEL з отриманням рЕТ24а-РЕ-2а-F2-KDEL. Потім, конструкт рЕТ24а-РЕ-2а-F2-KDEL трансформували в клітини-хазяїни (*E. coli*) для здійснення масової реплікації. Репліковані продукти ПЛР додатково підтверджували за допомогою секвенування. Антигенний химерний білок РЕ-2а-F2-KDEL характеризується амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 41, а послідовність ДНК, що кодує химерний білок, являє собою SEQ ID NO: 40.

4. Експресія білка РЕ-2а-F2-KDEL

E. coli, що містить плазмиду рЕТ24а-РЕ-2а-F2-KDEL, інкубували в середовищі LB. Бактеріальну культуру індукували за допомогою додавання IPTG для експресії антигенного химерного білка РЕ-2а-F2-KDEL (SEQ ID NO: 41). Способи експресії і екстракції білка описані в прикладі 1.

Приклад 4. Аналіз послідовностей ORF2 з PCV2 різних підгруп

Крім підгрупи 2а існують інші підгрупи вірусу PCV2. Далі показані результати аналізів кількостей аргінінів амінокислотних послідовностей, що кодуються нуклеотидами 1-234 на 5'-кінці ORF2 з PCV2, та амінокислотних послідовностей, що кодуються послідовностями ДНК від нуклеотиду 235 до останнього нуклеотиду ORF2 з PCV2 підгруп PCV2 2b, 2c, 2d і 2e, відповідно.

Послідовності гена ORF2 з PCV2, представлені у Wang et al. (Wang et al., Virus Research 2009, Genetic variation analysis of Chinese strains of porcine circovirus type 2.), застосовували в якості стандартних послідовностей для філогенетичного аналізу SEQ ID NO: 15 та SEQ ID NO: 19. Результат показував, що послідовності ORF2 з PCV2 з SEQ ID NO: 15 і SEQ ID NO: 19 належали до підгрупи PCV2 2b і підгрупи PCV2 2d, відповідно (як показано на фіг. 1). Крім того, послідовності ORF2 із PCV2 з SEQ ID NO: 50 та SEQ ID NO: 52 слугували в якості стандартного штаму підгрупи PCV2 2c і підгрупи PCV2 2e, відповідно.

Результати аналізу послідовності підгрупи PCV2 2b показані в таблиці 3. Фрагмент ORF2 підгрупи PCV2 2b (2b-ORF2) характеризується нуклеотидною послідовністю SEQ ID NO: 15 і амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 16. 21 аргініновий залишок знаходився в амінокислотних послідовностях, що кодуються нуклеотидами 1-234 на 5'-кінці 2b-ORF2, причому 10 аргінінових залишків знаходилися в амінокислотних послідовностях (SEQ ID NO: 18), що кодуються нуклеотидами 235-699 (без стоп-кодона SEQ ID NO: 17) 2b-ORF2. Результати аналізу послідовності підгрупи PCV2 2b узгоджувалися з результатами підгрупи PCV2 2а. Кількості аргінінів на N-кінці обох білків ORF2 в два рази або більше перевищували кількості аргінінів в іншій частині білків ORF2 (що показано в таблицях 2 та 3).

Таблиця 3. Аналіз кількостей аргінінів амінокислотної послідовності 2b-ORF2 PCV2

Підгрупа PCV2-2b – нуклеотиди 1-234			Підгрупа PCV2-2b – нуклеотиди 235-699		
Кодон	Амінокислота	Кількість	Кодон	Амінокислота	Кількість
AGA	Аргінін	5	AGA	Аргінін	5
AGG	Аргінін	3	AGG	Аргінін	1
CGA	Аргінін	1	CGA	Аргінін	0
CGC	Аргінін	9	CGC	Аргінін	3
CGG	Аргінін	1	CGG	Аргінін	0
CGT	Аргінін	2	CGT	Аргінін	1
Загалом		21	Загалом		10

Результати аналізу послідовності підгрупи PCV2 2c показані в таблиці 4. Фрагмент ORF2

підгрупи PCV2 2с (2с-ORF2) характеризується нуклеотидною послідовністю SEQ ID NO: 50 і амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 51. 20 аргінінових залишків знаходилися в амінокислотних послідовностях, що кодуються нуклеотидами 1-234 на 5'-кінці 2с-ORF2, причому 10 аргінінових залишків знаходилися в амінокислотних послідовностях (SEQ ID NO: 55), що кодуються нуклеотидами 235-702 (SEQ ID NO: 54) 2с-ORF2. Результати аналізу послідовності підгрупи PCV2 2с узгоджувалися з такими підгрупи PCV2 2а і підгрупи PCV2 2b. Кількості аргінінів на N-кінці всіх трьох білків ORF2 у два рази або більше перевищували кількості аргінінів в іншій частині білків ORF2 (що показано в таблицях 2, 3 і 4).

Таблиця 4. Аналіз кількостей аргінінів амінокислотної послідовності 2с-ORF2 PCV2

Підгрупа PCV2-2с – нуклеотиди 1-234			Підгрупа PCV2-2с – нуклеотиди 235-702		
Кодон	Амінокислота	Кількість	Кодон	Амінокислота	Кількість
AGA	Аргінін	5	AGA	Аргінін	6
AGG	Аргінін	3	AGG	Аргінін	1
CGA	Аргінін	0	CGA	Аргінін	0
CGC	Аргінін	9	CGC	Аргінін	2
CGG	Аргінін	1	CGG	Аргінін	0
CGT	Аргінін	2	CGT	Аргінін	1
Загалом		20	Загалом		10

Результати аналізу послідовності підгрупи PCV2 2d показані в таблиці 5. Фрагмент ORF2 підгрупи PCV2 2d (2d-ORF2) характеризується нуклеотидною послідовністю SEQ ID NO: 19 і амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 20. 21 аргініновий залишок знаходився в амінокислотних послідовностях, що кодуються нуклеотидами 1-234 на 5'-кінці 2d-ORF2, причому 10 аргінінових залишків знаходилися в амінокислотних послідовностях (SEQ ID NO: 21), що кодуються нуклеотидами 235-702 (без стоп-кодона SEQ ID NO: 22) 2d-ORF2. Результати аналізу послідовностей підгрупи PCV2 2d узгоджувалися з такими підгрупи PCV2 2а, підгрупи PCV2 2b та підгрупи PCV2 2с. Кількості аргінінів на N-кінці всіх чотирьох білків ORF2 в два рази або більше перевищували кількості аргінінів в іншій частині білків ORF2 (що показано в таблицях 2, 3, 4 і 5).

Таблиця 5. Аналіз кількостей аргінінів амінокислотної послідовності 2d-ORF2 PCV2

Підгрупа PCV2-2d – нуклеотиди 1-234			Підгрупа PCV2-2d – нуклеотиди 235-702		
Кодон	Амінокислота	Кількість	Кодон	Амінокислота	Кількість
AGA	Аргінін	5	AGA	Аргінін	4
AGG	Аргінін	3	AGG	Аргінін	3
CGA	Аргінін	1	CGA	Аргінін	0
CGC	Аргінін	10	CGC	Аргінін	1
CGG	Аргінін	0	CGG	Аргінін	1
CGT	Аргінін	2	CGT	Аргінін	1
Загалом		21	Загалом		10

Результати аналізу послідовності підгрупи PCV2 2е показані в таблиці 6. Фрагмент ORF2 підгрупи PCV2 2е (2е-ORF2) характеризується нуклеотидною послідовністю SEQ ID NO: 52 і амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 53. 20 аргінінових залишків знаходилися в амінокислотних послідовностях, що кодуються нуклеотидами 1-234 на 5'-кінці 2е-ORF2, в той час як 9 аргінінових залишків знаходилися в амінокислотних послідовностях (SEQ ID NO: 57), що кодуються нуклеотидами 235-699 (без стоп-кодона SEQ ID NO: 56) 2е-ORF2. Результати аналізу послідовності підгрупи PCV2 2е узгоджувалися з такими підгрупи PCV2 2а, підгрупи PCV2 2b, підгрупи PCV2 2с та підгрупи PCV2 2d. Кількості аргінінів на N-кінці всіх п'яти білків ORF2 в два рази або більше перевищували кількості аргінінів в іншій частині білків ORF2 (що показано в таблицях 2, 3, 4, 5 і 6).

Таблиця 6. Аналіз кількостей аргінінів амінокислотної послідовності 2e-ORF2 PCV2

Підгрупа PCV2-2e – нуклеотиди 1-234			Підгрупа PCV2-2e – нуклеотиди 235-699		
Кодон	Амінокислота	Кількість	Кодон	Амінокислота	Кількість
AGA	Аргінін	5	AGA	Аргінін	4
AGG	Аргінін	3	AGG	Аргінін	2
CGA	Аргінін	0	CGA	Аргінін	0
CGC	Аргінін	9	CGC	Аргінін	2
CGG	Аргінін	1	CGG	Аргінін	0
CGT	Аргінін	2	CGT	Аргінін	1
Загалом		20	Загалом		9

Рівні експресії збагачених аргінінами і незбагачених аргінінами білкових доменів підгрупи PCV2 2b, підгрупи PCV2 2c, підгрупи PCV2 2d та підгрупи PCV2 2e також аналізували за допомогою способу, описаного в прикладі 1. Результати були порівняні з результатами з прикладу 1. Рівень експресії збагачених аргінінами білкових доменів на N-кінці був низьким, тоді як рівень експресії незбагаченого аргініном білкового домену був високим. Крім того, аналіз додавання або делеції аргініну показував, що делеція надлишкового аргініну може підвищити експресію білка з ORF2 з PCV2, що також порівнювано з результатами підгрупи PCV2 2a.

Збагачений аргініном домен характеризується амінокислотною послідовністю з приблизно залишків 1-78 на N-кінці повнорозмірного пептиду ORF2 з PCV2, а незбагачений аргініном домен характеризується амінокислотною послідовністю приблизно від 79 до останнього залишку на C-кінці.

Приклад 5. Будівання і експресія антигенних пептидів субодиночної вакцини проти PCV2 2b
1. Будівання і експресія pET24a-2b-F2

В даному прикладі ген ORF2 підгрупи PCV2 2b з прикладу 4 використали під час будівання антигенного пептиду субодиночної вакцини проти PCV2. Як описано в прикладах 1 і 3, фрагмент F2 (нуклеотиди 235-468 на 5'-кінці повнорозмірної послідовності ДНК гена ORF2 з PCV2 2b, фрагмент 2b-F2) клонували в вектор експресії. Фрагмент 2b-F2 підгрупи PCV2 2b характеризується нуклеотидною послідовністю SEQ ID NO: 17 та амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 18. Нуклеотидну послідовність фрагмента 2b-F2 ампліфікували за допомогою ПЛР. Далі показані праймери ПЛР.

Прямий праймер pF-2b (з сайтом рестрикції *Sac* I):

5'- CGAGCTCTTTCTTCCCCCAGGAGGGGGC -3' (SEQ ID NO: 42)

Sac I

Зворотний праймер pR-2b (з сайтом рестрикції *Hind* III):

5'- CCCAAGCTTGTAGGAGAAGGGCTGGGTAT -3' (SEQ ID NO: 43)

Hind III

Умови для реакції ПЛР включали 95°C протягом 5 хвилин, 25 циклів 95°C протягом 30 секунд, 55°C протягом 30 секунд, і 72°C протягом 30 секунд, і 72°C протягом 5 хвилин для елонгації. Продукт ПЛР і вектор експресії pET24a (Novagen) піддавали подвійному розщепленню ферментами рестрикції за допомогою *Sac* I і *Hind* III. Потім, розщеплені продукти ПЛР і вектор експресії pET24a очищали, відповідно, з наступним лігуванням для клонування продукту ПЛР в вектор експресії pET24 з отриманням плазмиди pET24a-2b-F2. Потім, конструкт трансформували в клітини-хазяїни (*E. coli*) для здійснення масової реплікації. Репліковані продукти ПЛР додатково підтверджували за допомогою секвенування. *E. coli*, що містить плазмиду pET24a-2b-F2, інкубували в середовищі LB. Бактеріальну культуру індукували за допомогою додавання IPTG для експресії антигенного білка 2b-F2 (SEQ ID NO: 18). Способи експресії і екстракції білка описані в прикладі 1.

2. Будівання і експресія pET24a-PE-2b-F2-KDEL

Крім застосування пептиду 2b-F2 в якості антигенного пептиду субодиночної вакцини проти PCV2, в даному прикладі білок PE і сигнальний пептид KDEL зливали з пептидом 2b-F2 на N- та C-кінцях, відповідно, з отриманням рекомбінантного химерного білка PE-2b-F2-KDEL для індукування відповідного імунітету проти інфекції PCV2 у тварин.

Рекомбінантний химерний білок PE-2b-F2-KDEL характеризується послідовністю ДНК SEQ ID NO: 44 і амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 45. Принцип будівання плазмиди, що експресує рекомбінантний химерний білок PE-2b-F2-KDEL (pET24a-PE-2b-F2-KDEL), був таким же, як і принцип, описаний в прикладі 3. Спочатку, послідовність ДНК (SEQ ID NO: 30), що кодує сигнальний пептид KDEL, клонували в вектор pET24a з отриманням плазмиди pET24a-KDEL.

Спосіб будування плазмід рЕТ24а-KDEL описаний в прикладі 3. Після чого, послідовність ДНК (SEQ ID NO: 17) фрагмента 2b-F2 клонували в плазміді рЕТ24а-KDEL з отриманням плазмід рЕТ24а-2b-F2-KDEL. Нарешті, послідовність ДНК (SEQ ID NO: 34), що кодує білок PE, клонували в плазміді рЕТ24а-2b-F2-KDEL з отриманням плазмід рЕТ24а-PE-2b-F2-KDEL.

Спосіб будування плазмід рЕТ24а-PE-2b-F2-KDEL описаний у прикладі 3. Потім, *E. coli*, що містить плазмід рЕТ24а-PE-2b-F2-KDEL, інкубували в середовищі LB. Бактеріальну культуру індукували за допомогою додавання IPTG для експресії рекомбінантного білка PE-2b-F2-KDEL (SEQ ID NO: 45). Способи експресії і екстракції білка описані в прикладі 1.

Приклад 6. Будування і експресія антигенних пептидів субодиночної вакцини проти PCV2 2d

1. Будування і експресія рЕТ24а-2d-F2

В даному прикладі ген ORF2 підгрупи PCV2 2d з прикладу 4 застосовували під час будування антигенного пептиду субодиночної вакцини проти PCV2. Як описано в прикладах 1 і 3, фрагмент F2 (нуклеотиди 235-468 на 5'-кінці повнорозмірної послідовності ДНК гена ORF2 PCV2 2d, фрагмент 2d-F2) клонували в вектор експресії. Фрагмент 2d-F2 підгрупи PCV2 2d характеризується нуклеотидною послідовністю SEQ ID NO: 21 та амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 22. Нуклеотидну послідовність фрагмента 2d-F2 ампліфікували за допомогою ПЛР. Далі показані праймери ПЛР.

Прямий праймер рF-2d (з сайтом рестрикції *Sac* I):

5'- CGAGCTCTTTCTTCCCCCAGGAGGGGGC -3' (SEQ ID NO: 46)

Sac I

Зворотний праймер рR-2d (з сайтом рестрикції *Hind* III):

5'- CCCAAGCTTGTAGGAGAAGGGCTGGGTTAT -3' (SEQ ID NO: 47)

Hind III

Умови для реакції ПЛР включали 95°C протягом 5 хвилин, 25 циклів 95°C протягом 30 секунд, 55°C протягом 30 секунд, і 72°C протягом 30 секунд, і 72°C протягом 5 хвилин для елонгації. Продукт ПЛР і вектор експресії рЕТ24а (Novagen) піддавали подвійному розщепленню ферментами рестрикції за допомогою *Sac* I і *Hind* III. Потім, розщеплені продукти ПЛР і вектор експресії рЕТ24а очищали, відповідно, з наступним лігуванням для клонування продукту ПЛР у вектор експресії рЕТ24а з отриманням плазмід рЕТ24а-2d-F2. Потім, конструкт трансформували в клітини-хазяїни (*E. coli*) для здійснення масової реплікації. Репліковані продукти ПЛР додатково підтверджували за допомогою секвенування. *E. coli*, що містить плазмід рЕТ24а-2d-F2, інкубували в середовищі LB. Бактеріальну культуру індукували за допомогою додавання IPTG для експресії антигенного білка 2d-F2 (SEQ ID NO: 22). Способи експресії і екстракції білка описані в прикладі 1.

2. Будування і експресія рЕТ24а-PE-2d-F2-KDEL

Крім застосування пептиду 2d-F2 в якості антигенного пептиду субодиночної вакцини проти PCV2, в даному прикладі білок PE і сигнальний пептид KDEL зливали з пептидом 2d-F2 на N- та C-кінцях, відповідно, для отримання рекомбінантного химерного білка PE-2d-F2-KDEL для індукування відповідного імунітету проти інфекції PCV2 у тварин.

Рекомбінантний химерний білок PE-2d-F2-KDEL характеризується послідовністю ДНК SEQ ID NO: 48 і амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 49. Принцип будування плазмід, що експресує рекомбінантний химерний білок PE-2d-F2-KDEL (рЕТ24а-PE-2d-F2-KDEL), був таким же, як і принцип, описаний в прикладі 3. Спочатку, послідовність ДНК (SEQ ID NO: 30), що кодує сигнальний пептид KDEL, клонували в вектор рЕТ24а з отриманням плазмід рЕТ24а-KDEL. Спосіб будування плазмід рЕТ24а-KDEL описаний в прикладі 3. Після чого, послідовність ДНК (SEQ ID NO: 21) фрагмента 2d-F2 клонували в плазміді рЕТ24а-KDEL з отриманням плазмід рЕТ24а-2d-F2-KDEL. Нарешті, послідовність ДНК (SEQ ID NO: 34), що кодує білок PE, клонували в плазміді рЕТ24а-2d-F2-KDEL з отриманням плазмід рЕТ24а-PE-2d-F2-KDEL. Спосіб будування плазмід рЕТ24а-PE-2d-F2-KDEL описаний в прикладі 3. Потім, *E. coli*, що містить плазмід рЕТ24а-PE-2d-F2-KDEL, інкубували в середовищі LB. Бактеріальну культуру індукували за допомогою додавання IPTG для експресії рекомбінантного білка PE-2d-F2-KDEL (SEQ ID NO: 49). Способи експресії і екстракції білка описані в прикладі 1.

Приклад 7. Аналіз імуногенності антигенних пептидів субодиночної вакцини-1 проти PCV2

1. Імунізація мишей

Субодиночну вакцину проти PCV2 отримували з рекомбінантним білком 2a-F2 (SEQ ID NO: 6), отриманим в прикладі 1, і рекомбінантним білком PE-2a-F2-KDEL (SEQ ID NO: 41), отриманим в прикладі 3, відповідно, і повним ад'ювантом Фрейнда. Мишей вакцинували субодиночною вакциною проти PCV2 для аналізу імуногенності антигенних пептидів субодиночної вакцини проти PCV2.

Здорових SPF мишей віком від п'яти до шести тижнів рандомно розділяли на 3 групи по 3

мишей в кожній. Твердофазний імуноферментний аналіз (ELISA) показував, що всі 9 мишей були негативними на антитіла до PCV2. Кожній миші з 2 груп вакцинації (групи 1 і 2) вводили ін'єкцією підшкірно 100 мкг рекомбінантного білка. Мишам з групи 3 вводили ін'єкцією PBS і використовували в якості негативного контролю. Через два тижні після первинної імунізації (p.i.) мишам з 2 груп вакцинації повторно вводили таку ж дозу 2 різних рекомбінантних білків, відповідно. Зразки сироватки збирали через 2, 4, 5 і 8 тижнів після первинної імунізації. Всі зразки сироватки тестували за допомогою ELISA для вимірювання титру антитіл до PCV2.

2. Визначення антитіл до PCV2 за допомогою ELISA

В даному прикладі використовували планшети з дев'яносто шістьма лунками, що містять патогенний антиген PCV2 (300 нг/лунка), в якості планшетів для ELISA. Планшети для ELISA промивали 3 рази 50 ммоль/л PBS (pH 7,2), що містить 500 мкл/л Твін-20 (тобто PBST), протягом від 3 до 5 хвилин кожен раз. Для блокування планшетів для ELISA додавали 200 мкл 0,15% блокувального розчину BSA в кожну лунку планшетів для ELISA, а потім планшети для ELISA інкубували протягом 2 годин при 37°C. Після чого планшети для ELISA промивали PBS. Зразки сироватки мишей розводили в п'ятдесят разів (1:50) за допомогою PBS, а потім послідовно розводили в два рази. Кожен зразок мав 8 повторів. Розведені зразки сироватки додавали в лунки планшетів для ELISA (100 мкл/лунка) та планшети інкубували протягом 1 години при 37°C. Після інкубування планшети промивали PBS. Потім в лунки додавали антитіло до IgG миші, кон'юговане з лужною фосфатазою (AP). Після інкубування протягом 1 години при 37°C планшети промивали PBS. Для візуалізації результатів у лунки додавали паранітрофенілфосфат (pNPP). Після інкубації реакцію зупиняли шляхом додавання 1M NaOH. Оптичну щільність кожної лунки зчитували за допомогою пристрою для зчитування оптичної щільності при 405 нм. Кожен зразок аналізували у двох повторностях і значення O.D. від дублів усереднювали.

Результати ELISA показані на фіг. 6. Рекомбінантний білок PE-2a-F2-KDEL (SEQ ID NO: 41) індукував більш високий рівень сироваткових антитіл до PCV2 у тестованих тварин, ніж індукував рекомбінантний білок 2a-F2 (SEQ ID NO: 6). Відмінності між рівнями сироваткових антитіл до PCV2 в групі 1 та в групі 2 були значущими через 4 тижні після первинної імунізації ($p < 0,05$). Відмінності між рівнями сироваткових антитіл до PCV2 в групі 1 та в групі 2 були більш значущими на тижні 6 після первинної імунізації ($p < 0,01$). Додатково, порівняно з рівнем антитіл негативного контролю, рівні антитіл групи 1 і групи 2 були значно вище ($p < 0,01$).

Приклад 8. Аналіз імуногенності антигенних пептидів субодиночної вакцини-2 проти PCV2

1. Імунізація мишей

В даному прикладі імуногенність розкритого в даному документі рекомбінантного білка PE-2a-F2-KDEL у тестованих тварин порівнювали з імуногенністю цілого вірусу PCV2 у тестованих тварин.

Субодиночну вакцину проти PCV2 отримували з рекомбінантним білком PE-2a-F2-KDEL (SEQ ID NO: 41), отриманим в прикладі 3, і масляним ад'ювантом Montanide ISA 206 (Seppic, Франція). Крім того, вакцину на основі цілого вірусу PCV2 отримували за допомогою інактивованого цілого вірусу PCV2 (10^6 TCID₅₀/мл) і масляного ад'юванта Montanide ISA 206 (Seppic, Франція). В одній дозі вакцини на основі цілого вірусу PCV2 було 100 мкл інактивованого цілого вірусу PCV2 і 250 мкл ад'юванта. Для вакцинації мишей застосовували дві вакцини.

Здорових SPF мишей віком від п'яти до шести тижнів рандомно розділяли на 3 групи по 5 мишей в кожній. Твердофазний імуноферментний аналіз (ELISA) показував, що всі 15 мишей були негативними за антитілами до PCV2. Кожній миші з групи 1 вводили ін'єкцією підшкірно 100 мкг рекомбінантного білка. Кожній миші з групи 1 вводили ін'єкцією підшкірно одну дозу вакцини на основі цілого вірусу PCV2. Мишам з групи 3 вводили ін'єкцією масляний ад'ювант Montanide ISA 206 і використовували в якості негативного контролю. Через три тижні після первинної імунізації (p.i.), мишам з 2 груп вакцинації повторно вводили таку ж дозу 2 різних вакцин, відповідно. Зразки сироватки збирали через 0, 1, 2, 3, 4 і 5 тижнів після первинної імунізації. Всі зразки сироватки тестували за допомогою ELISA для вимірювання титру антитіл до PCV2.

2. Визначення антитіл до PCV2 за допомогою ELISA

Спосіб визначення ELISA антитіл до PCV2 описаний у прикладі 7. Результати ELISA показані на фіг. 7. Рекомбінантний білок PE-2a-F2-KDEL (SEQ ID NO: 41) індукував більш високий рівень сироваткових антитіл до PCV2 у тестованих тварин, ніж індукував антиген цілого вірусу PCV2. Відмінності між рівнями сироваткових антитіл до PCV2 в групі 1 та в групі 2 були значущими через 1 тиждень після первинної імунізації ($p < 0,001$). Додатково, порівняно з рівнем антитіл негативного контролю, рівень антитіл мишей, вакцинованих рекомбінантним білком PE-2a-F2-KDEL (група 1), був значно вище ($p < 0,001$).

Крім того, свиней вакцинували рекомбінантними білками 2a-F2 і PE-2a-F2-KDEL, відповідно, і обидва рекомбінантні білки були здатні індукувати сироваткові антитіла до PCV2 у свиней. На додаток до цього, вакцинованих свиней заражали вірусом PCV2 для оцінки ефективності рекомбінантних білків. Спочатку рекомбінантні білки складали в якості субодиночної вакцини і вводили ін'єкцією свиням. Потім, свиней заражали вірусом PCV2. Результати показували, що ступені захисту груп імунізації були вищими, ніж такі у негативного контролю (без вакцинації). В контексті даного документу ступені захисту включають зниження вірусемії і пом'якшення симптомів, спричинених PCV2. Таким чином, результати показували, що субодиночна вакцина PCV2, отримана за допомогою рекомбінантних білків, могла ефективно індукувати імунітет у тварин і збільшувати показник виживаності тварин.

Додатково, білки ORF2 або їх фрагменти підгрупи PCV2 2b, підгрупи PCV2 2c, підгрупи PCV2 2d і підгрупи PCV2 2e отримували за допомогою способів, описаних у прикладах 1-3, відповідно, і імуногенність білків ORF2 або їх фрагментів аналізували за допомогою способів, описаних у прикладах 7 і 8. Результати показували, що фрагменти ORF2 таких підгруп PCV2 (наприклад, фрагмент F2) і їх рекомбінантні химерні білки (наприклад, PE-F2-KDEL) можуть індукувати імунітет у тварин (таких як свині) і попереджати у тварин інфекцію PCV2.

Субодиночна вакцина PCV2, забезпечена даним розкриттям, мала наведені далі переваги порівняно з іншими традиційними методиками.

Субодиночну вакцину PCV2, забезпечену даним розкриттям, отримували за допомогою генної інженерії, при якій фрагменти білка ORF2 з PCV2, які можуть бути експресовані в більш високій мірі в біологічних системах експресії, клонували і застосовували в якості антигенних пептидів субодиночної вакцини. Субодиночна вакцина могла індукувати відповідний імунітет до інфекції PCV2 у тварин, і фрагменти білка ORF2 з PCV2 могли бути масово відтворені за допомогою генної інженерії для зменшення вартості виробництва вакцини.

Інша субодиночна вакцина PCV2, забезпечена даним розкриттям, містила антигенний химерний білок PE-F2-KDEL, який був рекомбінантним білком пептиду F2 з ORF2 з PCV2, білка PE і сигнального пептиду KDEL. Випробування на тваринах показали, що дана субодиночна вакцина проти PCV2 могла відповідним чином індукувати більш високий імунітет до інфекції PCV2 у тварин.

Субодиночну вакцину, забезпечену даним розкриттям, розробляли за допомогою генної інженерії, і вакцина мала наступні переваги: простий спосіб отримання, низька вартість, висока чистота, великий вихід і хороша безпека.

Звичайно ж, може бути здійснено безліч змін і модифікацій в описаному вище варіанті здійснення за даним винаходом без відступу від його обсягу. Відповідно, щоб сприяти прогресу в науці і корисних галузях техніки, даний винахід розкривають і передбачають, що він обмежений лише обсягом доданої формули винаходу.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> СВК Вірбак Біотек Ко., Лтд.

<120> Субодинична вакцина проти цирковірусу свиней типу 2 (PCV2)

<130> P14-0101

<150> US 61/567,248

<151> 2011-12-06

<150> PCT/CN2012/085907

<151> 2012-12-05

<160> 57

<170> PatentIn версія 3.5

<210> 1

<211> 699

<212> ДНК

<213> Цирковірус свиней

<400> 1

atgacgtatc	caaggaggcg	tttcgcgaga	cgaagacacc	gccccgcgag	ccatcttggc	60
cagatcctcc	gccgccgccc	ctggctcgtc	cacccccgcc	accggtaccg	ctggagaagg	120
aaaaatggca	tcttcaacac	cgcctctcc	cgcaccttcg	gatatactgt	caaggctagc	180
acagtcagaa	cgcctcctcg	ggcgggtggac	atgatgagat	ttaatatata	cgactttgtt	240
cccccgggag	gggggaccaa	caaaatctct	ataccctttg	aatactacag	aataagaaaag	300
gttaagggtg	aattctggcc	ctgctcccca	atcacccagg	gtgacagggg	agtggtgtcc	360
actgctgtta	ttctagatga	taactttgta	actaaggcca	cagccctaac	ctatgacccc	420
tatgtaaact	actctccccc	ccatacaatc	ccccaacctc	tctctacca	ctcccggtac	480
tttaccacca	aacctgtcct	tgattccact	attgattact	tccaacaaaa	cagcaaaaagg	540
aatcagattt	ggctgaggct	acaaacctcg	gcaaatgtgg	accacgtagg	cctcgggtact	600
gcgttcgaaa	acagtaaata	cgaccaggac	tacaatatcc	gtgtaactat	gtatgtacaa	660
ttcagagaat	ttaatcttaa	agacccccca	cttaaacc			699

<210> 2

<211> 233

<212> БІЛЛОК

<213> Цирковірус свиней

<400> 2

Met	Thr	Tyr	Pro	Arg	Arg	Arg	Phe	Arg	Arg	Arg	Arg	His	Arg	Pro	Arg
1				5					10					15	
Ser	His	Leu	Gly	Gln	Ile	Leu	Arg	Arg	Arg	Pro	Trp	Leu	Val	His	Pro
			20					25					30		
Arg	His	Arg	Tyr	Arg	Trp	Arg	Arg	Lys	Asn	Gly	Ile	Phe	Asn	Thr	Arg
			35				40					45			
Leu	Ser	Arg	Thr	Phe	Gly	Tyr	Thr	Val	Lys	Ala	Ser	Thr	Val	Arg	Thr
			50			55				60					
Pro	Ser	Trp	Ala	Val	Asp	Met	Met	Arg	Phe	Asn	Ile	Asn	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 Ser Lys Arg Asn Gln Ile Trp Leu Arg Leu Gln Thr Ser Ala Asn
      180              185              190
Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Lys Tyr Asp
      195              200              205
Gln Asp Tyr Asn Ile Arg 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> 3
 <211> 234
 <212> ДНК
 <213> Цирковірус свиней

```

<400> 3
atgacgtatc caaggaggcg ttccgcgaga cgaagacacc gccccgcgag ccatcttggc      60
cagatcctcc gccgccgccc ctggctcgtc caccgccgcc accgttacg ctggagaagg      120
aaaaatggca tcttcaacac ccgcctctcc cgcaccttcg gatatactgt caaggctagc      180
acagtcagaa cgccctcctg ggcggtggac atgatgagat ttaatatata cgac      234

```

<210> 4
 <211> 78
 <212> БІЛОК
 <213> Цирковірус свиней

```

<400> 4
Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Phe Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg
1      5      10      15
Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro
      20      25      30
Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg
      35      40      45
Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Val Lys Ala Ser Thr Val Arg Thr
      50      55      60
Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asn Asp
65      70      75

```

<210> 5
 <211> 234
 <212> ДНК
 <213> Цирковірус свиней

```

<400> 5
tttgttcccc cgggaggggg gaccaacaaa atctctatac cctttgaata ctacagaata      60
agaaagggtta aggttgaatt ctggccctgc tcccacatca cccagggtga caggggagtg      120
ggctccactg ctgttattct agatgataac tttgtaacta aggccacagc cctaaccctat      180
gaccctatg taaactactc ctcccgccat acaatcccc aacccttctc ctac      234

```

<210> 6
 <211> 78
 <212> БІЛОК
 <213> Цирковірус свиней

<400> 6
Phe Val Pro Pro Gly Gly Gly Thr Asn Lys Ile Ser Ile Pro Phe Glu
1 5 10 15
Tyr Tyr Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro
20 25 30
Ile Thr Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp
35 40 45
Asp Asn Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val
50 55 60
Asn Tyr Ser Ser Arg His Thr Ile Pro Gln Pro Phe Ser Tyr
65 70 75

<210> 7
<211> 231
<212> ДНК
<213> Цирковірус свиней

<400> 7
cactcccggg actttacccc aaaacctgtc cttgattcca ctattgatta cttccaacca 60
aacagcaaaa ggaatcagat ttggctgagg ctacaaacct cggcaaatgt ggaccacgta 120
ggcctcggta ctgctgttga aaacagtaaa tacgaccagg actacaatat ccgtgtaact 180
atgtatgtac aattcagaga atttaattctt aaagaccccc cacttaaacc c 231

<210> 8
<211> 77
<212> БІЛОК
<213> Цирковірус свиней

<400> 8
His Ser Arg Tyr Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp
1 5 10 15
Tyr Phe Gln Pro Asn Ser Lys Arg Asn Gln Ile Trp Leu Arg Leu Gln
20 25 30
Thr Ser Ala Asn Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn
35 40 45
Ser Lys Tyr Asp Gln Asp Tyr Asn Ile Arg Val Thr Met Tyr Val Gln
50 55 60
Phe Arg Glu Phe Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Lys Pro
65 70 75

<210> 9
<211> 351
<212> ДНК
<213> Цирковірус свиней

<400> 9
ggagtgggct ccactgctgt tattctagat gataactttg taactaaggc cacagcccta 60
acctatgacc cctatgtaaa ctactcctcc cgccatacaa tcccccaacc cttctcctac 120
cactcccggg actttacccc aaaacctgtc cttgattcca ctattgatta cttccaacca 180
aacagcaaaa ggaatcagat ttggctgagg ctacaaacct cggcaaatgt ggaccacgta 240
ggcctcggta ctgctgttga aaacagtaaa tacgaccagg actacaatat ccgtgtaact 300
atgtatgtac aattcagaga atttaattctt aaagaccccc cacttaaacc c 351

<210> 10
<211> 117
<212> БІЛОК

<213> Цирковірус свиней

<400> 10

```

Gly Val Gly Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn Phe Val Thr Lys
1      5      10      15
Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr Ser Ser Arg His
      20      25      30
Thr Ile Pro Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr Phe Thr Pro Lys
      35      40      45
Pro Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro Asn Ser Lys Arg
      50      55      60
Asn Gln Ile Trp Leu Arg Leu Gln Thr Ser Ala Asn Val Asp His Val
65      70      75      80
Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Lys Tyr Asp Gln Asp Tyr Asn
      85      90      95
Ile Arg Val Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe Asn Leu Lys Asp
      100      105      110
Pro Pro Leu Lys Pro
      115

```

<210> 11

<211> 465

<212> ДНК

<213> Цирковірус свиней

<400> 11

```

tttgttcccc cgggaggggg gaccaacaaa atctctatac cctttgaata ctacagaata      60
agaaagggtta aggttgaatt ctggccctgc tcccacatca cccagggtga caggggagtg      120
ggctccactg ctgttattct agatgataac tttgtaacta aggccacagc cctaacctat      180
gaccctatg taaactactc ctcccgccat acaatcccc aacccttctc ctaccactcc      240
cggtacttta ccccaaaacc tgtccttgat tccactattg attacttcca accaaacagc      300
aaaaggaatc agatttggct gaggctacaa acctcggcaa atgtggacca cgtaggcctc      360
ggtagtgcgt tcgaaaacag taaatacgac caggactaca atatccgtgt aactatgtat      420
gtacaattca gagaatttaa tcttaaagac ccccactta aacctt      465

```

<210> 12

<211> 155

<212> БІЛОК

<213> Цирковірус свиней

<400> 12

```

Phe Val Pro Pro Gly Gly Gly Thr Asn Lys Ile Ser Ile Pro Phe Glu
1      5      10      15
Tyr Tyr Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro
      20      25      30
Ile Thr Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp
      35      40      45
Asp Asn Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val
      50      55      60
Asn Tyr Ser Ser Arg His Thr Ile Pro Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser
65      70      75      80
Arg Tyr Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Phe
      85      90      95
Gln Pro Asn Ser Lys Arg Asn Gln Ile Trp Leu Arg Leu Gln Thr Ser
      100      105      110
Ala Asn Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Lys
      115      120      125
Tyr Asp Gln Asp Tyr Asn Ile Arg Val Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg
      130      135      140

```

Glu Phe Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Lys Pro
145 150 155

<210> 13
<211> 468
<212> ДНК
<213> Цирковірус свиней

```
<400> 13
atgacgtatc caaggaggcg ttcccgaga cgaagacacc gccccgcag ccattctggc 60
cagatcctcc gccgcccgcc ctggctcgtc ccccccgcc accgttaccg ctggagaagg 120
aaaaatggca tcttcaacac ccgcctctcc cgcaccttcg gatatactgt caaggctagc 180
acagtacaga cgccctcctg gccggtggac atgatgagat ttaatatata cgactttgtt 240
ccccgggag gggggaccaa caaaatctct atacccttg aatactacag aataagaaag 300
gttaagggtt aattctggcc ctgctcccca atcaccagg gtgacagggg agtgggctcc 360
actgctgtta ttctagatga taactttgta actaaggcca cagccctaac ctatgacccc 420
tatgtaaact actcctcccg ccatacaatc cccaaccct tctcctac 468
```

<210> 14
<211> 156
<212> БІЛОК
<213> Цирковірус свиней

```
<400> 14
Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Phe Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg
1 5 10 15
Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro
20 25 30
Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg
35 40 45
Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Val Lys Ala Ser Thr Val Arg Thr
50 55 60
Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asn 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
145 150 155
```

<210> 15
<211> 702
<212> ДНК
<213> Цирковірус свиней

```
<400> 15
atgacgtatc caaggaggcg ttaccggaga agaagacacc gccccgcag ccattctgga 60
cagatcctcc gccgcccgcc ctggctcgtc ccccccgcc accgttaccg ctggagaagg 120
aaaaatggca tcttcaacac ccgcctctcc cgcaccttcg gatatactat caagcgaacc 180
acagtcaaaa cgccctcctg gccggtggac atgatgagat tcaatatata tgactttctt 240
ccccaggag ggggctcaaa ccccgctct gtgcccttg aatactacag aataagaaag 300
gttaagggtt aattctggcc ctgctcccg atcaccagg gtgacagggg agtgggctcc 360
agtgctgtta ttctagatga taactttgta acaaaggcca cagccctcac ctatgacccc 420
```

```
tatgtaaact actcctcccg ccataccata acccagccct tctcctacca ctcccgtac 480
tttacccecca aacctgtcct agattccact attgattact tccaacccaaa caacaaaaga 540
aatcagctgt ggctgagact acaaactgct ggaaatgtag accacgtagg cctcggcact 600
gcgttcgaaa acagtatata cgaccaggaa tacaatatcc gtgtaacccat gtatgtacaa 660
ttcagagaat ttaatcttaa agacccccca cttaccctt aa 702
```

<210> 16
 <211> 233
 <212> БІЛОК
 <213> Цирковірус свиней

```
<400> 16
Met Thr Tyr Pro Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg
1          5          10          15
Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro
20          25          30
Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg
35          40          45
Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Ile Lys Arg Thr Thr Val Lys Thr
50          55          60
Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asn Asp Phe Leu
65          70          75          80
Pro Pro Gly Gly Gly Ser Asn Pro Arg Ser Val Pro Phe Glu Tyr Tyr
85          90          95
Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr
100          105          110
Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Ser Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn
115          120          125
Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr
130          135          140
Ser Ser Arg His Thr Ile Thr Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr
145          150          155          160
Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro
165          170          175
Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Ala Gly Asn
180          185          190
Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Ile Tyr Asp
195          200          205
Gln Glu Tyr Asn Ile Arg Val Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe
210          215          220
Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Asn Pro
225          230
```

<210> 17
 <211> 234
 <212> ДНК
 <213> Цирковірус свиней

```
<400> 17
tttcttcccc caggaggggg ctcaaacccc cgctctgtgc cctttgaata ctacagaata 60
agaaggtta aggttgaatt ctggccctgc tccccgatca cccaggggta caggggagtg 120
ggctccagtg ctgttattct agatgataac tttgtaacaa aggccacagc cctcacctat 180
gacccctatg taaactactc ctcccgccat accataaccc agcccttctc ctac 234
```

<210> 18
 <211> 78
 <212> БІЛОК
 <213> Цирковірус свиней

<400> 18

Phe Leu Pro Pro Gly Gly Gly Ser Asn Pro Arg Ser Val Pro Phe Glu
 1 5 10 15
 Tyr Tyr Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro
 20 25 30
 Ile Thr Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Ser Ala Val Ile Leu Asp
 35 40 45
 Asp Asn Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val
 50 55 60
 Asn Tyr Ser Ser Arg His Thr Ile Thr Gln Pro Phe Ser Tyr
 65 70 75

<210> 19

<211> 705

<212> ДНК

<213> Цирковірус свиней

<400> 19

atgacgtatc	caaggaggcg	ttaccgcaga	cgaagacacc	gcccccgag	ccatcttggc	60
cagatcctcc	gccgccgccc	ctggctagtc	cacccccgcc	accgttaccg	ctggagaagg	120
aaaaatggca	tcttcaacac	ccgcctctcc	cgcaccatcg	gttatactgt	caagaaaacc	180
acagtcagaa	cgcctctctg	gaatgtggac	atgatgagat	ttaatattaa	tgattttctt	240
cccccaggag	ggggctcaag	ccccctcact	gtgccttttg	aatactacag	aataaggaag	300
gttaaggttg	aattctggcc	ctgctcccca	atcaccacag	gtgacagggg	agtgagctcc	360
actgctgtta	ttctagatga	taactttgta	acaaaggcca	atgccctaac	ctatgacccc	420
tatgtaaaact	actcctcccg	ccataccata	acccagccct	tctcctacca	ctcccggtag	480
tttacccega	aacctgtcct	tgataggaca	atcgattact	tccaacccaa	taacaaaaga	540
aatcaactct	ggctgagact	acaaactact	ggaaatgtag	accatgtagg	cctcggcact	600
gcgttcgaaa	acagtatata	cgaccaggac	tacaatatcc	gtataaccat	gtatgtacaa	660
ttcagagaat	ttaatcttaa	agacccccca	cttaacccta	agtga		705

<210> 20

<211> 234

<212> БІЛОК

<213> Цирковірус свиней

<400> 20

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

```

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

```

```

<210> 21
<211> 234
<212> ДНК
<213> Цирковірус свиней
<400> 21
ttttttcccc caggaggggg ctcaagcccc ctcaactgtgc cctttgaata ctacagaata      60
aggaaggtta aggttgaatt ctggccctgc tccccaatca cccagggtga caggggagtg      120
agctccactg ctgttattct agatgataac ttgttaacaa aggccaatgc cctaacctat      180
gaccctatg taaactactc ctcccgccat accataaccc agcccttctc ctac      234

```

```

<210> 22
<211> 78
<212> БІЛІОК
<213> Цирковірус свиней
<400> 22
Phe Leu Pro Pro Gly Gly Gly Ser Ser Pro Leu Thr Val Pro Phe Glu
1          5          10          15
Tyr Tyr Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro
          20          25          30
Ile Thr Gln Gly Asp Arg Gly Val Ser Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp
          35          40          45
Asp Asn Phe Val Thr Lys Ala Asn Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val
          50          55          60
Asn Tyr Ser Ser Arg His Thr Ile Thr Gln Pro Phe Ser Tyr
65          70          75

```

```

<210> 23
<211> 31
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Прямий праймер для F1 з ORF2 з PCV2
<400> 23
cccaagcttg catgacgtat ccaaggaggc g      31

```

```

<210> 24
<211> 31
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Зворотний праймер для F1 з ORF2 з PCV2 2a
<400> 24

```



```

ccgctcgagg ggtttaagtg gggggtcttt a 31

<210> 25
<211> 31
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Прямий праймер для F2 з ORF2 з PCV2 2a

<400> 25
cccaagcttg ctttgttccc ccgggagggg g 31

<210> 26
<211> 31
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зворотний праймер для F2 з ORF2 з PCV2 2a

<400> 26
ccgctcgagg taggagaagg gttgggggat t 31

<210> 27
<211> 31
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Прямий праймер для F3 з ORF2 з PCV2 2a

<400> 27
cccaagcttg ccactcccg tactttacc c 31

<210> 28
<211> 31
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зворотний праймер для F3 з ORF2 з PCV2 2a

<400> 28
ccgctcgagg tcgttaatat taaatctcat c 31

<210> 29
<211> 31
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Прямий праймер для F4 з ORF2 з PCV2 2a

<400> 29
cccaagcttg cggagtgggc tccactgctg t 31

```

```

<210> 30
<211> 48
<212> ДНК
<213> Escherichia coli

<400> 30
ctcaaaaaag acgaactgag agatgaactg aaagacgaac tgtaatga
48

<210> 31
<211> 14
<212> БІЛЛОК
<213> Escherichia coli

<400> 31
Leu Lys Lys Asp Glu Leu Arg Asp Glu Leu Lys Asp Glu Leu
1 5 10

<210> 32
<211> 44
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Прямий праймер для KDEL

<400> 32
cccaagcttc tcaaaaaaga cgaactgaga gatgaactga aaga
44

<210> 33
<211> 31
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зворотний праймер для KDEL

<400> 33
gtgctcgagc agttcgtctt tcagttcatc t
31

<210> 34
<211> 1116
<212> ДНК
<213> Pseudomonas aeruginosa

<300>
<308> Genbank / K01397
<309> 2002-02-11
<313> (821) .. (1936)

<400> 34
gccgaagaag ctttcgacct ctggaacgaa tgcgccaaag cctgcgtgct cgacctcaag 60
gacggcgtgc gttccagccg catgagcgtc gaccgggcca tcgccgacac caacggccag 120
ggcgtgctgc actactccat ggtcctggag ggcgggaacg acgcgctcaa gctggccatc 180
gacaacgccc tcagcatcac cagcgacggc ctgaccatcc gcctcgaagg cggcgtcgag 240
ccgaacaagc cgggtcgcta cagctacacg cgccaggcgc gcggcagttg gtcgctgaac 300

```

```

tggctggtac cgatcggcca cgagaagccc tcgaacatca aggtgttcat ccacgaactg 360
aacgccggca accagctcag ccacatgtcg ccgatctaca ccaccgagat gggcgacgag 420
ttgctagcga agctggcgcg cgatgccacc ttcttcgtca gggcgcacga gagcaacgag 480
atgcagccga cgctcgccat cagccatgcc ggggtcagcg tggtcatggc ccagaccag 540
ccgcgcccggg aaaagcgctg gagcgaatgg gccagcggca aggtgttgtg cctgctcgac 600
ccgctggacg ggggtctacaa ctacctcgcc cagcaacgct gcaacctcga cgatactgg 660
gaaggcaaga tctaccgggt gctcgccggc aaccggcgca agcatgacct ggacatcaaa 720
cccacgggtca tcagtcatcg cctgcacttt cccgagggcg gcagcctggc cgcgctgacc 780
gcgccaccag cttgccacct gccgctggag actttcaccg gtcacgcga gccgcgcgcc 840
tgggaacaac tggagcagtg cggctatccg gtgcagcggc tggtcgccct ctacctggcg 900
gcgcggctgt cgtggaacca ggtcgaccag gtgatccgca acgcctggc cagccccggc 960
agcggcgcgcg acctaggcga agcgatccgc gagcagccgg agcaggcccg tctggccctg 1020
acctgggcgg ccgccgagag cgagcgcttc atccggcagg gcaccggcaa cgacgaggcc 1080
ggcgcgccca acgccgacgt ggtgagcctg acctgc 1116

```

```

<210> 35
<211> 372
<212> EIJOK
<213> Pseudomonas aeruginosa

```

```

<400> 35
Ala Glu Glu Ala Phe Asp Leu Trp Asn Glu Cys Ala Lys Ala Cys Val
1 5 10 15
Leu Asp Leu Lys Asp Gly Val Arg Ser Ser Arg Met Ser Val Asp Pro
20 25 30
Ala Ile Ala Asp Thr Asn Gly Gln Gly Val Leu His Tyr Ser Met Val
35 40 45
Leu Glu Gly Gly Asn Asp Ala Leu Lys Leu Ala Ile Asp Asn Ala Leu
50 55 60
Ser Ile Thr Ser Asp Gly Leu Thr Ile Arg Leu Glu Gly Gly Val Glu
65 70 75 80
Pro Asn Lys Pro Val Arg Tyr Ser Tyr Thr Arg Gln Ala Arg Gly Ser
85 90 95
Trp Ser Leu Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly His Glu Lys Pro Ser Asn
100 105 110
Ile Lys Val Phe Ile His Glu Leu Asn Ala Gly Asn Gln Leu Ser His
115 120 125
Met Ser Pro Ile Tyr Thr Thr Glu Met Gly Asp Glu Leu Leu Ala Lys
130 135 140
Leu Ala Arg Asp Ala Thr Phe Phe Val Arg Ala His Glu Ser Asn Glu
145 150 155 160
Met Gln Pro Thr Leu Ala Ile Ser His Ala Gly Val Ser Val Val Met
165 170 175
Ala Gln Thr Gln Pro Arg Arg Glu Lys Arg Trp Ser Glu Trp Ala Ser
180 185 190
Gly Lys Val Leu Cys Leu Leu Asp Pro Leu Asp Gly Val Tyr Asn Tyr
195 200 205
Leu Ala Gln Gln Arg Cys Asn Leu Asp Asp Thr Trp Glu Gly Lys Ile
210 215 220
Tyr Arg Val Leu Ala Gly Asn Pro Ala Lys His Asp Leu Asp Ile Lys
225 230 235 240
Pro Thr Val Ile Ser His Arg Leu His Phe Pro Glu Gly Gly Ser Leu
245 250 255
Ala Ala Leu Thr Ala His Gln Ala Cys His Leu Pro Leu Glu Thr Phe
260 265 270
Thr Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Glu Gln Cys Gly
275 280 285
Tyr Pro Val Gln Arg Leu Val Ala Leu Tyr Leu Ala Ala Arg Leu Ser
290 295 300
Trp Asn Gln Val Asp Gln Val Ile Arg Asn Ala Leu Ala Ser Pro Gly

```

```

305          310          315          320
Ser Gly Gly Asp Leu Gly Glu Ala Ile Arg Glu Gln Pro Glu Gln Ala
          325          330          335
Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala Ala Ala Glu Ser Glu Arg Phe Ile Arg
          340          345          350
Gln Gly Thr Gly Asn Asp Glu Ala Gly Ala Ala Asn Ala Asp Val Val
          355          360          365
Ser Leu Thr Cys
          370

```

```

<210> 36
<211> 23
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

```

```

<220>
<223> Прямий праймер для PE

```

```

<400> 36
cgggatccga agaagcggtc gac
23

```

```

<210> 37
<211> 32
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

```

```

<220>
<223> Зворотний праймер для PE

```

```

<400> 37
cggaattcga gctcgaggt caggctcacc ac
32

```

```

<210> 38
<211> 28
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

```

```

<220>
<223> Прямий праймер для F1 з ORF2 з PCV2 2a

```

```

<400> 38
cgagctcttt gttccccgg gagggggg
28

```

```

<210> 39
<211> 31
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

```

```

<220>
<223> Зворотний праймер для F1 з ORF2 з PCV2 2a

```

```

<400> 39
cccaagcttg taggagaagg gttgggggat t
31

```

```

<210> 40
<211> 1413

```

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Об'єднана ДНК-послідовність PE, ORF2-F2 з PCV2 2a та KDEL

<400> 40

```

ggatccgaag aagcggttcga cctctggaac gaatgcgcca aagcctgcgt gctcgacctc      60
aaggacggcg tgcgttccag ccgcatgagc gtcgaccggg ccatcgccga caccaacggc      120
cagggcggtgc tgcactactc catggtcctg gagggcgcca acgacgcgct caagctggcc      180
atcgacaacg ccctcagcat caccagcgac ggctgacca tccgcctcga aggcggcgctc      240
gagccgaaca agccggtgcg ctacagctac acgcgccagg cgcgcggcag ttggtcgctg      300
aactggctgg taccgatcgg ccacgagaag ccctcgaaca tcaaggtgtt catccacgaa      360
ctgaacgcgg gcaaccagct cagccacatg tgcgcatct acaccaccga gatgggcgac      420
gagttgctag cgaagctggc gcgcgatgcc accttcttcg tcagggcgca cgagagcaac      480
gagatgcagc cgacgctcgc catcagccat gccgggggtca gcgtgggtcat ggcccagacc      540
cagccgcgcc gggaaaagcg ctggagcgaa tgggccagcg gcaaggtgtt gtgcctgctc      600
gaccgcgtgg acgggggtcta caactacctc gccagcaac gctgcaacct cgacgatacc      660
tggaagggca agatctaccg ggtgctcgcc ggcaaccggc cgaagcatga cctggacatc      720
aaacccacgg tcatcagtca tcgcctgcac ttccccgagg gcggcagcct ggccgcgctg      780
accgcgcacc aggccttgcca cctgccgctg gagactttca cccgtcatcg ccagccgcgc      840
ggctggggaac aactggagca gtgcggctat ccggtgcagc ggctggctgc cctctacctg      900
gcggcgcgcc tgctgtggaa ccaggtcgac caggtgatcc gcaacgcctt ggccagcccc      960
ggcagcgcgcg gcgacctagg cgaagcgatc cgcgagcagc cggagcagcg ccgtctggcc      1020
ctgaccttgg ccgcgcgcga gagcgagcgc ttcatccggc agggcaccgg caacgacgag      1080
gccggcgcgcg ccaacgcccga cgtggtgagc ctgacctgcg agctctttgt tccccgggga      1140
ggggggacca acaaaatctc tatacccttt gaatactaca gaataagaaa ggtaaagggt      1200
gaattctggc cctgctcccc aatcacccag ggtgacaggg gagtgggctc cactgctggt      1260
attctagatg ataactttgt aactaaggcc acagccctaa cctatgacct ctatgtaaac      1320
tactcctccc gccatacaat cccccaaccc ttctctaca agcttctcaa aaaagacgaa      1380
ctgagagatg aactgaaaga cgaactgctc gag                                     1413

```

<210> 41

<211> 471

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Об'єднана амінокислотна послідовність PE, ORF2-F2 з PCV2 2a і KDEL

<400> 41

```

Gly Ser Glu Glu Ala Phe Asp Leu Trp Asn Glu Cys Ala Lys Ala Cys
1           5           10           15
Val Leu Asp Leu Lys Asp Gly Val Arg Ser Ser Arg Met Ser Val Asp
20           25           30
Pro Ala Ile Ala Asp Thr Asn Gly Gln Gly Val Leu His Tyr Ser Met
35           40           45
Val Leu Glu Gly Gly Asn Asp Ala Leu Lys Leu Ala Ile Asp Asn Ala
50           55           60
Leu Ser Ile Thr Ser Asp Gly Leu Thr Ile Arg Leu Glu Gly Gly Val
65           70           75           80
Glu Pro Asn Lys Pro Val Arg Tyr Ser Tyr Thr Arg Gln Ala Arg Gly
85           90           95
Ser Trp Ser Leu Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly His Glu Lys Pro Ser
100          105          110
Asn Ile Lys Val Phe Ile His Glu Leu Asn Ala Gly Asn Gln Leu Ser
115          120          125
His Met Ser Pro Ile Tyr Thr Thr Glu Met Gly Asp Glu Leu Leu Ala

```

```

      130              135              140
Lys Leu Ala Arg Asp Ala Thr Phe Phe Val Arg Ala His Glu Ser Asn
145              150              155              160
Glu Met Gln Pro Thr Leu Ala Ile Ser His Ala Gly Val Ser Val Val
              165              170              175
Met Ala Gln Thr Gln Pro Arg Arg Glu Lys Arg Trp Ser Glu Trp Ala
              180              185              190
Ser Gly Lys Val Leu Cys Leu Leu Asp Pro Leu Asp Gly Val Tyr Asn
              195              200              205
Tyr Leu Ala Gln Gln Arg Cys Asn Leu Asp Asp Thr Trp Glu Gly Lys
              210              215              220
Ile Tyr Arg Val Leu Ala Gly Asn Pro Ala Lys His Asp Leu Asp Ile
225              230              235              240
Lys Pro Thr Val Ile Ser His Arg Leu His Phe Pro Glu Gly Gly Ser
              245              250              255
Leu Ala Ala Leu Thr Ala His Gln Ala Cys His Leu Pro Leu Glu Thr
              260              265              270
Phe Thr Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Glu Gln Cys
              275              280              285
Gly Tyr Pro Val Gln Arg Leu Val Ala Leu Tyr Leu Ala Ala Arg Leu
              290              295              300
Ser Trp Asn Gln Val Asp Gln Val Ile Arg Asn Ala Leu Ala Ser Pro
305              310              315              320
Gly Ser Gly Gly Asp Leu Gly Glu Ala Ile Arg Glu Gln Pro Glu Gln
              325              330              335
Ala Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala Ala Ala Glu Ser Glu Arg Phe Ile
              340              345              350
Arg Gln Gly Thr Gly Asn Asp Glu Ala Gly Ala Ala Asn Ala Asp Val
              355              360              365
Val Ser Leu Thr Cys Glu Leu Phe Val Pro Pro Gly Gly Gly Thr Asn
              370              375              380
Lys Ile Ser Ile Pro Phe Glu Tyr Tyr Arg Ile Arg Lys Val Lys Val
385              390              395              400
Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly
              405              410              415
Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala
              420              425              430
Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr Ser Ser Arg His Thr Ile Pro
              435              440              445
Gln Pro Phe Ser Tyr Lys Leu Leu Lys Lys Asp Glu Leu Arg Asp Glu
              450              455              460
Leu Lys Asp Glu Leu Leu Glu
465              470

```

<210> 42
 <211> 28
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Прямий праймер для ORF2-F2 з PCV2 2b

<400> 42
 cgagctctttt cttccccag gagggggc

28

<210> 43
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> Зворотний праймер для ORF2-F2 з PCV2 2b

<400> 43

cccaagcttg taggagaagg gctgggttat

30

<210> 44

<211> 1413

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Об'єднана ДНК-послідовність PE, ORF2-F2 з PCV2 2b і KDEL

<400> 44

```

ggatccgaag aagcgttcga cctctggaac gaatgcgcca aagcctgcgt gctcgacctc 60
aaggacggcg tgcgttccag ccgcatgagc gtcgaccgg ccacgcccga caccaacggc 120
cagggcgctgc tgcactactc catggctcctg gagggcgcca acgacgcgct caagctggcc 180
atcgacaacg ccctcagcat caccagcgac ggccctgacca tccgcctcga aggcggcgctc 240
gagccgaaca agccggtgcg ctacagctac acgcgccagg cgcgcggcag ttggtcgctg 300
aactggctgg taccgatcgg ccacgagaag ccctcgaaca tcaagggtgtt catccacgaa 360
ctgaacgccg gcaaccagct cagccacatg tcgccgatct acaccaccga gatgggcgac 420
gagttgctag cgaagctggc gcgcgatgcc accttcttcg tcagggcgca cgagagcaac 480
gagatgcagc cgacgctcgc catcagccat gccggggcca gcgtggtcat ggcccagacc 540
cagccgcgcc gggaaaagcg ctggagcgaa tggggcagcg gcaagggtgtt gtgctgctc 600
gacccgctgg acggggtcta caactacctc gccagcaac gctgcaacct cgacgatacc 660
tggaagcgca agatctaccg ggtgctcgcc ggcaaccggc cgaagcatga cctggacatc 720
aaacccacgg tcatcagta tcgctcgac ttcccgagg gcgcgagcct ggccgcgctg 780
accgcgcacc aggcttgcca cctgccgctg gagactttca cccgtcatcg ccagccgcgc 840
ggctgggaac aactggagca gtgcggctat ccggtgcagc ggctggtcgc cctctacctg 900
gcggcgcgcc tgcgttgaa ccaggtcgac caggtgatcc gcaacgccct ggccagcccc 960
ggcagcgcgcg gcgacctagg cgaagcgatc cgcgagcagc cggagcaggc ccgtctggcc 1020
ctgacctgg ccgcgcgcga gagcgagcgc ttcatccggc agggcaccgg caacgacgag 1080
gccggcgcgcg ccaacgcgca cgtggtgagc ctgacctgag agctctttct tccccagga 1140
gggggctcaa acccccgctc tgtgcccttt gaataactaca gaataagaaa ggttaagggt 1200
gaattctggc cctgctcccc gatcacccag ggtgacaggg gagggggctc cagtgtgttt 1260
attctagatg ataactttgt aacaaaaggcc acagccctca cctatgacct ctatgtaaac 1320
tactcctccc gccataccat aaccagccc ttctcctaca agcttctcaa aaaagacgaa 1380
ctgagagatg aactgaaaga cgaactgctc gag 1413

```

<210> 45

<211> 471

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Об'єднана амінокислотна послідовність PE, ORF2-F2 з PCV2 2b і KDEL

<400> 45

```

Gly Ser Glu Glu Ala Phe Asp Leu Trp Asn Glu Cys Ala Lys Ala Cys
1          5          10          15
Val Leu Asp Leu Lys Asp Gly Val Arg Ser Ser Arg Met Ser Val Asp
20          25          30
Pro Ala Ile Ala Asp Thr Asn Gly Gln Gly Val Leu His Tyr Ser Met
35          40          45
Val Leu Glu Gly Gly Asn Asp Ala Leu Lys Leu Ala Ile Asp Asn Ala
50          55          60
Leu Ser Ile Thr Ser Asp Gly Leu Thr Ile Arg Leu Glu Gly Gly Val

```

```

65          70          75          80
Glu Pro Asn Lys Pro Val Arg Tyr Ser Tyr Thr Arg Gln Ala Arg Gly
      85          90          95
Ser Trp Ser Leu Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly His Glu Lys Pro Ser
      100          105          110
Asn Ile Lys Val Phe Ile His Glu Leu Asn Ala Gly Asn Gln Leu Ser
      115          120          125
His Met Ser Pro Ile Tyr Thr Thr Glu Met Gly Asp Glu Leu Leu Ala
      130          135          140
Lys Leu Ala Arg Asp Ala Thr Phe Phe Val Arg Ala His Glu Ser Asn
      145          150          155
Glu Met Gln Pro Thr Leu Ala Ile Ser His Ala Gly Val Ser Val Val
      165          170          175
Met Ala Gln Thr Gln Pro Arg Arg Glu Lys Arg Trp Ser Glu Trp Ala
      180          185          190
Ser Gly Lys Val Leu Cys Leu Leu Asp Pro Leu Asp Gly Val Tyr Asn
      195          200          205
Tyr Leu Ala Gln Gln Arg Cys Asn Leu Asp Asp Thr Trp Glu Gly Lys
      210          215          220
Ile Tyr Arg Val Leu Ala Gly Asn Pro Ala Lys His Asp Leu Asp Ile
      225          230          235
Lys Pro Thr Val Ile Ser His Arg Leu His Phe Pro Glu Gly Gly Ser
      245          250          255
Leu Ala Ala Leu Thr Ala His Gln Ala Cys His Leu Pro Leu Glu Thr
      260          265          270
Phe Thr Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Glu Gln Cys
      275          280          285
Gly Tyr Pro Val Gln Arg Leu Val Ala Leu Tyr Leu Ala Ala Arg Leu
      290          295          300
Ser Trp Asn Gln Val Asp Gln Val Ile Arg Asn Ala Leu Ala Ser Pro
      305          310          315
Gly Ser Gly Gly Asp Leu Gly Glu Ala Ile Arg Glu Gln Pro Glu Gln
      325          330          335
Ala Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala Ala Ala Glu Ser Glu Arg Phe Ile
      340          345          350
Arg Gln Gly Thr Gly Asn Asp Glu Ala Gly Ala Ala Asn Ala Asp Val
      355          360          365
Val Ser Leu Thr Cys Glu Leu Phe Leu Pro Pro Gly Gly Gly Ser Asn
      370          375          380
Pro Arg Ser Val Pro Phe Glu Tyr Tyr Arg Ile Arg Lys Val Lys Val
      385          390          395
Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly
      405          410          415
Ser Ser Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala
      420          425          430
Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr Ser Ser Arg His Thr Ile Thr
      435          440          445
Gln Pro Phe Ser Tyr Lys Leu Leu Lys Lys Asp Glu Leu Arg Asp Glu
      450          455          460
Leu Lys Asp Glu Leu Leu Glu
465          470

```

<210> 46

<211> 28

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Прямий праймер для ORF2-F2 з PCV2 2d

<400> 46
cgagctcttt cttccccag gagggggc 28

<210> 47
<211> 30
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зворотний праймер для ORF2-F2 з PCV2 2d

<400> 47
cccaagcttg taggagaagg gctgggttat 30

<210> 48
<211> 1413
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Об'єднана ДНК-послідовність PE, ORF2-F2 з PCV2 2d і KDEI

<400> 48
ggatccgaag aagcggttcga cctctggaac gaatgcgcca aagcctgcgt gctcgacctc 60
aaggacggcg tgcgttccag ccgcatgagc gtcgaccgg ccacgcccga caccaacggc 120
cagggcggtgc tgcaactact catggctctg gagggcgga acgacgcgt caagctggcc 180
atcgacaacg cctcagcat caccagcgac ggcctgacca tccgcctcga aggcggcgtc 240
gagccgaaca agccgggtgcg ctacagctac acgcgccagg cgcgcgccag ttggtcgctg 300
aactggctgg taccgatcgg ccacgagaag ccctcgaaca tcaaggtgtt catccacgaa 360
ctgaacggcg gcaaccagct cagccacatg tcgcccgatct acaccaccga gatgggcgac 420
gagttgctag cgaagctggc gcgcgatgcc accttcttcg tcagggcgca cgagagcaac 480
gagatgcagc cgacgctcgc catcagccat gccgggggtca gctgggtcat ggcccagacc 540
cagccgcgccc gggaaaagcg ctggagcgaa tggggcagcg gcaaggtgtt gtgcctgctc 600
gacccgctcg acgggggtcta caactacctc gccagcaac gctgcaacct cgacgatacc 660
tggaagggca agatctaccg ggtgctcgcc ggcaaccgg cgaagcatga cctggacatc 720
aaaccacgg tcatcagtea tcgcctgcac ttcccgagg gcggcagcct ggccgcgctg 780
accgcgcacc aggcttgcca cctgcgctg gagactttca cccgtcatcg ccagccgccc 840
ggctgggaac aactggagca gtgcggctat ccggtgcagc ggctggctgc cctctacctg 900
gcggcgcggc tgcgtggaa ccaggtcgac caggtgatcc gcaacgcct ggccagcccc 960
ggcagcgggc gcgacctagg cgaagcgatc cgcgagcagc cggagcaggg ccgtctggcc 1020
ctgaccctgg ccgcccggga gagcgagcgc ttcattccggc agggcaccgg caacgacgag 1080
gccggcgcgg ccaacgcccga cgtggtgagc ctgacctgcg agctctttct tccccagga 1140
gggggctcaa gccccctcac tgtgcccttt gaatactaca gaataaggaa gggttaaggtt 1200
gaattctggc cctgctcccc aatcaccag ggtgacaggg gagtgagctc cactgctgtt 1260
attctagatg ataactttgt aacaaaggcc aatgccctaa cctatgacct ctatgtaaac 1320
tactctctcc gccataccat aaccagccc ttctcctaca agcttctcaa aaaagacgaa 1380
ctgagagatg aactgaaaga cgaactgctc gag 1413

<210> 49
<211> 471
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Об'єднана амінокислотна послідовність PE, ORF2-F2 з PCV2 2d і KDEI

<400> 49
Gly Ser Glu Glu Ala Phe Asp Leu Trp Asn Glu Cys Ala Lys Ala Cys

```

1           5           10           15
Val Leu Asp Leu Lys Asp Gly Val Arg Ser Ser Arg Met Ser Val Asp
20
Pro Ala Ile Ala Asp Thr Asn Gly Gln Gly Val Leu His Tyr Ser Met
35
Val Leu Glu Gly Gly Asn Asp Ala Leu Lys Leu Ala Ile Asp Asn Ala
50
Leu Ser Ile Thr Ser Asp Gly Leu Thr Ile Arg Leu Glu Gly Gly Val
65
Glu Pro Asn Lys Pro Val Arg Tyr Ser Tyr Thr Arg Gln Ala Arg Gly
85
Ser Trp Ser Leu Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly His Glu Lys Pro Ser
100
Asn Ile Lys Val Phe Ile His Glu Leu Asn Ala Gly Asn Gln Leu Ser
115
His Met Ser Pro Ile Tyr Thr Thr Glu Met Gly Asp Glu Leu Leu Ala
130
Lys Leu Ala Arg Asp Ala Thr Phe Phe Val Arg Ala His Glu Ser Asn
145
Glu Met Gln Pro Thr Leu Ala Ile Ser His Ala Gly Val Ser Val Val
165
Met Ala Gln Thr Gln Pro Arg Arg Glu Lys Arg Trp Ser Glu Trp Ala
180
Ser Gly Lys Val Leu Cys Leu Leu Asp Pro Leu Asp Gly Val Tyr Asn
195
Tyr Leu Ala Gln Gln Arg Cys Asn Leu Asp Asp Thr Trp Glu Gly Lys
210
Ile Tyr Arg Val Leu Ala Gly Asn Pro Ala Lys His Asp Leu Asp Ile
225
Lys Pro Thr Val Ile Ser His Arg Leu His Phe Pro Glu Gly Gly Ser
245
Leu Ala Ala Leu Thr Ala His Gln Ala Cys His Leu Pro Leu Glu Thr
260
Phe Thr Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Glu Gln Cys
275
Gly Tyr Pro Val Gln Arg Leu Val Ala Leu Tyr Leu Ala Ala Arg Leu
290
Ser Trp Asn Gln Val Asp Gln Val Ile Arg Asn Ala Leu Ala Ser Pro
305
Gly Ser Gly Gly Asp Leu Gly Glu Ala Ile Arg Glu Gln Pro Glu Gln
325
Ala Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala Ala Ala Glu Ser Glu Arg Phe Ile
340
Arg Gln Gly Thr Gly Asn Asp Glu Ala Gly Ala Ala Asn Ala Asp Val
355
Val Ser Leu Thr Cys Glu Leu Phe Leu Pro Pro Gly Gly Gly Ser Ser
370
Pro Leu Thr Val Pro Phe Glu Tyr Tyr Arg Ile Arg Lys Val Lys Val
385
Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr Gln Gly Asp Arg Gly Val Ser
405
Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn Phe Val Thr Lys Ala Asn Ala
420
Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr Ser Ser Arg His Thr Ile Thr
435
Gln Pro Phe Ser Tyr Lys Leu Leu Lys Lys Asp Glu Leu Arg Asp Glu
450
Leu Lys Asp Glu Leu Leu Glu
465
470

```

<210> 50
 <211> 705
 <212> ДНК
 <213> Цирковірус свиней

```

<400> 50
atgacgtatc caaggaggcg ttaccggaga agaagacacc gccccgcag ccatcttggc      60
catatcctcc gccgccgcc ctggctcgtc ccccccgcc accgctaccg ttggagaagg      120
aaaaatggaa tcttcaatgc ccgcctctcc cgctcctttg tttataccgt taatgcctca      180
caggtctcac caccctcttg ggcggtggac atgatgagat ttaatatata ccaatttctt      240
ccccaggag ggggctcaaa cccctcact gtgccctttg aatactacag aataagaaag      300
gttaaagtgg aattctttgc aagatcccc atcacccaag gtgacagggg agtgggctcc      360
actgctgtta ttctaaatga taactttgta acaaaggcca cagccctaac ctatgacccc      420
tatgtaaact actcctcccc ccataccata acccaaccct tctcctacca ctcccgtac      480
tttaccacca aacctgtcct tgattccact attgattact tccaacaaaa taacaaaaga      540
aatcagctgt ggatgagact acaaactact ggaaatgtag accatgtagg cctcggacac      600
gcctttcaaa acagtacaaa tgcccaggcc tacaatgtcc gtgtaacctat gtatgtacaa      660
ttcagagaat ttaatcttaa agacccccca cttaacccta agtga                          705

```

<210> 51
 <211> 234
 <212> БІЛОК
 <213> Цирковірус свиней

```

<400> 51
Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg
1      5      10      15
Ser His Leu Gly His Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro
20     25     30
Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Ala Arg
35     40     45
Leu Ser Arg Ser Phe Val Tyr Thr Val Asn Ala Ser Gln Val Ser Pro
50     55     60
Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asn Gln Phe Leu
65     70     75     80
Pro Pro Gly Gly Gly Ser Asn Pro Leu Thr Val Pro Phe Glu Tyr Tyr
85     90     95
Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Phe Ala Arg Ser Pro Ile Thr
100    105    110
Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Thr Ala Val Ile Leu Asn Asp Asn
115    120    125
Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr
130    135    140
Ser Ser Arg His Thr Ile Thr Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr
145    150    155    160
Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro
165    170    175
Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Met Arg Leu Gln Thr Thr Gly Asn
180    185    190
Val Asp His Val Gly Leu Gly His Ala Phe Gln Asn Ser Thr Asn Ala
195    200    205
Gln Ala Tyr Asn Val Arg Val Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe
210    215    220
Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Asn Pro Lys
225    230

```

<210> 52
 <211> 702
 <212> ДНК

<213> Цирковірус свиней

```

<400> 52
atgacgtatc caaggaggcg ttaccggaga agaagacacc gcccccgag ccattctggc 60
catactctcc gccgcgcgcc ctggctcgtc caccctcgcc accgttaccg ctggagaagg 120
aaaaatggca ttttcaacag ccgcctctcc cgcaccttcg gatatactgt caaggctacc 180
acagtcacaa cgccctctcg ggcggtggac atgctgagat tcaatattga cgactttctt 240
ccccgggag gggggacca caaaatctct atacccttg agtactacag aataagaaag 300
gttaagggtg aattctggcc ctgctcccca atcaccagg gtgacagggg agttggatcc 360
agtgtgttaa ttctagatga taacttttcc cctaagtcca cagccctaac ctatgacccc 420
tacgtaaact actcctccc ccataccata cccagccct tctctacca ctcccgtac 480
tttaccacca aacctgtcct tgattccacc attgattact tccaacaaaa taacaaaagg 540
aatcagctgt ggatgagaat tcaaacagc aaaaatgtag accacgtagg cctcggcact 600
gcgttcgaaa acagtaaata cgaccaggac tacaatatcc gtgtaaccat gtatgtacaa 660
ttcagagaat ttaatcttaa agacccccca cttaaacct aa 702

```

<210> 53

<211> 233

<212> БІЛІОК

<213> Цирковірус свиней

<400> 53

```

Met Thr Tyr Pro Arg Arg Tyr Arg Arg Arg His Arg Pro Arg
1          5          10          15
Ser His Leu Gly His Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro
          20          25          30
Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Ser 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 Leu Arg Phe Asn Ile Asp Asp Phe Leu
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 Ser Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn
          115          120          125
Phe Phe Pro Lys Ser Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr
          130          135          140
Ser Ser Arg His Thr Ile Pro Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr
145          150          155          160
Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro
          165          170          175
Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Met Arg Ile Gln Thr Ser Lys 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> 54

<211> 471

<212> ДНК

<213> Цирковірус свиней

<400> 54

```

ttttttcccc caggaggggg ctcaaaccct ctactgtgc cctttgaata ctacagaata 60
agaaagggtta aagtgggaatt ctttgcaaga tcccccatca cccaagggtga caggggagtg 120
ggctccactg ctgttattct aaatgataac tttgtaacaa aggccacagc cctaacctat 180
gacccctatg taaactactc ctcccgccat accataacc aacccttctc ctaccactcc 240
cgctacttta cccccaaacc tgtccttgat tccactattg attacttcca accaaataac 300
aaaagaaatc agctgtggat gagactacaa actactggaa atgtagacca tgtaggcctc 360
ggacacgcct ttcaaaacag tacaatatgc caggcctaca atgtccgtgt aacctgtat 420
gtacaattca gagaatttaa tcttaaagac cccccactta accctaagtg a 471

```

<210> 55
 <211> 156
 <212> БІЛОК
 <213> Цирковірус свиней

```

<400> 55
Phe Leu Pro Pro Gly Gly Gly Ser Asn Pro Leu Thr Val Pro Phe Glu
1 5 10 15
Tyr Tyr Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Phe Ala Arg Ser Pro
20 25 30
Ile Thr Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Thr Ala Val Ile Leu Asn
35 40 45
Asp Asn Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val
50 55 60
Asn Tyr Ser Ser Arg His Thr Ile Thr Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser
65 70 75 80
Arg Tyr Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Phe
85 90 95
Gln Pro Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Met Arg Leu Gln Thr Thr
100 105 110
Gly Asn Val Asp His Val Gly Leu Gly His Ala Phe Gln Asn Ser Thr
115 120 125
Asn Ala Gln Ala Tyr Asn Val Arg Val Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg
130 135 140
Glu Phe Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Asn Pro Lys
145 150 155

```

<210> 56
 <211> 468
 <212> ДНК
 <213> Цирковірус свиней

```

<400> 56
ttttttcccc cgggaggggg gaccaacaaa atctctatac cctttgagta ctacagaata 60
agaaagggtta aggttgaatt ctggccctgc tccccaatca cccagggtga caggggagtt 120
ggatccagtg ctgtaattct agatgataac tttttcccta agtccacagc cctaacctat 180
gacccctacg taaactactc ctcccgccat accatacccc agcccttctc ctaccactcc 240
cgctacttta cccccaaacc tgtccttgat tccaccattg attacttcca accaaataac 300
aaaaggaatc agctgtggat gagaattcaa accagtaaaa atgtagacca cgtaggcctc 360
ggcactgcgt tcgaaaacag taaatacgac caggactaca atatccgtgt aacctgtat 420
gtacaattca gagaatttaa tcttaaagac cccccactta aaccctaa 468

```

<210> 57
 <211> 155
 <212> БІЛОК
 <213> Цирковірус свиней

```

<400> 57
Phe Leu Pro Pro Gly Gly Gly Thr Asn Lys Ile Ser Ile Pro Phe Glu

```

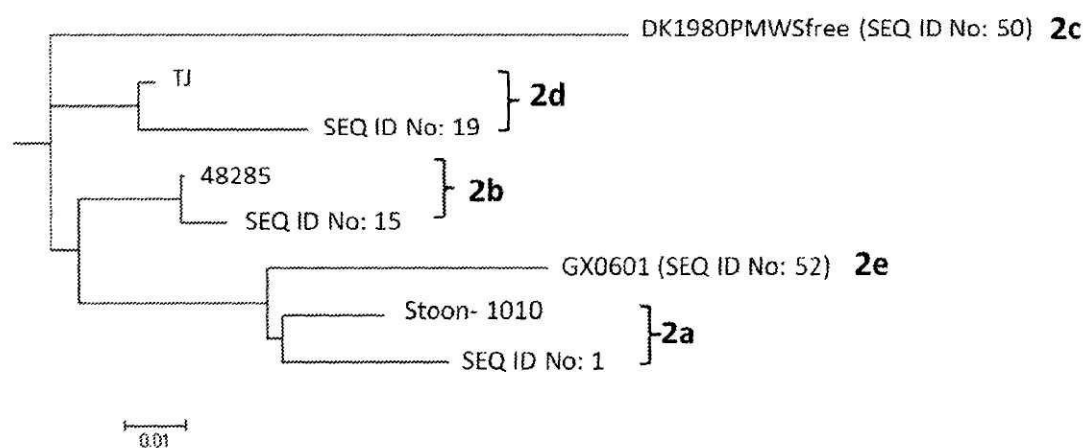
```

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

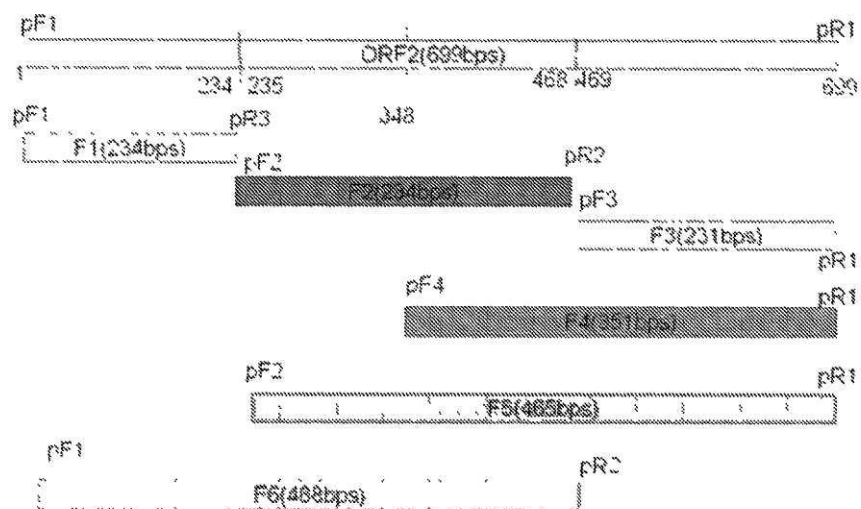
```

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

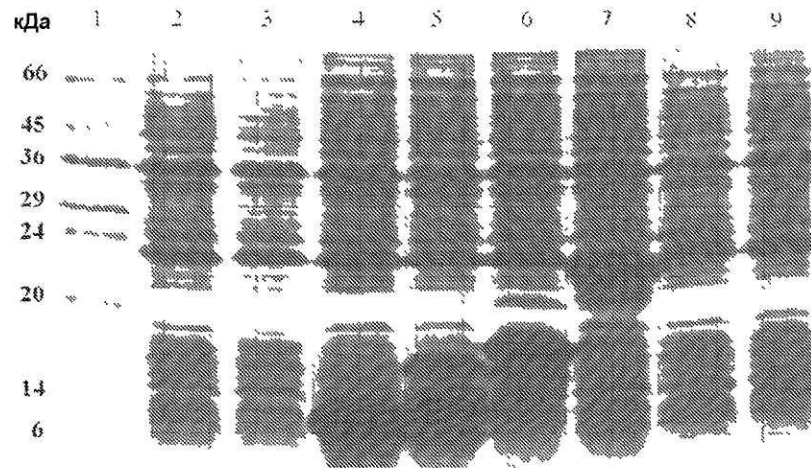
- 5 1. Імуногенна композиція проти цирковірусу свиней типу 2 (PCV2), яка містить антигенний пептид, вибраний щонайменше з одного з:
 - (a) пептиду відкритої рамки зчитування 2 (ORF2) з PCV2, вибраного з групи, що складається з SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 55 і SEQ ID NO: 57; та
 - 10 (b) рекомбінантного химерного білка, що включає від аміно-кінця до карбоксильного кінця рекомбінантного химерного білка:
 - пептид PE, що характеризується послідовністю SEQ ID NO: 35;
 - пептид з ORF2 з PCV2 з (a) та
 - сигнальний пептид KDEL, що характеризується послідовністю SEQ ID NO: 31.
- 15 2. Імуногенна композиція за п. 1, що додатково містить відкриті рамки зчитування (ORF), відмінні від ORF2 з PCV2, де ORF, відмінні від ORF2, включають ORF1 та ORF3.
3. Імуногенна композиція за п. 1, що додатково містить щонайменше один патогенний антиген, вибраний з групи, що включає антиген вірусу свинячого грипу (SIV), антиген вірусу репродуктивного та респіраторного синдрому свиней (PRRSV), антиген мікоплазми, антиген парвовірусу свиней (PPV), антиген бешихи свиней і антиген вірусу псевдоскажу.
- 20 4. Імуногенна композиція за п. 1, що додатково містить одне або декілька, вибраних з групи, що включає наповнювачі, розчинник, емульгатор, суспендуючі засоби, засіб для розкладання, зв'язувальні засоби, середовище для ліків, стабілізуючі засоби, хелатоутворюючі засоби, розріджувач, загусники, консерванти, засіб, що обумовлює плинність, поверхнево-активну речовину, ад'ювант і біологічні носії.
- 25 5. Спосіб отримання фрагмента антигену PCV2, що включає розташування послідовності ДНК, що кодує пептид ORF2 з PCV2, в біологічній системі експресії, де пептид ORF2 з PCV2 вибраний з групи, що складається з SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 55 і SEQ ID NO: 57; і
- 30 експресію послідовності ДНК, що кодує пептид ORF2 з PCV2, з отриманням фрагмента антигену імуногенної композиції проти PCV2.
6. Спосіб за п. 5, де послідовність ДНК, що кодує пептид ORF2 з PCV2, вибрана з групи, що складається з SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 54 і SEQ ID NO: 56.



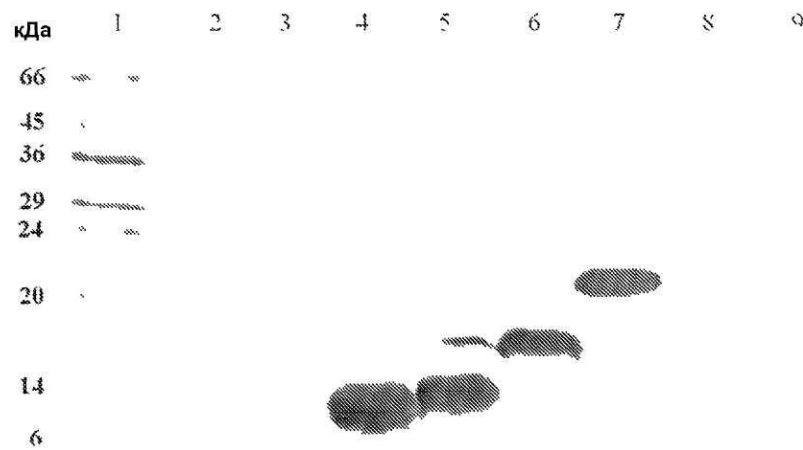
ΦΠ. 1



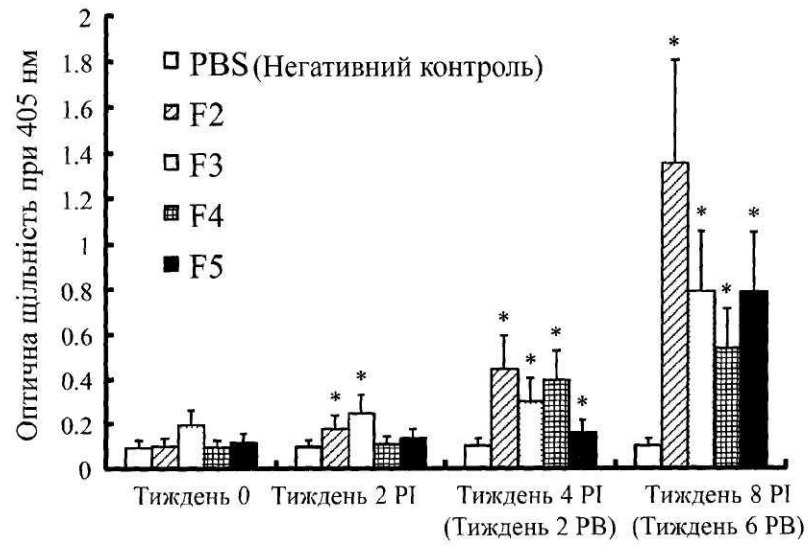
ΦΠ. 2



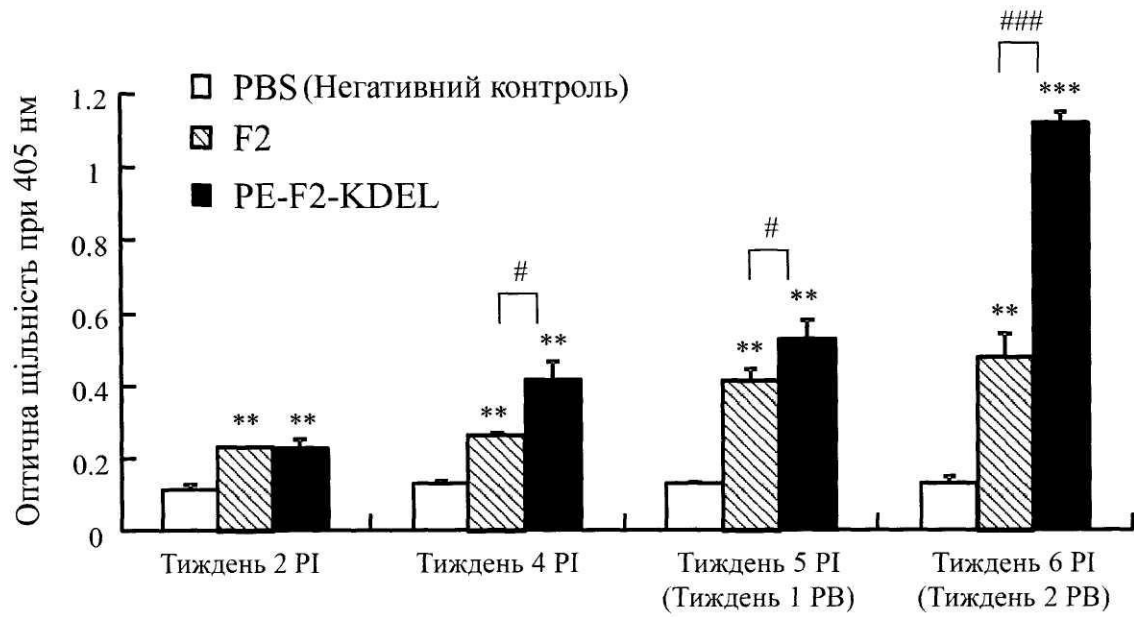
ФІГ. 3



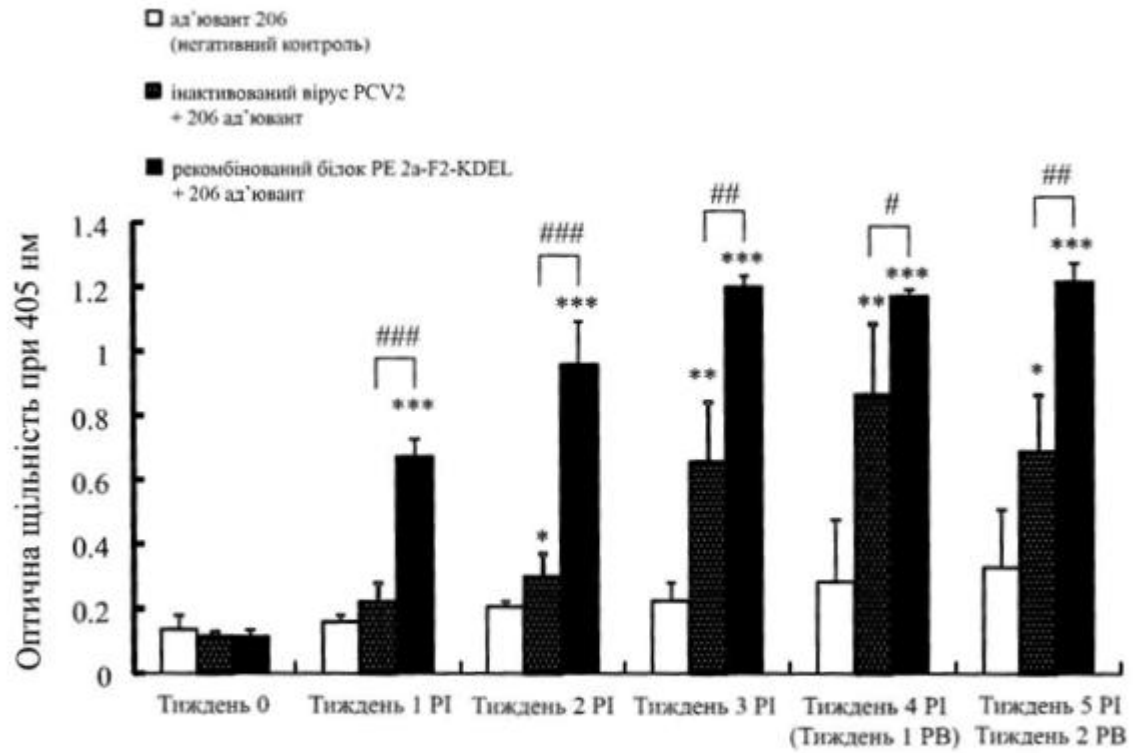
ФІГ. 4



ФІГ. 5



ФІГ. 6



ФІГ. 7

Комп'ютерна верстка М. Мацело

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601