

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201600305** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2016.09.30

(51) Int. Cl. **C07K 14/005** (2006.01)
C12N 7/04 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2014.10.02

(54) **ВАРИАНТ БЕЛКА OPC2 PCV2 И СОДЕРЖАЩИЕ ЕГО ВИРУСОПОДОБНЫЕ ЧАСТИЦЫ**

(31) 61/885,871

(32) 2013.10.02

(33) US

(86) PCT/US2014/058793

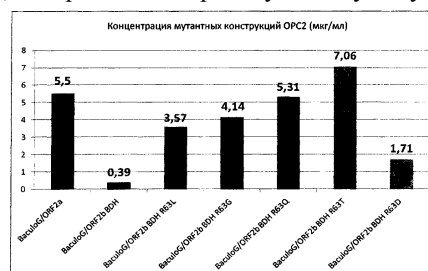
(87) WO 2015/051099 2015.04.09

(71) Заявитель:
**БЁРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ
ВЕТМЕДИКА, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Эрнандес Луис Алехандро,
Мюленталер Кристине Маргарет, Вон
Эрик Мартин, Хайуик Грегори (US)**

(74) Представитель:
**Веселицкая И.А., Кузенкова Н.В.,
Веселицкий М.Б., Каксис Р.А.,
Белоусов Ю.В., Куликов А.В.,
Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
Кузнецова Т.В. (RU)**

(57) В заявке описаны способы вакцинации для контроля заражения PCV2 с помощью различных подтипов PCV2. В частности, белки OPC2 PCV2 подтипа b (PCV2b) или иммуногенные композиции, содержащие белок OPC2 PCV2b применяют в способе лечения или предупреждения заражения с помощью PCV2 такого же PCV2b-подтипа и/или другого подтипа; в способе снижения, предупреждения или лечения клинических признаков, вызываемых инфекцией, с помощью PCV2 такого же PCV2b-подтипа и/или другого подтипа; и/или в способе предупреждения или лечения заболевания, вызываемого инфекцией, с помощью PCV2 такого же PCV2b-подтипа и/или другого подтипа. В настоящей заявке описаны также белки OPC2 PCV2 подтипа b (PCV2b), отличающиеся тем, что они содержат по меньшей мере одну мутацию в ВС-петле, в результате которой экспрессируемый белок предпочтительно экспрессируется в более высоком количестве по сравнению с белком OPC2 PCV2, который не содержит указанную мутацию.



A1

201600305

201600305

A1

5

10

15

Заявка № 201600305

Заявитель Бёрингер Ингельхайм

Ветмедика, Инк., US

ВАРИАНТ БЕЛКА ORC2 PCV2 И СОДЕРЖАЩИЕ ЕГО ВИРУСОПОДОБНЫЕ
ЧАСТИЦЫ

20

Перечень последовательностей

В настоящую заявку входит перечень последовательностей в соответствии с
37 C.F.R. 1.821-1.825. Перечень последовательностей прилагается к настоящей
заявке и тем самым полностью включен в нее в качестве ссылки.

25

Предпосылки создания изобретения

Цирковирус свиней типа 2 (PCV2) представляет собой небольшой
(диаметром 17-22 нм) ДНК-содержащий не имеющий оболочки вирус с
икосаэдральной структурой, который несет одноцепочечный кольцевой геном.
Последовательность PCV2 примерно на 80% идентична последовательности
цирковируса свиней типа 1 (PCV1). Однако в настоящее время установлено, что в
отличие от PCV1, который, как правило, является невирулентным, заражение
свиней PCV2 ассоциируется с синдромом, который обычно обозначают как

30

синдром мультисистемного послеотъемного истощения поросят (PMWS).

Клиническими проявлениями PMWS являются истощение, бледность кожи, худосочность, респираторный дистресс-синдромом, диарея, желтуха

новорожденных и желтуха. У некоторых пораженных заболеванием свиней

5 проявляется комбинация всех признаков, в то время как у других свиней проявляются только один или два из указанных клинических признаков. При вскрытии трупа выявляют также микроскопические и макроскопические

повреждения многих тканей и органов, причем наиболее часто повреждения

встречаются в лимфоидных органах. Обнаружена выраженная корреляция между

10 количеством нуклеиновой кислоты или антигена PCV2 и серьезностью микроскопических лимфоидных повреждений. Уровни смертности у свиней, пораженных PCV2, могут достигать 80%. Помимо PMWS с PCV2 связаны

несколько других инфекций, включая псевдобешенство, репродуктивно-респираторный синдром свиней (PRRS), болезнь Глассера, стрептококковый

15 менингит, сальмонеллез, коли-бактериоз отъемышей, связанный с кормом гепатоз и гнойную бронхопневмонию.

В настоящее время известны три подтипа PCV2 (PCV2a, PCV2b и PCV2c), классификация которых основана на унифицированной номенклатуре генотипов PCV2 (Segales J. и др., PCV-2 genotype definition and nomenclature, Vet Rec 162,

20 2008, сс. 867-868). Было предложено два дополнительных подтипа (PCV2d и PCV2e) (Wang и др., Virus Res. 145(1), 2009, сс. 151-156), однако позднее было продемонстрировано, что они принадлежат к кластерам PCV2a и PCV2b (Cortey и др., Vet Microbiol. 149(3-4), 2011, сс. 522-32011). Согласно указанной

унифицированной номенклатуре генотипов PCV2 ген orf2 (ген открытой рамки считывания 2) применяют для осуществления генотипирования pscv-2, при этом генотипирование основано пропорции нуклеотидных сайтов, в которых две

25 сравниваемые последовательности различаются (p-дистанция). Указанную величину получают делением количества нуклеотидных различий на общее количество сравниваемых нуклеотидов (Kumar и др., Bioinformatics 17, 2001, сс.

30 1244-1245) и затем построением гистограммы p-дистанция/частота, которая позволяет определять потенциальные отсекающие значения, с помощью которых можно отличать различные генотипы (Rogers и Harpending, Molecular Biology and Evolution 9, 1992, сс. 552-569; Biagini и др., Journal of General Virology 80,

1999, сс. 419-424). С помощью указанной методологии последовательности *orf2* *pcv-2* относят к различным генотипам, когда генетическая дистанция между ними составляет 0,035.

5 В US 2011/0305725 A1 описано исследование, предназначенное для оценки новой препаративной формы вакцины на свиньях, с целью определения ее эффективности в отношении цирковируса свиней и *M. hyopneumoniae*. При осуществлении указанного исследования было установлено, что у некоторых свиней в контрольной и вакцинированной группах проявлялись клинические признаки PMWS. Затем было подтверждено, что до контрольного заражения эти
10 свиньи имели контакт с присутствующим в окружающей среде PCV2. Молекулярный анализ образцов крови и ткани этих свиней подтвердил, что они несли штамм типа 2В, который отличался от штамма, применяемого для контрольного заражения (параграф [0152] US 2011/0305725 A1).

15 В WO 2011/116094 A2 описаны клон химерной инфекционной ДНК цирковируса свиней и живой ослабленный химерный вирус PCV2 подтипа PCV2b, и капсидный ген подтипа PCV2b, интегрированный в геном непатогенного вируса PCV1, при этом установлено, что ослабленный химерный вирус можно применять в качестве живой вакцины, а также инактивированной (убитой) вакцины.

20 В WO 2013/030320 A1 описаны синтетические капсидные белки цирковирусного типа и методы лечения и/или предупреждения ассоциированных с PCV2 заболеваний у млекопитающих с использованием указанных белков. Две последовательности обозначали согласно WO 2013/030320 A1, при этом одну последовательность дополнительно модифицировали, осуществляя среди
25 прочего следующие варианты оптимизации:

- элиминировали потенциальный сайт расщепления в аминокислотном положении 165,

-интродуцировали мутацию в положение 200,

- осуществляли замену в положении 161,

30 - осуществляли замену в положении 170,

- заменяли остаток S в положении 225 на D,

- осуществляли замену в положении 143,

- осуществляли две замены на N-конце последовательности (положения 13 и 20).

Однако, исходя из того, что, как оказалось на практике, экспрессия белка OPC2 PCV2b дикого типа является недостаточной и требуются дополнительные стадии концентрирования для получения вирусоподобных частиц (ВПЧ), которые можно применять для получения субъединичной вакцины, требуется легко осуществляемая модификация встречающихся в естественных условиях белковых последовательностей OPC2 PCV2b для повышения эффективности экспрессии и повышения производства ВПЧ, что позволяет быстро и легко получать эффективные субъединичные вакцины на основе PCV2.

Решение вышеуказанной технической проблемы достигается с помощью настоящего описания и вариантов осуществления изобретения, представленных в формуле изобретения.

Таким образом, различные объекты изобретения включены в формулу изобретения.

Краткое описание чертежей

На чертежах показано:

на фиг. 1 - основные аминокислотные различия между аминокислотными последовательностями OPC2 PCV2a и PCV2b;

на фиг. 2 - результаты оценки содержащих бакуловирус супернатантов в отношении OPC2 PCV2b. Полоса 1 соответствует вакцине циркофлекс (Circoflex®) WSV (OPC2 PCV2a), полоса 2 соответствует OPC2 PCV2b штамма BDH SFCO, полоса 4 соответствует OPC2 PCV2b штамма BDH R63T, полоса 5 соответствует OPC2 PCV2b штамма BDH R63K;

на фиг. 3 - результаты оценки полученных путем центрифугирования при 100000×g пеллетов в отношении OPC PCV2b. Полоса 1 соответствует OPC PCV2b штамма BDH, полоса 2 соответствует OPC2 PCV2b штамма BDH R63K, полоса 3 соответствует OPC2 PCV2b штамма BDH R63T, полоса 4 соответствует вакцине циркофлекс WSV (OPC2 PCV2a);

на фиг 4 - результаты разделения с использованием ДСН-ПААГ фракций в градиенте сахарозы. F1–F12 обозначают фракции 1-12;

на фиг. 5А и фиг. 5Б - подтверждение образования ВПЧ с помощью ЭМ (электронной микроскопии);

на фиг. 6 - результаты оценки мутантной конструкции OPC2 PCV2b. SFCO обозначает кодоны, оптимизированные для *Spodoptera frugiperda*. Нативные конструкции OPC2 штаммов PCV2b BDH и R63K не проверяли в отношении образования ВПЧ или не оценивали количественно, поскольку в это же время
5 была создана конструкция R63T;

на фиг. 7А и 7Б - результаты оценки мутантной конструкции OPC2 PCV2b. SFCO обозначает кодоны, оптимизированные для *Spodoptera frugiperda*. Количественная оценка ВПЧ в отношении мутантных конструкций OPC2 представлена в мкг/мл;

10 на фиг. 8 - сравнительная оценка первичной структуры OPC2 PCV2b дикого типа и мутантных аминокислотных последовательностей, где последовательности, обозначенные SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 2, представляют собой последовательности OPC2 PCV2b дикого типа, а последовательности, обозначенные SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9,
15 представляют собой мутантные последовательности, и SEQ ID NO: 3 соответствует последовательности белка OPC2 PCV2a дикого типа. В последовательностях, обозначенных SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9: «X» (в положениях 8, 53, 57, 68, 89, 90, 121, 134, 169, 190, 215 и 234) обозначает любой аминокислотный остаток, выбранный из группы,
20 состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y; «X» (в положении 63) обозначает любой аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, S, T, V, W и Y; и «x» (в положении 210) обозначает любой аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из D и E.

25 Подробное описание предпочтительных вариантов осуществления изобретения

В основу настоящего изобретения положен неожиданно установленный факт, что наличие единичной мутации в аминокислотной последовательности белка OPC2 PCV2 подтипа b (PCV2b) оказывается достаточным для резкого
30 повышения уровня производства ВПЧ, и это позволяет осуществлять быстрое получение эффективной субъединичной вакцины на основе PCV2.

При осуществлении исследований, на основе которых было создано настоящее изобретение, были идентифицированы положения, в которых

имеются основные аминокислотные различия в последовательностях OPC2 между PCV2a и PCV2b, в качестве потенциально пригодных для мутации положений.

В этом контексте идентифицированы шесть аминокислотных положений, типичных для белка OPC2 PCV2b, а именно:

- аминокислотное положение 59, в котором находится остаток аргинина или остаток лизина,

- аминокислотное положение 63, в котором находится остаток аргинина или остаток лизина,

- аминокислотное положение 88, в котором находится остаток пролина,

- аминокислотное положение 151, в котором находится остаток треонина,

- аминокислотное положение 206, в котором находится остаток изолейцина,

и

- аминокислотное положение 232, в котором находится остаток аспарагина.

Как указано в настоящем описании, нумерация аминокислотных положений соответствует нумерации аминокислотной последовательности полноразмерного белка OPC2 PCV2 дикого типа (SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 5). Таким образом, нумерация аминокислотных положений, указанная в настоящем описании, соответствует нумерации белковой последовательности OPC2 PCV2 дикого типа, состоящей из 234 или 233 аминокислотных остатков, включая остаток метионина (N-концевой) в аминокислотном положении 1.

Таким образом, в контексте настоящего описания фраза «где нумерация аминокислотных положений соответствует нумерации аминокислотной последовательности белка OPC2 PCV2 дикого типа» относится к последовательности встречающегося в естественных условиях белка OPC2 PCV2, например, представленной в SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 5.

Оценка роли мутаций шести аминокислотных положений, типичных для белка OPC2 PCV2b, неожиданно показала, что одна мутация в аминокислотной последовательности в положении, находящемся в ВС-петле белка OPC2 PCV2, а именно, замена остатка аргинина или остатка лизина в положении 63, оказалось достаточной для значительного повышения экспрессии белка OPC2 PCV2 по сравнению с белком OPC2 PCV2, который не содержал указанную мутацию.

Таким образом, одним из объектов изобретения является полипептид, выбранный из группы, состоящей из следующих белков, указанных в подпунктах (а), (б) и (в): (а) белок OPC2 PCV2, имеющий: в аминокислотном положении 59 остаток аргинина или остаток лизина и/или в аминокислотном положении 88 остаток пролина, и/или в аминокислотном положении 151 остаток треонина, и/или в аминокислотном положении 206 остаток изолейцина, и/или в аминокислотном положении 232 остаток аспарагина, и имеющий в аминокислотном положении 63 аминокислотный остаток, отличный от остатка аргинина или остатка лизина, где нумерация аминокислотных положений соответствует нумерации в аминокислотной последовательности белка OPC2 PCV2 дикого типа; (б) белок OPC2 PCV2, отличающийся тем, что он (I) содержит по меньшей мере одну мутацию в ВС-петле и (II) предпочтительно экспрессируется в существенно больших количествах по сравнению с белком OPC2 PCV2, который не содержит указанную мутацию; и (в) комбинация белков, указанных в подпунктах (а) и (б).

Предпочтительно указанный полипептид, который обозначают также как «полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении», ниже в настоящем описании представляет собой выделенный полипептид.

В частности, полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, представляет собой не встречающийся в естественных условиях полипептид.

Согласно первому объекту изобретения, указанному в подпункте (а), полипептид, предлагаемый в изобретении, представляет белок OPC2 PCV2, имеющий один, два, три, четыре или пять аминокислотных остатков (в скобках даны обозначения в однобуквенном коде), выбранных из группы, состоящей из остатка аргинина (R) или остатка лизина (K) в аминокислотном положении 59, остатка пролина (P) в аминокислотном положении 88, остатка треонина (T) в аминокислотном положении 151, остатка изолейцина (I) в аминокислотном положении 206 и остатка аспарагина (N) в аминокислотном положении 232, и имеющий в аминокислотном положении 63 аминокислотный остаток, отличный от остатка аргинина или остатка лизина.

В частности, аминокислотный остаток, отличный от остатка аргинина или остатка лизина, в положении 63 представляет собой встречающийся в

естественных условиях, предпочтительно генетически кодируемый аминокислотный остаток, отличный от остатка аргинина или остатка лизина.

Ниже используются также следующие сокращения:

5 «R59» является сокращенным обозначением «остатка аргинина в аминокислотном положении 59»,

«K59» является сокращенным обозначением «остатка лизина в аминокислотном положении 59»,

«P88» является сокращенным обозначением «остатка пролина в аминокислотном положении 88»,

10 «T151» является сокращенным обозначением «остатка треонина в аминокислотном положении 151»,

«I206» является сокращенным обозначением «остатка изолейцина в аминокислотном положении 206»,

15 «N232» является сокращенным обозначением «остатка аспарагина в аминокислотном положении 232».

Таким образом, предпочтительно полипептид, соответствующий объекту изобретения, указанному в подпункте (а), представляет собой белок OPC2 PCV2,

имеющий P88

или имеющий T151,

20 или имеющий I206,

или имеющий N232,

или имеющий R59 или K59,

или имеющий P88 и T151,

или имеющий P88 и I206,

25 или имеющий P88 и N232,

или имеющий P88 и R59 или K59,

или имеющий T151 и I206,

или имеющий T151 и N232,

или имеющий T151 и R59 или K59,

30 или имеющий I206 и N232,

или имеющий I206 и R59 или K59,

или имеющий N232 и R59 или K59,

или имеющий P88 и T151, и I206,

- или имеющий P88 и T151, и N232,
или имеющий P88 и T151 и R59 или K59,
или имеющий P88 и I206, и N232,
или имеющий P88 и I206, и R59 или K59,
5 или имеющий P88 и N232, и R59 или K59,
или имеющий T151 и I206, и N232,
или имеющий T151 и I206, и R59 или K59,
или имеющий T151 и N232, и R59 или K59,
или имеющий I206 и N232, и R59 или K59,
10 или имеющий P88 и T151, и I206, и N232,
или имеющий P88 и T151, и I206, и R59 или K59,
или имеющий P88 и T151, и N232, и R59 или K59,
или имеющий P88 и I206, и N232, и R59 или K59,
или имеющий T151 и I206, и N232, и R59 или K59,
15 или имеющий P88 и T151, и I206, и N232, и R59 или K59.

Таким образом, более предпочтительно полипептид, соответствующий объекту изобретения, указанному в подпункте (а), выбирают из группы, состоящей из

- белка OPC2 PCV2, имеющего P88,
20 белка OPC2 PCV2, имеющего T151,
белка OPC2 PCV2, имеющего I206,
белка OPC2 PCV2, имеющего N232,
белка OPC2 PCV2, имеющего R59,
белка OPC2 PCV2, имеющего K59,
25 белка OPC2 PCV2, имеющего P88 и T151,
белка OPC2 PCV2, имеющего P88 и I206,
белка OPC2 PCV2, имеющего P88 и N232,
белка OPC2 PCV2, имеющего P88 и R59,
белка OPC2 PCV2, имеющего P88 и K59,
30 белка OPC2 PCV2, имеющего T151 и I206,
белка OPC2 PCV2, имеющего T151 и N232,
белка OPC2 PCV2, имеющего T151 и R59,
белка OPC2 PCV2, имеющего T151 и K59,

- белка OPC2 PCV2, имеющего I206 и N232,
белка OPC2 PCV2, имеющего I206 и R59,
белка OPC2 PCV2, имеющего I206 и K59,
белка OPC2 PCV2, имеющего N232 и R59,
5 белка OPC2 PCV2, имеющего N232 и K59,
белка OPC2 PCV2, имеющего P88 и T151, и I206,
белка OPC2 PCV2, имеющего P88, и T151, и N232,
белка OPC2 PCV2, имеющего P88 и T151, и R59,
белка OPC2 PCV2, имеющего P88 и T151, и K59,
10 белка OPC2 PCV2, имеющего P88 и I206, и N232,
белка OPC2 PCV2, имеющего P88 и I206, и R59,
белка OPC2 PCV2, имеющего P88 и I206, и K59,
белка OPC2 PCV2, имеющего P88 и N232, и R59,
белка OPC2 PCV2, имеющего P88 и N232, и K59,
15 белка OPC2 PCV2, имеющего T151 и I206, и N232,
белка OPC2 PCV2, имеющего T151 и I206, и R59,
белка OPC2 PCV2, имеющего T151 и I206, и K59,
белка OPC2 PCV2, имеющего T151 и N232, и R59,
белка OPC2 PCV2, имеющего T151 и N232, и K59,
20 белка OPC2 PCV2, имеющего I206 и N232, и R59,
белка OPC2 PCV2, имеющего I206 и N232, и K59,
белка OPC2 PCV2, имеющего P88 и T151, и I206, и N232,
белка OPC2 PCV2, имеющего P88 и T151, и I206, и R59,
белка OPC2 PCV2, имеющего P88 и T151, и I206, и K59,
25 белка OPC2 PCV2, имеющего P88 и T151, и N232, и R59,
белка OPC2 PCV2, имеющего P88 и T151, и N232, и K59,
белка OPC2 PCV2, имеющего P88 и I206, и N232, и R59,
белка OPC2 PCV2, имеющего P88 и I206, и N232, и K59,
белка OPC2 PCV2, имеющего T151 и I206, и N232, и R59,
30 белка OPC2 PCV2, имеющего T151 и I206, и N232, и K59,
белка OPC2 PCV2, имеющего P88 и T151, и I206, и N232 и R59 и
белка OPC2 PCV2, имеющего P88 и T151, и I206, и N232, и K59.

Согласно второму объекту изобретения, указанному в подпункте (б), полипептид, предлагаемый в изобретении, представляет, прежде всего, белок OPC2 PCV2, отличающийся тем, что он (I) содержит по меньшей мере одну мутацию в ВС-петле и (II) экспрессируется, в частности, в бакуловирусной экспрессионной системе, в существенно более высоких количествах, предпочтительно по меньшей мере в 2 раза более высоких количествах, более предпочтительно по меньшей мере в 3 раза более высоких количествах, еще более предпочтительно по меньшей мере в 5 раз более высоких количествах, еще более предпочтительно по меньшей мере в 8 раз более высоких количествах, по сравнению с белком OPC2 PCV2, который не содержит указанную мутацию, где белок OPC2 PCV2, который не содержит указанную мутацию, предпочтительно имеет аминокислотную последовательность, идентичную последовательности полипептида, предлагаемого в изобретении, за исключением по меньшей мере одной мутации в ВС-петле.

В этом контексте должно быть очевидно, что аминокислотные последовательности обоих белков OPC2 PCV2, экспрессию которых сравнивают, согласно этому объекту изобретения, являются идентичными за исключением указанной по меньшей мере одной мутации в ВС-петле.

Понятие «ВС-петля» в контексте изобретения относится конкретно к части аминокислотной последовательности OPC2 PCV2, локализованной между первыми двумя N-концевыми аминокислотными сегментами, уложенными в β -складчатые вторичные структуры, которые обнаружены в кристаллической структуре белка OPC2 PCV2, описанной в публикации Khayat и др., J Virol 85, 2011, сс. 7856-7862, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки.

В частности, у Khayat с соавторами описаны петли, соединяющие β -цепи ВС, DE, FG и HI, имеющие в длину от 4 до 9 аминокислотных остатков, и петли ВС и HI, в виде образующих выпуклости типа выступов, простирающихся от поверхности капсида PCV и декорирующих оси симметрии 5-порядка.

Для решения вопроса о том, экспрессируется ли белок OPC2 PCV2, содержащий по меньшей мере одну мутацию в ВС-петле, в большем количестве по сравнению с белком OPC2 PCV2, который не содержит указанную мутацию, предпочтительно применяют метод, описанный ниже в примере 1.

Так, согласно одному из примеров для решения вопроса о том, экспрессируется ли белок OPC2 PCV2, содержащий по меньшей мере одну мутацию в ВС-петле в большем количестве по сравнению с белком OPC2 PCV2, который не содержит указанную мутацию, применяют бакуловирусную систему экспрессии в методе, который содержит стадии, на которых: инфицируют Sf⁺-клетки бакуловирусом при заданном значении MOI, составляющим 0,1, позволяют инфекции развиваться в течение 5–7 дней, собирают продукт путем центрифугирования при 20000g в течение 20 мин для удаления клеточного дебриса и нерастворимого белка, фильтруют собранный супернатант через фильтр с размером пор 0,2 мкм и оценивают непосредственно уровень экспрессии OPC2 PCV2 с помощью вестерн-блоттинга, используя антитела к α-PCV2.

Предпочтительно указанный метод заключается также в том, что получают бакуловирус, применяемый на стадии заражения Sf⁺-клеток при заданном значении MOI, составляющим 0,1, и в частности дополнительно включает одну или несколько следующих стадий, на которых: клонируют кодирующую последовательность, которая кодирует белок OPC2 PCV2, содержащий по меньшей мере одну мутацию в ВС-петле, в бакуловирусном векторе-переносчике, клонируют кодирующую последовательность, которая кодирует белок OPC2 PCV2, не содержащий указанную мутацию в бакуловирусном векторе-переносчике, и совместно трансфецируют Sf9-клетки указанным бакуловирусным вектором-переносчиком, включающим кодирующую последовательность, которая кодирует белок OPC2 PCV2, содержащий по меньшей мере одну мутацию в ВС-петле, и бакуловирусной ДНК, совместно трансфецируют Sf9-клетки указанным бакуловирусным вектором-переносчиком, который включает кодирующую последовательность, которая кодирует белок OPC2 PCV2, не содержащий указанную мутацию, и бакуловирусной ДНК.

Более предпочтительно указанный метод содержит также дополнительно одну или несколько следующих стадий, на которых: проверяют полученный рекомбинантный бакуловирус в отношении экспрессии белка OPC2 PCV2 с помощью IFA (метод непрямой иммунофлуоресценции), получают амплифицированный штамм каждого рекомбинантного бакуловируса на Sf⁺-

клетках, титруют указанный амплифицированный штамм, применяя метод определения титра бакуловируса на основе величины TCID₅₀.

В частности, полипептид, предлагаемый в изобретении, который представляет собой белок OPC2 PCV2, содержащий по меньшей мере одну мутацию в ВС-петле, экспрессируется в большем количестве по сравнению с белком OPC2 PCV2, который не содержит указанную мутацию, в одинаковых и/или сопоставимых условиях окружающей среды, предпочтительно в бакуловирусной системе экспрессии.

Более конкретно, указанный белок OPC2 PCV2, который не содержит указанную мутацию, представляет собой белок OPC2 PCV2 дикого типа.

Предпочтительно по меньшей мере одна мутация в ВС-петле, предлагаемая в изобретении, представляет собой по меньшей мере одну мутацию в области, простирающейся от аминокислотного положения 58 до 66, и, в частности, содержит или состоит из делеции, замены и/или добавления от 1 до 7 аминокислотных остатков в область, простирающуюся от аминокислотного положения 60 до 66.

Более предпочтительно по меньшей мере одна мутация в ВС-петле представляет собой делецию, замену и/или добавление одного аминокислотного остатка в аминокислотное положение 63, при этом наиболее предпочтительной является замена аминокислотного остатка в аминокислотном положении 63 на аминокислотный остаток, отличный от остатка аргинина или остатка лизина.

Еще более предпочтительно замена аминокислотного остатка в аминокислотном положении 63 на аминокислотный остаток, отличный от остатка аргинина или лизина, представляет собой замену на встречающийся в естественных условиях, предпочтительно генетически кодируемый, аминокислотный остаток, отличный от остатка аргинина или остатка лизина.

Предпочтительно последовательности ВС-петли, предлагаемые в изобретении, которые включают замену аминокислотного остатка в положении 63 на аминокислотный остаток, отличный от остатка аргинина или остатка лизина, представлены в SEQ ID NO: 10-45.

Так, в частности, по меньшей мере одна мутация в ВС-петле, предлагаемая в изобретении, содержит или представляет собой замену остатка аргинина или

остатка лизина в аминокислотном положении 63 на аминокислотный остаток, отличный от остатка аргинина или остатка лизина.

Таким образом, белок OPC2 PCV2, который не содержит такую мутацию, которая указана в настоящем описании, предпочтительно имеет остаток аргинина или остаток лизина в аминокислотном положении 63, который затем заменяют согласно указанному предпочтительному варианту осуществления изобретения, получая тем самым полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении.

Более предпочтительно полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10-45, где указанная последовательность локализована конкретно в аминокислотных положениях 58-66 последовательности полипептида, предлагаемого в настоящем изобретении.

Согласно третьему объекту изобретения, указанном в подпункте (в), полипептид, предлагаемый в изобретении, представляет собой любую комбинацию белка OPC2 PCV2, представленного в объекте изобретения, указанном в подпункте (а), и в объекте изобретения, указанном в подпункте (б), которые представлены в настоящем описании, и таким образом, представляет собой любой белок OPC2 PCV2, который имеет:

- в аминокислотном положении 59 остаток аргинина или остаток лизина, и/или

- в аминокислотном положении 88 остаток пролина, и/или

- в аминокислотном положении 151 остаток треонина, и/или

- в аминокислотном положении 206 остаток изолейцина, и/или

- в аминокислотном положении 232 остаток аспарагина,

и который имеет в аминокислотном положении 63 аминокислотный остаток, отличный от остатка аргинина или остатка лизина, где нумерация аминокислотных положений соответствует нумерации в аминокислотной последовательности белка OPC2 PCV2 дикого типа; и который отличается тем, что он (I) содержит по меньшей мере одну мутацию в ВС-петле и (II) предпочтительно экспрессируется в существенно больших количествах по сравнению с белком OPC2 PCV2, который не содержит указанную мутацию.

Понятие «генетически кодируемый аминокислотный остаток, отличный от остатка аргинина или остатка лизина» в контексте настоящего изобретения относится, прежде всего, к аминокислотному остатку (в скобках даны обозначения в однобуквенном коде), выбранному из группы, состоящей из

5 остатка аланина (А), остатка аспартата (D), остатка аспарагина (N), остатка цистеина (C), остатка глутамина (Q), остатка глутамата (E), остатка фенилаланина (F), остатка глицина (G), остатка гистидина (H), остатка изолейцина (I), остатка лейцина (L), остатка метионина (M), остатка пролина (P), остатка серина (S), остатка треонина (T), остатка валина (V), остатка триптофана

10 (W) и остатка тирозина (Y).

Более конкретно, указанный аминокислотный остаток, отличный от остатка аргинина или остатка лизина, выбирают из группы, состоящей из аминокислотного остатка с полярной, но незаряженной боковой цепью, аминокислотного остатка с гидрофобной боковой цепью и остатка глицина, при

15 этом предпочтительно аминокислотный остаток с полярной, но незаряженной боковой цепью выбирают из группы, состоящей из остатка серина, остатка треонина, остатка тирозина, остатка аспарагина и остатка глутамина, и/или указанный аминокислотный остаток с гидрофобной боковой цепью предпочтительно выбирают из группы, состоящей из остатка аланина, остатка

20 валина, остатка лейцина, остатка изолейцина, остатка фенилаланина и остатка триптофана.

Наиболее предпочтительно аминокислотный остаток, отличный от остатка аргинина или остатка лизина, упомянутый в контексте настоящего изобретения, выбирают из группы, состоящей из остатка серина и остатка треонина.

25 В другом предпочтительном объекте изобретения полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, представляет собой рекомбинантный белок ORC2 PCV2, такой как экспрессируемый рекомбинантным бакуловирусом белок ORC2 PCV2.

Понятие «рекомбинантный белок ORC2 PCV2» в контексте настоящего

30 описания относится, в частности, к белковой молекуле, которая экспрессируется с рекомбинантной молекулы ДНК, такой как полипептид, полученный с помощью технологии рекомбинантной ДНК. Пример указанных технологий включает вариант, когда ДНК, кодирующую экспрессируемый белок,

встраивают в приемлемый экспрессионный вектор, предпочтительно бакуловирусный экспрессионный вектор, который в свою очередь применяют для трансфекции или, как в случае бакуловирусного экспрессионного вектора, для заражения клетки-хозяина с целью получения белка или полипептида, кодируемого ДНК. Таким образом, в контексте настоящего описания понятие «рекомбинантный белок OPC2 PCV2», прежде всего, относится к белковой молекуле, которая экспрессируется с рекомбинантной молекулы ДНК.

Согласно конкретному примеру рекомбинантный белок OPC2 PCV2 получают методом, включающим следующие стадии, на которых: ген OPC2 PCV2 клонируют в бакуловирусном векторе-переносчике; вектор-переносчик применяют для получения рекомбинантного бакуловируса, содержащего указанный ген, путем гомологичной рекомбинации в клетках насекомых; и затем экспрессируют белок OPC2 PCV2 в клетках насекомых при заражении рекомбинантным бакуловирусом.

Согласно альтернативному примеру рекомбинантный белок OPC2 PCV2 экспрессируют в клетках насекомых с рекомбинантной экспрессионной плазмиды. В указанном альтернативном примере не требуется бакуловирус.

Следует понимать также что понятие «рекомбинантный белок PCV2, состоящий из последовательности» относится также, в частности, к котрансляционной(ым) и/или посттрансляционной(ым) модификации или модификациям последовательности, которая(ые) обусловлена(ы) клеткой, в которой полипептид экспрессируется. Так, в контексте настоящего описания понятие «рекомбинантный белок OPC2 PCV2, состоящий из последовательности» относится также к последовательности, имеющей одну или несколько модификаций, обусловленных клеткой, в которой экспрессируется полипептид, прежде всего модификациям аминокислотных остатков, обусловленным биосинтезом белка и/или процессингом белка, предпочтительно выбранным из группы, состоящей из процессов гликозилирования, фосфорилирования и ацетилирования.

Предпочтительно рекомбинантный белок OPC2 PCV2, предлагаемый в изобретении, получают или его можно получать с помощью бакуловирусной системы экспрессии, прежде всего в культивируемых клетках насекомых.

В другом предпочтительном объекте изобретения полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, представляет собой белок OPC2 PCV2 подтипа b (PCV2b).

В следующем предпочтительном объекте изобретения полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, представляет собой белок OPC2 PCV2, содержащий аминокислотную последовательность, последовательность которой по меньшей мере на 90%, предпочтительно по меньшей мере на 92%, более предпочтительно по меньшей мере на 94%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 96%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 98% или, в частности, на 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, или состоит из указанной последовательности.

Наиболее предпочтительно полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, выбирают из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 6-9, которые представлены также на фиг. 8. Таким образом, полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, предпочтительно выбирают из следующих последовательностей (I)-(IV):

(I)

MTYPRRRXRRRRHRPRSHLGQILRRRPWLVHPRHRYRWRRKNGIFNTRLSRTX
GYTXKRTTVXTPSWXVDMMRFNINDFLPPGGGSPXXVPFEYYRIRKVKVEFW
PCSPITQGDRGVGSXAVILDDNFVTKAXALTYDPYVNYSSRHTITQPFSYHSRYF
TPKPVLDXTIDYFQPNKRNQLWLRLQTXGNVDHVGLGTAFENSIYDQxYNIRX
TMYVQFREFNLKDPPLNP (SEQ ID NO: 6),

(II)

MTYPRRRXRRRRHRPRSHLGQILRRRPWLVHPRHRYRWRRKNGIFNTRLSRTX
GYTXKKTTTVXTPSWXVDMMRFNINDFLPPGGGSPXXVPFEYYRIRKVKVEFW
PCSPITQGDRGVGSXAVILDDNFVTKAXALTYDPYVNYSSRHTITQPFSYHSRYF
TPKPVLDXTIDYFQPNKRNQLWLRLQTXGNVDHVGLGTAFENSIYDQxYNIRX
TMYVQFREFNLKDPPLNP (SEQ ID NO: 7),

(III)

MTYPRRRXRRRRHRPRSHLGQILRRRPWLVHPRHRYRWRRKNGIFNTRLSRTX
GYTXKRTTVXTPSWXVDMMRFNINDFLPPGGGSPXXVPFEYYRIRKVKVEFW
PCSPITQGDRGVGSXAVILDDNFVTKAXALTYDPYVNYSSRHTITQPFSYHSRYF

TPKPVL DXTIDYFQPNNKRNQLWLRLQTXGNVDHVGLGTAFENSIYDQ_xYNIRX
TMYVQFREFNLKDPPLNPX (SEQ ID NO: 8),

(IV)

MTYPRRRXRRRRHRPRSHLGQILRRRPWLVHPRHRYRWRRKNGIFNTRL SRTX
5 GYTXKKTTV_XTPSWXVDMMRFNINDFLPPGGGSNPXXVPFEYYRIRKVKVEFW
PCSPITQGDRGVGSXAVILDDNFVTKAXALTYDPYVNYSSRHTITQPFSYHSRYF
TPKPVL DXTIDYFQPNNKRNQLWLRLQTXGNVDHVGLGTAFENSIYDQ_xYNIRX
TMYVQFREFNLKDPPLNPX (SEQ ID NO: 9),

где в указанных последовательностях (I)-(IV):

10 «X» обозначает любой аминокислотный остаток, выбранный из группы,
состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y;

«X» обозначает любой аминокислотный остаток, выбранный из группы,
состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, S, T, V, W и Y; и

15 «x» обозначает любой аминокислотный остаток, выбранный из группы,
состоящей из D и E.

Для целей пояснения и в качестве примера, который не ограничивает объем
изобретения, полипептид, предлагаемый в изобретении, представляет собой
полипептид, состоящий из последовательности:

MTYPRRRFRRRRHRPRSHLGQILRRRPWLVHPRHRYRWRRKNGIFNTRL SRTIG
20 YTVKKTTV_XTPSWNVDMMRFNINDFLPPGGGSNP LTVPFEYYRIRKVKVEFWP
CSPITQGDRGVGSTAVILDDNFVTKANALTYDPYVNYSSRHTITQPFSYHSRYFT
PKPVLDR TIDYFQPNNKRNQLWLRLQT TGNVDHVGLGTAFENSIYDQDYNIRIT
MYVQFREFNLKDPPLNPK (SEQ ID NO: 46),

25 в которой «X» обозначает любой аминокислотный остаток, выбранный из
группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, S, T, V, W и Y.

В следующем предпочтительном объекте настоящего изобретения белок
OPC2 PCV2 дикого типа, указанный в настоящем описании, представляет собой
белок, представленный в SEQ ID NO: 2.

30 Другим объектом изобретения является также иммуногенная композиция,
содержащая полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении.

Другим предпочтительным объектом изобретения является также
иммуногенная композиция, содержащая полипептид, предлагаемый в настоящем
изобретении, и полипептид OPC2 PCV2a, в которой указанный полипептид

OPC2 PCV2a предпочтительно представляет собой полипептид, который по меньшей на 94% или предпочтительно по меньшей мере на 95% идентичен последовательности SEQ ID NO: 3.

Следующим объектом изобретения является также полинуклеотид, содержащий последовательность, которая кодирует полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, где указанный полинуклеотид, предлагаемый в изобретении, предпочтительно представляет собой выделенный полинуклеотид.

Для целей пояснения и в качестве примера, который не ограничивает объем изобретения, полинуклеотид, предлагаемый в изобретении, представляет собой полинуклеотид, который содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4.

Получение полинуклеотидов, представленных в настоящем описании, известно специалистам в данной области, и его можно осуществлять с помощью технологий рекомбинации, которые среди прочего изложены у Sambrook и др., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, изд-во Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001; Amusable и др., Current Protocols In Molecular Biology, изд-во Greene Publishing Associates & Wiley Interscience, NY, 2003; PCR Strategies, под ред. Innis и др., изд-во Academic Press, Inc., San Diego, 1995 и PCR Technology, под ред. Erlich, изд-во Oxford University Press, New York, 1994, которые все включены в настоящее описание в качестве ссылки.

Кроме того, в изобретении предпочтительно предложен бакуловирус, который содержит полинуклеотид, содержащий последовательность, которая кодирует полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, где указанный бакуловирус, предлагаемый в изобретении, предпочтительно представляет собой выделенный бакуловирус.

Кроме того, в изобретении предложена также плазмида, предпочтительно экспрессионный вектор, которая содержит полинуклеотид, содержащий последовательность, которая кодирует полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, где указанная плазмида, предлагаемая в изобретении, предпочтительно представляет собой выделенную плазмиду.

Изобретение относится также к клетке, содержащей бакуловирус, который содержит полинуклеотид, содержащий последовательность, которая кодирует полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, или плазмиду,

предпочтительно экспрессионный вектор, которая содержит полинуклеотид, содержащий последовательность, которая кодирует полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, где указанная клетка, предлагаемая в изобретении, предпочтительно представляет собой выделенную клетку.

5 Следующим объектом изобретения является также применение полипептида, предлагаемого в настоящем изобретении; бакуловируса, предлагаемого в изобретении; иммуногенной композиции, предлагаемой в изобретении; полинуклеотида, предлагаемого в изобретении; плазмиды, предлагаемой в изобретении, и/или клетки, предлагаемой в изобретении, для
10 приготовления лекарственного средства, предпочтительно вакцины.

В этом контексте в изобретении предложен также способ получения полипептида, предлагаемого в настоящем изобретении, где указанный способ содержит стадию, на которой заражают клетку, предпочтительно клетку насекомого, бакуловирусом, предлагаемым в изобретении.

15 Кроме того, в изобретении предложен также способ получения полипептида, предлагаемого в настоящем изобретении, где указанный способ содержит стадию, на которой трансфецируют клетку плазмидой, предлагаемой в изобретении.

Полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, предпочтительно
20 экспрессируется в больших количествах, достаточных для стабильной самосборки вирусоподобных частиц, которые можно после этого применять для однократной вакцинации («single shot»-вакцинация), прежде всего, если они входят в состав иммуногенной композиции, тем самым, обеспечивая снижение и предупреждение клинических признаков, вызываемых заражением PCV2, таким
25 как заражение PCV2b и/или PCV2a.

Таким образом, изобретение относится, в частности, к полипептиду, предлагаемому в настоящем изобретении, или иммуногенной композиции, предлагаемой в изобретении, соответственно, при этом изобретение базируется на том, что указанный полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, или
30 указанную иммуногенную композицию, которая содержит полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, можно применять для практических целей.

Таким образом, одним из объектов изобретения является полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, или иммуногенная композиция, которая содержит полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, предназначенные для применения в способе лечения или предупреждения заражения PCV2, снижения, предупреждения или лечения клинических признаков, вызываемых заражением PCV2, или предупреждения или лечения заболевания, вызываемого заражением PCV2.

Изобретение относится также к способу лечения или предупреждения заражения PCV2, снижения, предупреждения или лечения клинических признаков, вызываемых заражением PCV2, или предупреждения или лечения заболевания, вызываемого заражением PCV2, заключающемуся в том, что вводят полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, или иммуногенную композицию, которая содержит полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, животному, прежде всего животному, которое нуждается в этом.

Изобретение относится также к применению полипептида, предлагаемого в настоящем изобретении, или иммуногенной композиции, которая содержит полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, для приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения или предупреждения заражения PCV2, снижения, предупреждения или лечения клинических признаков, вызываемых инфекцией PCV2, или предупреждения или лечения заболевания, вызываемого заражением PCV2.

В предпочтительном объекте изобретения заражение PCV2, указанным в настоящем описании, представляет собой заражение PCV2 подтипа b (PCV2b) и/или заражение PCV2 подтипа, отличного от подтипа 2b.

В контексте настоящего описания понятие «заражение PCV2» эквивалентно понятию «PCV2-инфекция».

В частности, заражение подтипом PCV2, отличным от подтипа 2b, указанного в настоящем описании, представляет собой заражение PCV2 подтипа a (PCV2a) и PCV2 подтипа c (PCV2c), и предпочтительно представляет собой заражение PCV2a.

Понятие «белок ORC2 PCV2 подтипа b (PCV2b)» в контексте настоящего описания относится к белку, кодируемому геном ORC2 PCV-2b, который определяется стандартизированной номенклатурой для определения генотипа

PCV2 (Segales J. и др., PCV-2 genotype definition and nomenclature, Vet Rec 162, 2008, сс. 867-868), публикация включена в настоящее описание в качестве ссылки).

5 Согласно другому предпочтительному объекту изобретения заражение подтипом PCV2, отличным от подтипа 2b, указанного в настоящем описании, представляет собой одновременное (конкурентное) заражение (I) подтипом PCV2, отличным от подтипа 2b, и (II) PCV2b, в частности, одновременное заражение PCV2a и PCV2b.

10 Понятия «PCV2a», «PCV2b» и «PCV2c» соответственно согласно настоящему описанию относятся к PCV-2a, PCV-2b и PCV-2c соответственно согласно стандартизованной номенклатуре для определения генотипа PCV2 (Segales J. и др., PCV-2 genotype definition and nomenclature, Vet Rec 162, 2008, сс. 867-868), публикация включена в настоящее описание в качестве ссылки).

15 В частности, заражение PCV2b, указанным в настоящем описании, представляет собой заражение (I) PCV2, содержащим полипептид, который по меньшей мере на 94%, предпочтительно по меньшей мере на 95%, более предпочтительно по меньшей мере на 96%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 97%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 98% и наиболее предпочтительно по меньшей мере на 99% идентичен
20 последовательности SEQ ID NO: 2, или (II) PCV2, содержащим полинуклеотид, который содержит последовательность, кодирующую полипептид, который по меньшей мере на 94%, предпочтительно по меньшей мере на 95%, более предпочтительно по меньшей мере на 96%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 97%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 98% и
25 наиболее предпочтительно по меньшей мере на 99% идентичен последовательности SEQ ID NO: 2.

В контексте настоящего описания подразумевается, в частности, что понятие «идентичен последовательности SEQ ID NO: X» эквивалентно понятию «идентичен последовательности SEQ ID NO: X по длине SEQ ID NO: X» или
30 понятию «идентичен последовательности SEQ ID NO: X по всей длине SEQ ID NO: X» соответственно. В этом контексте «X» обозначает любое целое число, выбранное из 1-3, поэтому «SEQ ID NO: X» обозначает любую из SEQ ID NO:..., упомянутых в настоящем описании.

Предпочтительно заражение PCV2a, указанным в настоящем описании, представляет собой заражение (I) PCV2, содержащим полипептид, который по меньшей мере на 94%, предпочтительно по меньшей мере на 95%, более предпочтительно по меньшей мере на 96%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 97%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 98% и наиболее предпочтительно по меньшей мере на 99%, идентичен последовательности SEQ ID NO: 3, или (II) PCV2, содержащий полинуклеотид, который содержит последовательность, кодирующую полипептид, который по меньшей мере на 94%, предпочтительно по меньшей мере на 95%, более предпочтительно по меньшей мере на 96%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 97%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 98% и наиболее предпочтительно по меньшей мере на 99% идентичен последовательности SEQ ID NO: 3.

Предпочтительно в контексте настоящего изобретения лечение или предупреждение заражения PCV2 основывается или содержит, или состоит в индукции иммунного ответа против указанного PCV2, а клинические признаки, упомянутые в настоящем описании, выбирают из группы, состоящей из лимфоидного истощения, лимфоидного воспаления, положительной ИГХ (иммуногистохимической) оценки в отношении антигена PCV2 лимфоидной ткани, виремии, выделений из носа, пирексии, пониженного усредненного суточного прибавления массы, воспаления легких, положительной ИГХ-оценки в отношении антигена PCV2 в легочной ткани, и/или заболевание, упомянутое в настоящем описании, представляет собой PMWS.

В частности, в контексте настоящего изобретения лечение или предупреждение заражения PCV2 подтипа, отличного от 2b, основывается или содержит, или состоит в индукции иммунного ответа против указанного PCV2 подтипа, отличного от 2b, или одновременной индукции иммунного ответа и против указанного PCV2 подтипа, отличного от 2b, и PCV2b.

Понятие «предупреждение» или «снижение» или «предупреждать» или «снижать» соответственно в контексте настоящего описания означает (но, не ограничиваясь только указанным) процесс, который включает введение антигена PCV2, а именно, полипептида, предлагаемого в настоящем изобретении, который включен в композицию, предлагаемую в изобретении, животному, где

указанный антиген PCV2, когда его вводят указанному животному, вызывает или обладает способностью вызывать иммунный ответ у указанного животного против PCV2. В целом, указанное лечение приводит к снижению клинических признаков заболевания, вызываемого PCV2, или клинических признаков, ассоциированных с заражением PCV2, соответственно. Более конкретно понятие «предупреждение» или «предупреждать» в контексте настоящего описания означает, в целом, процесс профилактики, при котором животное подвергают воздействию иммуногенной композиции, предлагаемой в настоящем изобретения, до индукции или до начала процесса заболевания, вызываемого PCV2.

В контексте настоящего описания «снижение клинических признаков, ассоциированных с заражением PCV2» означает (но не ограничиваясь только указанным) уменьшение количества инфицированных особей в группе, уменьшение или элиминацию количества особей, имеющих клинические признаки инфекции, или снижение серьезности любого из клинических признаков, которые присутствуют у особей, по сравнению с инфекцией дикого типа. Например, это относится к любому снижению патогенной нагрузки, выделения патогена, снижению передачи патогена или снижению любого клинического признака, симптоматичного для вызываемой PCV2 инфекции.

Предпочтительно указанные клинические признаки снижаются у особей, обработанных композицией, предлагаемой в настоящем изобретении, по меньшей мере на 10% по сравнению с особями, которых не обрабатывали композицией и которые могут стать инфицированными. Более предпочтительно клинические признаки снижаются у особей, которых обрабатывают композицией, предлагаемой в настоящем изобретении, по меньшей мере на 20%, предпочтительно по меньшей мере на 30%, более предпочтительно по меньшей мере на 40% и еще более предпочтительно по меньшей мере на 50%.

Понятие «снижение виремии» означает (но, не ограничиваясь только указанным) уменьшение количества вирусов PCV2, проникающих в кровотоки животного, при этом уровень виремии, т.е. количество копий РНК PCV2 на мл сыворотки крови или количество бляшкообразующих колоний на децилитр сыворотки крови, снижается в сыворотке крови особей, обработанных композицией, предлагаемой в настоящем изобретении, по меньшей мере на 50%

по сравнению с особями, которых не обрабатывали композицией и которые могут стать инфицированными. Более предпочтительно уровень вирусии снижается у особей, обработанных композицией, предлагаемой в настоящем изобретении, по меньшей мере на 90%, предпочтительно по меньшей мере на 99,9%, более предпочтительно по меньшей мере на 99,99% и еще более предпочтительно по меньшей мере на 99,999%.

В контексте настоящего описания понятие «вирусия» относится, прежде всего, к состоянию, при котором частицы PCV2 размножаются и циркулируют в кровотоке животного.

В контексте настоящего описания понятие «животное» относится, прежде всего, к млекопитающему, предпочтительно к свинье, более предпочтительно к молодой свинье, не достигшей половой зрелости, наиболее предпочтительно к поросятку.

Согласно наиболее предпочтительному объекту изобретения полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, или иммуногенную композицию, предлагаемую в изобретении, вводят только один раз.

В контексте настоящего изобретения предпочтительным является полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, или иммуногенная композиция, предлагаемая в изобретении, который/которая подлежит введению или который/которую вводят соответственно только один раз животному, предпочтительно свинье, более предпочтительно свинье, не достигшей половой зрелости, наиболее предпочтительно поросятку.

Настоящее изобретение позволяет решать проблемы, присущие прототипам, и обеспечивает выраженный прогресс в данной области техники. Другим объектом настоящего изобретения является также способ лечения или предупреждение заражения PCV2 или снижения клинических признаков, вызываемых или ассоциированных с заражением PCV2 у животных, предпочтительно животных, которые имеют антитела к PCV2, заключающийся в том, что осуществляют стадию, на которой вводят в эффективном количестве полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, или иммуногенную композицию, предлагаемую в изобретении, животному, которое нуждается в таком лечении.

Понятие «вакцина» или «иммуногенная композиция» (оба понятия являются синонимами) в контексте настоящего описания относится к любой фармацевтической композиции, которая содержит полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, при этом, композицию можно применять для предупреждения или лечения ассоциированного с заражением PCV2 заболевания или состояния у животного. Предпочтительная иммуногенная композиция может индуцировать, стимулировать или повышать иммунный ответ на PCV2. Под это понятие подпадают как субъединичные иммуногенные композиции, описанные ниже, так и композиции, которые содержат убитый (полностью обезвреженный) или ослабленный, и/или инактивированный мутант PCV2b.

Следует понимать, в частности, что понятие «мутант PCV2b» в контексте настоящего описания относится к мутанту PCV2b, который содержит полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, и/или полинуклеотид, предлагаемый в изобретении.

Другим объектом настоящего изобретения является также способ лечения или предупреждения заражения PCV2 или снижения клинических признаков, вызываемых или ассоциированных с заражением PCV2, у животных, которые имеют антитела к PCV2, прежде всего полученные от матери антитела к PCV2, заключающийся в том, что осуществляют стадию, на которой вводят в эффективном количестве полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, или иммуногенную композицию, которая содержит полипептид, предлагаемый в изобретении, животному, которое нуждается в таком лечении, где иммуногенная композиция представляет собой субъединичную иммуногенную композицию, композицию, содержащую убитые (полностью обезвреженные) или ослабленные, и/или инактивированные PCV2b.

В контексте настоящего описания понятие «субъединичная иммуногенная композиция» относится к композиции, которая содержит по меньшей мере один иммуногенный полипептид или антиген, но не все антигены, происходящие или являющиеся гомологами антигена из мутанта PCV2b. Такая композиция практически свободна от интактного мутанта PCV2b. Таким образом, «субъединичную иммуногенную композицию» получают по меньшей мере из частично очищенных или фракционированных (предпочтительно практически очищенных) иммуногенных полипептидов из мутанта PCV2b, или их

рекомбинантных аналогов. Субъединичная иммуногенная композиция может содержать субъединицу антигена или антигенов, представляющего(их) интерес, который(ые) практически свободен(ны) от других антигенов или полипептидов из мутанта PCV2b, или является(ют) фракционированным(и). Предпочтительная иммуногенная субъединичная композиция содержит полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, который представлен в настоящем описании.

Понятие «иммунный ответ» относится (но, не ограничиваясь только указанным), к формированию в хозяине клеточно- и/или антитело-опосредованного иммунного ответа на представляющую интерес композицию или вакцину. Как правило, «иммунный ответ» включает (но, не ограничиваясь только ими) одну или несколько из следующих реакций: производство или активацию антител, В-клеток, Т-клеток-хелперов, Т-клеток-супрессоров и/или цитотоксических Т-клеток, специфически направленных на антиген или антигены, включенный(е) в представляющую интерес композицию или вакцину. Предпочтительно организм-хозяин должен вырабатывать либо терапевтический, либо защитный иммунологический (вторичный иммунный ответ) ответ так, чтобы повышалась устойчивость к новой инфекции и/или снижалась клиническая серьезность заболевания. Такое защитное действие можно выявлять либо по снижению уровня или серьезности, либо по отсутствию описанных выше признаков, ассоциированных с заражениями PCV2, прежде всего заражением PCV2 подтипа b (PCV2b) и/или заражением PCV2 подтипа, отличного от подтипа 2b, замедлению появления виремии, снижению персистенности вируса, снижению общей вирусной нагрузки и/или снижению вирусной экскреции.

Понятие «антиген» в контексте настоящего описания относится к аминокислотной последовательности, которая вызывает иммунологический ответ, описанный выше.

Согласно следующему объекту изобретения иммуногенная композиция, которую применяют в контексте настоящего описания, наиболее предпочтительно содержит полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, или его фрагмент, экспрессируемый полипептидом, предлагаемым в изобретении. Предпочтительный полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, представляет собой полипептид, имеющий SEQ ID NO: 1. Однако,

как должно быть очевидно специалистам в данной области, степень гомологии указанной последовательности может варьироваться даже на 1-5%, и при этом она все еще сохраняет антигенные характеристики, которые обуславливают ценность иммуногенных композиций, предлагаемых в изобретении.

5 Понятие «идентичность последовательностей», как известно в данной области, относится к родству между двумя или большим количеством полипептидных последовательностей или двумя или большим количеством полинуклеотидных последовательностей, а именно между референс-последовательностью и рассматриваемой последовательностью, подлежащей
10 сравнению с референс-последовательностью. Идентичность последовательностей определяют путем сравнения данной последовательности с референс-последовательностью после оптимального выравнивания последовательностей для получения наиболее высокой степени сходства последовательностей, что определяют по совместимости между отрезками
15 указанных последовательностей. После выравнивания идентичность последовательностей оценивают по находящимся в одинаковых положениях основаниям (по типу «положение с положением»), например, последовательности являются «идентичными» в определенном положении, если в этом положении нуклеотиды или аминокислотные остатки идентичны. Общее
20 количество таких идентичных положений затем делят на общее количество нуклеотидов или остатков в референс-последовательности, получая % идентичности последовательностей. Идентичность последовательностей легко можно рассчитывать с помощью известных методов, включая (но, не ограничиваясь только ими), описанные в: Computational Molecular Biology, под
25 ред. Lesk A. N., изд-во Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, под ред. Smith D.W., изд-во, Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, часть I, под ред. Griffin A.M. и Griffin H. G., изд-во Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinge G., изд-во Academic Press, 1987; Sequence Analysis
30 Primer, под ред. Gribskov M. и Devereux J., изд-во M. Stockton Press, New York, 1991; и Carillo H. и Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48, 1988, с. 1073, содержание которых включено в настоящее описание в качестве ссылки. Предпочтительные методы определения идентичности последовательностей

созданы так, чтобы получать наибольшее соответствие между изучаемыми последовательностями. Методы определения идентичности последовательностей приведены в систему в доступных общественности компьютерных программах, которые позволяют определять идентичность последовательностей для

5 рассматриваемых последовательностей. Примерами таких программ являются, (но, не ограничиваясь только ими), пакет программ GCG (Devereux J. и др., *Nucleic Acids Research*, 12(1), 1984, с. 387), BLASTP, BLASTN и FASTA (Altschul S. F. и др., *J. Molec. Biol.*, 215, 1990, сс. 403-410). Программа BLASTX является доступной общественности от фирмы NCBI и других источников (BLAST

10 *Manual*, Altschul S. и др., NCVI NLM NIH Bethesda, MD 20894, Altschul S. F. и др., *J. Molec. Biol.*, 215, 1990, сс. 403-410), содержание которых включено в настоящее описание в качестве ссылки). Эти программы позволяют осуществлять оптимальное выравнивание последовательностей с помощью принимаемых по умолчанию значений, таких как вес бреши, для того, чтобы

15 получать наиболее высокий уровень идентичности последовательностей для рассматриваемой последовательности и референс-последовательности. В качестве иллюстрации: когда упоминается полинуклеотид, нуклеотидная последовательность которого по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, еще более предпочтительно на 95% «идентична последовательности»

20 нуклеотидной референс-последовательности, то подразумевается, что нуклеотидная последовательность данного полинуклеотида идентична референс-последовательности за исключением того, что данная полинуклеотидная последовательность может включать вплоть до 15, предпочтительно вплоть до 10, еще более предпочтительно вплоть до 5 точечных мутаций на каждые 100

25 нуклеотидов нуклеотидной референс-последовательности. Другими словами, для того, чтобы полинуклеотид имел нуклеотидную последовательность, идентичную по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, еще более предпочтительно на 95% с нуклеотидной референс-последовательностью, вплоть до 15%, предпочтительно 10%, еще более предпочтительно 5% нуклеотидов в

30 референс-последовательности можно изымать путем делеции или заменять на другой нуклеотид, или вплоть до 15% нуклеотидов, предпочтительно 10%, еще более предпочтительно 5% от общего количества нуклеотидов в референс-последовательности можно встраивать в референс-последовательность. Эти

мутации референс-последовательности могут иметь место на 5'- или 3'-конце нуклеотидной референс-последовательности или в любом положении между этими концами, либо находясь индивидуально среди нуклеотидов в референс-последовательности, либо в виде одной или нескольких смежных групп в референс-последовательности. Аналогично этому под полипептидом, данная аминокислотная последовательность которого идентична по меньшей мере, например на 85%, предпочтительно на 90%, еще более предпочтительно на 95% аминокислотной референс-последовательности, подразумевают, что рассматриваемая аминокислотная последовательность полипептида идентична референс-последовательности за исключением того, что рассматриваемая полипептидная последовательность может включать вплоть до 15, предпочтительно вплоть до 10, еще более предпочтительно вплоть до 5 аминокислотных замен на каждые 100 аминокислот аминокислотной референс-последовательности. Другими словами, для получения данной полипептидной последовательности, которая по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, еще более предпочтительно на 95% идентична последовательности аминокислотной референс-последовательности, вплоть до 15%, предпочтительно вплоть до 10%, еще более предпочтительно вплоть до 5% аминокислотных остатков в референс-последовательности можно изымать путем делеции или заменять на другую аминокислоту, или вплоть до 15% аминокислот, предпочтительно вплоть до 10%, еще более предпочтительно вплоть до 5% от общего количества аминокислотных остатков в референс-последовательности можно встраивать в референс-последовательность. Эти изменения референс-последовательности могут иметь место на амино- или карбоксиконце аминокислотной референс-последовательности или в любом положении между этими концевыми положениями, либо находясь индивидуально среди остатков в референс-последовательности, либо в виде одной или нескольких смежных групп в референс-последовательности. Предпочтительно положения остатков, которые являются неидентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами. Однако консервативные замены не относят к совместимым при определении идентичности последовательностей.

Определение «гомологии последовательностей» в контексте настоящего описания относится к методу определения сходства двух последовательностей.

Для определения гомологии последовательностей две или большее количество последовательностей подвергают оптимальному выравниванию и при необходимости интродуцируют бреши. В отличие от оценки идентичности последовательностей при определении гомологии последовательностей консервативные аминокислотные замены считают удовлетворяющими условиям гомологии. Другими словами, для того, чтобы полипептид или полинуклеотид имел 95% гомологию последовательности с референс-последовательностью, 85%, предпочтительно 90%, еще более предпочтительно 95% аминокислотных остатков или нуклеотидов в референс-последовательности должны соответствовать или содержать консервативную замену на другую аминокислоту или нуклеотид, или количество аминокислот или нуклеотидов, составляющее вплоть до 15%, предпочтительно вплоть до 10%, еще более предпочтительно вплоть до 5% от общего количества аминокислотных остатков или нуклеотидов, не включая консервативные замены, в референс-последовательности можно встраивать в референс-последовательность. Предпочтительно гомологичная последовательность содержит участок, состоящий по меньшей мере из 50, еще более предпочтительно из 100, еще более предпочтительно из 250, еще более предпочтительно из 500 нуклеотидов.

Понятие «консервативная замена» относится к замене аминокислотного остатка или нуклеотида на другой аминокислотный остаток или нуклеотид, имеющий сходные характеристики или свойства, включая размер, гидрофобность и т.д., в результате чего общая функциональность не изменяется существенно.

Понятие «выделенный» означает «измененный человеком» относительно его встречающегося в естественных условиях состояния, т.е., если он встречается в природе, то его изменяют или удаляют из естественного окружения, или осуществляют и то, и другое. Например, полинуклеотид или полипептид, встречающийся в естественных условиях в живом организме, не является «выделенным», но этот же полинуклеотид или полипептид, отделенный от материала, с которым он существует совместно в его естественном состоянии, является «выделенным» согласно применяемому в описании понятию.

Таким образом, следующим объектом настоящего изобретения является способ лечения или предупреждения заражения PCV2 или снижения

клинических признаков, вызываемых или ассоциированных с заражением PCV2, у животных, предпочтительно у животных, которые имеют антитела к PCV2, прежде всего полученные от матери антитела к PCV2, заключающийся в том, что осуществляют стадию, на которой вводят в эффективном количестве

5 полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, или иммуногенную композицию, содержащую полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, животному, которое нуждается в указанном лечении, где указанный полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, представляет собой любой из представленных в настоящем описании полипептидов. Предпочтительно
10 полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, представляет собой: (I) полипептид, который содержит последовательность SEQ ID NO: 1 или состоит из нее; или (II) любой полипептид, который гомологичен по меньшей мере на 95% полипептиду, представленному в подпункте (I).

Согласно следующему объекту изобретения полипептид, предлагаемый в
15 настоящем изобретении, содержится в иммуногенной композиции с таким уровнем включения белка, который является эффективным для индукции требуемого иммунного ответа, а именно для снижения количества случаев, уменьшения серьезности или предупреждения или снижения одного или нескольких клинических признаков, являющихся результатом заражения PCV2
20 или ассоциированных с ним. Предпочтительно уровень включения полипептида, предлагаемого в настоящем изобретении, соответствует по меньшей мере 0,2 мкг белка/мл конечной иммуногенной композиции (мкг/мл), более предпочтительно от примерно 0,2 до примерно 400 мкг/мл, еще более предпочтительно от примерно 0,3 до примерно 200 мкг/мл, еще более предпочтительно от примерно
25 0,35 до примерно 100 мкг/мл, еще более предпочтительно от примерно 0,4 до примерно 50 мкг/мл, еще более предпочтительно от примерно 0,45 до примерно 30 мкг/мл, еще более предпочтительно от примерно 0,5 до примерно 18 мкг/мл, еще более предпочтительно от примерно 0,6 до примерно 15 мкг/мл, еще более предпочтительно от примерно 0,75 до примерно 8 мкг/мл, еще более
30 предпочтительно от примерно 1,0 до примерно 6 мкг/мл, еще более предпочтительно от примерно 1,3 до примерно 3,0 мкг/мл, еще более предпочтительно от примерно 1,4 до примерно 2,5 мкг/мл, еще более

предпочтительно от примерно 1,5 до примерно 2,0 мкг/мл и наиболее предпочтительно примерно 1,6 мкг/мл.

Согласно следующему объекту изобретения уровень включения белка составляет по меньшей мере 0,2 мкг белка OPC2 PCV2b, описанного выше, на дозу конечной иммуногенной композиции (мкг/дозу), более предпочтительно от 5 примерно 0,2 до примерно 400 мкг/дозу, еще более предпочтительно от примерно 0,3 до примерно 200 мкг/дозу, еще более предпочтительно от примерно 0,35 до примерно 100 мкг/дозу, еще более предпочтительно от примерно 0,4 до примерно 50 мкг/дозу, еще более предпочтительно от примерно 10 0,45 до примерно 30 мкг/дозу, еще более предпочтительно от примерно 0,5 до примерно 18 мкг/дозу, еще более предпочтительно от примерно 0,6 до примерно 15 мкг/дозу, еще более предпочтительно от примерно 0,75 до примерно 8 мкг/дозу, еще более предпочтительно от примерно 1,0 до примерно 6 мкг/дозу, еще более предпочтительно от примерно 1,3 до примерно 3,0 мкг/дозу, еще 15 более предпочтительно от примерно 1,4 до примерно 2,5 мкг/дозу, еще более предпочтительно от примерно 1,5 до примерно 2,0 мкг/дозу и наиболее предпочтительно примерно 1,6 мкг/дозу. Кроме того, уровень включения полипептида, предлагаемого в настоящем изобретении (содержание антигена), составляющий менее 20 мкг/дозу предпочтительно примерно от 0,5 до 18 20 мкг/дозу, может обуславливать иммунитет у молодых животных и/или у животных, позитивных в отношении антител к PCV2, прежде всего, которые являются позитивными в отношении полученных от матери антител. Таким образом, еще одним объектом настоящего изобретения является способ лечения или предупреждения заражения PCV2 или снижения клинических признаков, 25 вызываемых или ассоциированных с заражением PCV2, у животных, которые имеют антитела к PCV2, прежде всего полученные от матери антитела к PCV2, заключающийся в том, что осуществляют стадию, на которой вводят менее 20 мкг/дозу, предпочтительно примерно от 0,5 до 18 мкг/дозу полипептида, предлагаемого в настоящем изобретении, или иммуногенной композиции, 30 которая содержит полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, животному, которое нуждается в таком лечении. Указанный полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, представляет собой любой, описанный в настоящей заявке на патент.

Полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, который применяют в иммуногенной композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, можно получать любым путем, включая выделение и очистку полипептида, предлагаемого в настоящем изобретении, стандартный метод синтеза белков и метод рекомбинантной ДНК. Предпочтительные методы получения полипептида, предлагаемого в настоящем изобретении, представлены в WO 06/072065, сущность и содержание которой полностью включены в настоящее описание в качестве ссылки, поскольку, как неожиданно было установлено, методы, описанные в указанной заявке, для получения полипептида OPC2 PCV2a, можно применять соответственно для получения полипептида, предлагаемого в настоящем изобретении. В целом, метод состоит в следующем: заражают чувствительные клетки рекомбинантным вирусным вектором, который содержит кодирующие последовательности ДНК, которые кодируют полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, экспрессируют полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, с помощью рекомбинантного вируса и выделяют экспрессируемый полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, из супернатанта путем фильтрации, и инактивируют общепринятым методом, предпочтительно используя бинарный этиленмин (БЭИ), который затем нейтрализуют для прекращения процесса инактивации.

Понятие «иммуногенная композиция» в контексте настоящего описания относится также к композиции, которая содержит I) любой из полипептидов, предлагаемых в настоящем изобретении, которые описаны выше, предпочтительно в указанных выше концентрациях, и II) по меньшей мере часть вирусного вектора, экспрессирующего указанный полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, предпочтительно рекомбинантного бакуловируса. Кроме того, иммуногенная композиция может содержать I) любой из полипептидов, предлагаемых в настоящем изобретении, которые описаны выше, предпочтительно в указанных выше концентрациях, II) по меньшей мере часть вирусного вектора, экспрессирующего указанный полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, предпочтительно рекомбинантного бакуловируса, и III) часть супернатанта клеточной культуры.

Таким образом, еще одним объектом настоящего изобретения является способ лечения или предупреждения заражения PCV2 или снижения клинических признаков вызываемых или ассоциированных с заражением PCV2, у животных, предпочтительно у животных, которые имеют антитела к PCV2, прежде всего полученные от матери антитела к PCV2, заключающийся в том, что осуществляют стадию, на которой вводят в эффективном количестве полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, или иммуногенную композицию, которая содержит полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, животному, который нуждается в таком лечении, где полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, представляет собой рекомбинантный, предпочтительно экспрессируемый в бакуловирусе полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении. Предпочтительно указанные рекомбинантные или экспрессируемые в бакуловирусе полипептиды, предлагаемые в настоящем изобретении, имеют указанную выше последовательность.

Понятие «иммуногенная композиция» в контексте настоящего описания относится также к композиции, которая содержит I) любой из полипептидов, предлагаемых в настоящем изобретении, которые описаны выше, предпочтительно в указанных выше концентрациях, II) по меньшей мере часть вирусного вектора, экспрессирующего указанный полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, предпочтительно рекомбинантного бакуловируса, и III) часть клеточной культуры; где примерно 90% компонентов имеют размер менее 1 мкм.

Понятие «иммуногенная композиция» в контексте настоящего описания относится также к композиции, которая содержит I) любой из полипептидов, предлагаемых в настоящем изобретении, которые описаны выше, предпочтительно в указанных выше концентрациях, II) по меньшей мере часть вирусного вектора, экспрессирующего указанный полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, III) часть клеточной культуры, IV) инактивирующий агент, предназначенный для инактивации рекомбинантного вирусного вектора, предпочтительно БЭИ, где примерно 90% компонентов I)-III) имеют размер менее 1 мкм. Предпочтительно БЭИ присутствует в концентрациях, эффективных для инактивации бакуловируса, предпочтительно от 2 до примерно 8мМ БЭИ, предпочтительно примерно 5мМ БЭИ.

Понятие «иммуногенная композиция» в контексте настоящего описания относится также к композиции, которая содержит I) любой из полипептидов, предлагаемых в настоящем изобретении, которые описаны выше, предпочтительно в указанных выше концентрациях, II) по меньшей мере часть вирусного вектора, экспрессирующего указанный полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, III) часть клеточной культуры, IV) инактивирующий агент, предназначенный для инактивации рекомбинантного вирусного вектора, предпочтительно БЭИ, и V) нейтрализующий агент, предназначенный для прекращения инактивации, опосредуемой инактивирующим агентом, где примерно 90% компонентов I)-III) имеют размер менее 1 мкм. Предпочтительно, если инактивирующий агент представляет собой БЭИ, то указанная композиция содержит тиосульфат натрия в количествах, эквивалентных количеству БЭИ.

Белок включают в композицию, которую можно вводить животному, чувствительному к заражению PCV2. В предпочтительных вариантах в композицию можно включать дополнительные компоненты, известные специалистам в данной области (см. также Remington's Pharmaceutical Sciences, 18-е изд., изд-во Mack Publ., Easton, 1990). Кроме того, в состав композиции могут входить один или несколько приемлемых для применения в ветеринарии носителей. В контексте настоящего описания понятие «приемлемый для применения в ветеринарии носитель» включает (но, не ограничиваясь только ими) любые из перечисленных или все растворители, дисперсионные среды, материалы для нанесения покрытия, адъюванты, стабилизаторы, разбавители, консерванты, антибактериальные и противогрибковые агенты, агенты для придания изотоничности, замедляющие адсорбцию агенты и т.п. В предпочтительном варианте осуществления изобретения иммуногенная композиция содержит полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, который описан выше, предпочтительно в указанных выше концентрациях, который смешивают с адъювантом, предпочтительно карбополом, и физиологическим раствором.

Специалистам в данной области должно быть очевидно, что композиция, которую применяют согласно изобретению, может включать известные пригодные для инъекции физиологически приемлемые стерильные растворы. Для приготовления готового к применению раствора для парентеральной

инъекции или инфузии широко используют водные изотонические растворы, такие, например, как физиологический раствор или соответствующие растворы белков плазмы. Кроме того, иммуногенные композиции и вакцины, предлагаемые в настоящем изобретении, могут включать разбавители, агенты для придания изотоничности, стабилизаторы или адъюванты. Разбавители могут представлять собой воду, физиологический раствор, декстрозу, этанол, глицерин и т.п. Агенты для придания изотоничности могут представлять собой среди прочего хлорид натрия, декстрозу, маннит, сорбит и лактозу. Стабилизаторы представляют собой среди прочего альбумин и соли щелочных металлов и этилендиаминтетрауксусной кислоты.

Понятие «адъюванты» в контексте настоящего описания может относиться к гидроксиду алюминия и фосфату алюминия, сапонинам, таким, например, как Quil A, QS-21 (фирма Cambridge Biotech Inc., Кэмбридж, шт. Массачусетс), GPI-0100 (фирма Galenica Pharmaceuticals, Inc., Бирмингем, шт. Алабама), эмульсии вода-в-масле, эмульсии масло-в-воде, эмульсии вода-в-масле-в-воде. Основной эмульсии может являться, в частности, легкое жидкое парафиновое масло (соответствующее Европейской фармакопеи); изопреноидное масло, такое как сквалан или сквален; масло, образовавшееся в результате олигомеризации алкенов, прежде всего изобутена или децена; эфиры кислот или спиртов, содержащие линейную алкильную группу, более конкретно растительные масла, этилолеат, ди(каприлат/капрат) пропиленгликоля, три(каприлат/капрат) глицерина или диолеат пропиленгликоля; эфиры разветвленных жирных кислот или спиртов, в частности, эфиры изостеариновой кислоты. Масла применяют в сочетании с эмульгаторами для получения эмульсии. Эмульгаторы предпочтительно представляют собой неионогенные поверхностно-активные вещества, прежде всего сложные эфиры сорбитана, маннида (например, безводный маннитолеат), гликоля, полиглицерина, пропиленгликоля и олеиновой, изостеариновой, рицинолеиновой или гидроксистеариновой кислоты, которые необязательно являются этоксилированными, и блок-сополимеры полиоксипропилена-полиоксиэтилена, в частности продукты типа Плуороника (Pluronic), прежде всего L121 (см. Hunter и др., *The Theory and Practical Application of Adjuvants*, под ред. Stewart-Tull D. E. S., изд-во John Wiley and Sons, NY, сс. 51-94, 1995 и Todd и др., *Vaccine* 15, 1997, сс. 564-570).

Например, можно применять SPT-эмульсию, описанную на с. 147 в: «Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach», под ред. М. Powell и М. Newman, изд-во Plenum Press, 1995, и эмульсию MF59, описанную на с. 183 в этой же публикации.

Другим примером адъюванта является соединение, выбранное из полимеров акриловой или метакриловой кислоты и сополимеров малеинового ангидрида и алкенильного производного. Предпочтительными адъювантами являются полимеры акриловой или метакриловой кислоты, прежде всего, сшитые с простыми полиалкениловыми эфирами сахаров или многоатомными спиртами. Эти соединения известны под названием карбомеры (Pharmacia, т. 8, №. 2 июня 1996 г.). Специалистам в данной области в качестве ссылки можно предложить US 2909462, в котором описаны указанные акриловые полимеры, сшитые с полигидроксильрованным соединением, которое имеет по меньшей мере 3 гидроксильные группы, предпочтительно не более 8, при этом атомы водорода по меньшей мере трех гидроксильных групп замещены ненасыщенными алифатическими радикалами, которые имеют по меньшей мере 2 атома углерода. Предпочтительными являются радикалы, которые содержат от 2 до 4 атомов углерода, например, винильные, аллильные и другие ненасыщенные группы ряда этилена. Ненасыщенные радикалы могут сами содержать другие заместители, такие как метил. Наиболее предпочтительными являются продукты, поступающие в продажу под названием карбопол (фирма BF Goodrich, шт. Огайо). Их сшивают с аллилсахарозой или аллилпентаэритритолом. Среди них, прежде всего, следует упомянуть карбопол 974P, 934P и 971P. Наиболее предпочтительным для применения является карбопол 971P. Наиболее предпочтительно применять карбопол, в частности можно применять карбопол 971P, предпочтительно в количествах от примерно 500 мкг до примерно 5 мг на дозу, еще более предпочтительно в количестве от примерно 750 мкг до примерно 2,5 мг на дозу и наиболее предпочтительно в количестве примерно 1 мг на дозу.

Также приемлемыми адъювантами среди прочего являются (но, не ограничиваясь только ими), система RIBI- адъювантов (фирма Ribl Inc.), блок-сополимеры (фирма CytRx, Атланта, шт. Джорджия), SAF-M (фирма Chiron, Emeryville, шт. Калифорния), монофосфорил-липид А, адъювант на основе

аминa липида авридина, термолабильный энтеротоксин *E. coli* (рекомбинантный или нет), токсин холеры, IMS 1314 или мурамил-дипептид.

Предпочтительно адъювант добавляют в количестве от примерно 100 мкг до примерно 10 мг на дозу. Еще более предпочтительно адъювант добавляют в количестве от примерно 100 мкг до примерно 10 мг на дозу. Еще более предпочтительно адъювант добавляют в количестве от примерно 500 мкг до примерно 5 мг на дозу. Еще более предпочтительно адъювант добавляют в количестве от примерно 750 мкг до примерно 2,5 мг на дозу. Наиболее предпочтительно адъювант добавляют в количестве примерно 1 мг на дозу.

Кроме того, композиция может включать один или несколько фармацевтически приемлемых носителей. В контексте настоящего описания понятие «фармацевтически приемлемый носитель» включает любой из перечисленных или все растворители, дисперсионные среды, материалы для нанесения покрытия, стабилизаторы, разбавители, консерванты, антибактериальные и противогрибковые агенты, агенты для придания изотоничности, замедляющие адсорбцию агенты и т.п. Наиболее предпочтительно композиция, предлагаемая в изобретении, содержит полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, выделенный из супернатанта культивируемых *in vitro* клеток, где указанные клетки заражают рекомбинантным вирусным вектором, который содержит ДНК, кодирующую полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, и экспрессирует полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, и где указанную клеточную культуру обрабатывают от примерно 2 до примерно 8мМ БЭИ, предпочтительно примерно 5мМ БЭИ, для инактивации вирусного вектора и нейтрализующего агента, взятого в эквивалентной концентрации, предпочтительно раствором тиосульфата натрия в конечной концентрации от примерно 2 до примерно 8мМ, предпочтительно примерно 5мМ.

Настоящее изобретение относится также к иммуногенной композиции, которая содержит I) любой из полипептидов, предлагаемых в настоящем изобретении, которые описаны выше, предпочтительно в указанных выше концентрациях, II) по меньшей мере часть вирусного вектора, экспрессирующего указанный полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, III) часть клеточной культуры, IV) инактивирующий агент, предназначенный для

инактивации рекомбинантного вирусного вектора (предпочтительно БЭИ), и V) нейтрализующий агент, предназначенный для прекращения инактивации, опосредуемой инактивирующим агентом, предпочтительно тиосульфат натрия в количествах, эквивалентных количеству БЭИ; и VI) приемлемый адъювант, предпочтительно карбопол 971 в указанных выше количествах; где примерно 90% компонентов I)-III) имеют размер менее 1 мкм. Согласно еще одному объекту изобретения указанная иммуногенная композиция содержит также фармацевтически приемлемую соль, предпочтительно фосфат, в физиологически приемлемых концентрациях. Предпочтительно значение pH указанной иммуногенной композиции доводят до физиологического значения pH, т.е. примерно от 6,5 до 7,5.

В контексте настоящего описания иммуногенная композиция представляет собой также композицию, которая содержит в одном мл: I) по меньшей мере 1,6 мкг полипептида, предлагаемого в настоящем изобретении, который описан выше, предпочтительно менее 20 мкг, II) по меньшей мере часть бакуловируса, экспрессирующего указанный полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, III) часть клеточной культуры, IV) примерно от 2 до 8мМ БЭИ, V) тиосульфат натрия в количествах, эквивалентных количеству БЭИ, и VI) примерно 1 мг карбопола 971, и VII) фосфат в физиологически приемлемой концентрации; где примерно 90% компонентов I)-III) имеют размер менее 1 мкм, и значение pH указанной иммуногенной композиции доведено примерно до 6,5-7,5.

Иммуногенные композиции могут содержать также один или несколько других иммуномодулирующих агентов, таких, например, как интерлейкины, интерфероны или другие цитокины. Иммуногенные композиции могут содержать также гентамицин и мертиолат. Хотя специалист в данной области легко может определить количества и концентрации адъювантов и добавок, которые можно применять в контексте настоящего изобретения, в настоящем изобретении предложены композиции, содержащие от примерно 50 до примерно 2000 мкг адъюванта и предпочтительно примерно 250 мкг/мл дозы композиции вакцины. Так, иммуногенная композиция, предлагаемая в изобретении, представляет собой также композицию, которая содержит от примерно 1 до

примерно 60 мкг/мл антибиотиков и более предпочтительно менее примерно 30 мкг/мл антибиотиков.

В контексте настоящего описания иммуногенная композиция представляет собой также композицию, которая содержит I) любой из полипептидов, предлагаемых в настоящем изобретении, которые описаны выше, предпочтительно в указанных выше концентрациях, II) по меньшей мере часть вирусного вектора, экспрессирующего указанный полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, III) часть клеточной культуры, IV) инактивирующий агент, предназначенный для инактивации рекомбинантного вирусного вектора, предпочтительно БЭИ, и V) нейтрализующий агент, предназначенный для прекращения инактивации, опосредуемой инактивирующим агентом, предпочтительно тиосульфат натрия в количествах, эквивалентных количеству БЭИ; VI) приемлемый адъювант, предпочтительно карбопол 971, в указанных выше количествах; VII) соляной буфер в фармацевтически приемлемой концентрации, предпочтительно фосфат, и VIII) противомикробное действующее вещество; где примерно 90% компонентов I)-III) имеют размер менее 1 мкм.

Для изучения возможного взаимодействия полипептида, предлагаемого в настоящем изобретении, с материнским антителом можно проводить опыт, в котором определяют титры антитела у подопытных животных в момент вакцинации, и затем животных разделяют на группы с низким, средним или высоким титром антител: геометрические средние значения титров $< 1:100$ рассматриваются как низкие титры, титры от $1:100$ до $1:1000$ рассматриваются как средние титры, а титры $> 1:1000$ рассматриваются как высокие титры антител. Эта схема группировки животных соответствует схеме, которую применяли в полевом опыте, проведенном в Канаде, в котором титры антител $1:80$ рассматривались как низкие, титры антител $1:640$ как средние, а титры антител $> 1:1280$ как высокие (Larochelle и др., Can. J. Vet. Res.; 67, 2003, сс. 114-120). Для того чтобы проанализировать влияние низких, средних и высоких титров антител в момент вакцинации на виремию, вакцинированных и обработанных плацебо животных сравнивали в отношении начала, окончания, продолжительности виремии, количества дней, в которые были получены положительные образцы, и вирусной нагрузки. Присутствие антител к PCV2, в частности полученных от матери антител, предпочтительно не оказывало

существенного влияния на какой-либо из указанных параметров. Другими словами, эффективность полипептида, предлагаемого в настоящем изобретении, в отношении предупреждения и лечения заражения PCV2 или снижения клинических признаков, вызываемых или ассоциированных с заражением PCV2, у животных, не зависела от присутствия в день вакцинации антител к PCV2, предпочтительно от титра антител PCV2 вплоть до 1:100, предпочтительно превышающего 1:100, еще более предпочтительно превышающего 1:250, еще более предпочтительно превышающего 1:500, еще более предпочтительно 1:640; еще более предпочтительно превышающего 1:750, наиболее предпочтительно превышающего 1:1000. Это явление продемонстрировано в эксперименте с использованием одной вакцинации путем впрыскивания, т.е. когда полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, вводили только один раз и без какой-либо последующей обработки полипептидом, предлагаемым в настоящем изобретении.

Методы выявления и количественной оценки антител к PCV2 хорошо известны в данной области. Например, выявление и количественную оценку антител к PCV2 можно осуществлять с помощью метода непрямой иммунофлуоресценции, описанного у Magar и др., *Can. J. Vet Res.*; 64, 2000, сс. 184-186 или у Magar и др., *J. Comp. Pathol.*; 123, 2000, сс. 258-269. Другие методы количественной оценки антител к PCV2 описаны у Opriessnig и др., 37-th Annual Meeting of the American Association of Swine Veterinarians (37-ой Ежегодный съезд американской ассоциации по ветеринарии свиней), 2006 г.). Кроме того, анализ методом непрямой иммунофлуоресценции, который может применять специалист в данной области, содержит стадии, на которых: высевают примерно от 20000 до 60000 клеток PK15 или VIDO R1 на лунку 96-луночного планшета; заражают клетки изолятом PCV2, когда конфлюэнтность монослоев достигает примерно 65-85%; инкубируют зараженные клетки в течение 48 ч; удаляют среду и лунки отмывают дважды 3ФР; сливают промывочный буфер и клетки обрабатывают холодным фиксатором, представляющим собой смесь 50/50 метанол/ацетон (~100 мкл/лунку) в течение примерно 15 мин при температуре примерно -20°C; фиксатор сливают и планшеты сушат на воздухе; готовят серийные разведения свиной сыворотки в 3ФР и серийные разведения, положительные в отношении антител к PCV2, и

отрицательных контрольных образцов (образцы, представляющие собой положительный контроль и отрицательный контроль); добавляют серийные разведения в планшеты и инкубируют, давая связываться антителам, если они присутствуют в образце сыворотки, в течение примерно 1 ч при $36,5 \pm 1^\circ\text{C}$;

5 промывают планшеты трижды 3ФР и сливают 3ФР; окрашивают планшеты поступающим в продажу козьим антисвиным антителом, конъюгированным с ФИТЦ, разведенным в соотношении 1:100 в 3ФР, и инкубируют в течение примерно 1 ч при $36,5 \pm 1^\circ\text{C}$; после завершения инкубации микропланшеты изымают из инкубатора, конъюгат отбрасывают и планшеты промывают дважды

10 3ФР; оценивают планшеты с помощью УФ-микроскопа и индивидуальные лунки обозначают как позитивные или негативные, при этом для оценки тест-системы используют образцы, представляющие собой положительный контроль и отрицательный контроль; и рассчитывают титры сывороточных антител на основе наибольшего разведения, при котором наблюдается специфическая IFA-

15 реактивность, и определяют количество позитивных лунок для каждого разведения, или рассчитывают конечное 50%-ное значение с помощью соответствующей формулы Рида-Менча.

Указанный анализ описан в примере 2 WO 2008/076915 A2.

В случае спорных результатов и при любых сомнениях следует иметь в

20 виду, что указанные в настоящем описании титры антител к PCV2 относятся к титрам, которые установлены/могут быть установлены с помощью указанного анализа.

Таким образом, следующим объектом настоящего изобретения является способ лечения или предупреждения заражения PCV2 или снижения

25 клинических признаков, вызываемых или ассоциированных с заражением PCV2, у животных, которые имеют антитела к PCV2, прежде всего полученные от матери антитела, заключающийся в том, что животному, которое нуждается в таком лечении, вводят в терапевтически эффективном количестве полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, предпочтительно из расчета менее 20

30 мкг/дозу, где у животного выявлен титр антител к PCV2 вплоть до 1:100, предпочтительно превышающий 1:100, еще более предпочтительно превышающий 1:250, еще более предпочтительно превышающий 1:500, еще более предпочтительно 1:640, еще более предпочтительно превышающий 1:750,

наиболее предпочтительно превышающий 1:1000. Предпочтительно указанный титр антител к PCV2 можно определять и оценивать количественно с помощью специфического иммунного анализа антител к PCV2, предпочтительно анализа, описанного выше, например, описанного в примере 2 WO 2008/076915 A2. Более предпочтительно указанные антитела к PCV2 представляют собой полученные от матери антитела. Наиболее предпочтительно полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, вводят только один раз, предпочтительно в дозе менее 20 мкг/дозу.

Поросята, которые имеют лишь низкие титры ($< 1:100$) или средние титры ($< 1:1000$) полученных от матери антител к PCV2, не защищены в достаточной степени от заражения PCV2, которое происходит в возрасте менее 3 недель. Поэтому требуется вакцинация на очень ранней стадии жизни. В контексте настоящего изобретения предпочтительной является вакцинация /обработка животных возрастом 3 недели или менее. Кроме того, титры антител к PCV2, превышающие 1:1000, предпочтительно не оказывают влияния на эффективность вакцины против PCV2 вне зависимости от величины существующего начального титра антител. Например, вакцинация имеющих высокие титры животных (титр антител к PCV2 $> 1:1000$) предпочтительно приводит к укороченной продолжительности виремии, более раннему окончанию виремии, уменьшению количества дней, в которые были получены положительные в отношении виремии образцы, и к снижению суммы геномных эквивалентов/мл по сравнению с невакцинированным контрольными животными. При сравнении вакцинированных животных с «высокими», «средними» и «низкими» титрами предпочтительно не обнаружено существенной разницы в различных параметрах связанной с PCV2 виремии. Кроме того, в присутствии высоких титров антител к PCV2 полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, примененный для вакцинации, предпочтительно еще может существенно снижать виремию в крови (окончание виремии, продолжительность виремии, вирусная нагрузка). Предпочтительно не обнаружено никаких различий в живой массе тела при сравнении животных в вакцинированных группах, имеющих низкие и высокие титры. Кроме того, у вакцинированных животных с высоким титром ($> 1:1000$) антител к PCV2 в момент вакцинации/обработки предпочтительно также обнаружен существенно больший вес тела после начала виремии по сравнению с

обработанными плацебо животными с начальными высокими титрами. Таким образом, согласно предпочтительному объекту изобретения возможна вакцинация/обработка животных возрастом 1 день или старше полипептидом, предлагаемым в настоящем изобретении. Однако вакцинацию следует

осуществлять в течение первых 8, предпочтительно первых 7 недель жизни. Таким образом, еще одним объектом настоящего изобретения является способ лечения или предупреждения заражения PCV2 или снижения клинических признаков, вызываемых или ассоциированных с заражением PCV2, у животных, заключающийся в том, что осуществляют стадию, на которой животному, которое нуждается в таком лечении, предпочтительно в возрасте 1 день или старше, но не старше 8 недель, вводят в эффективном количестве полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении. Согласно предпочтительному варианту осуществления изобретения требуется менее 20 мкг полипептида, предлагаемого в настоящем изобретении/дозу для придания иммунитета такому животному.

Согласно более предпочтительному варианту осуществления изобретения полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, предпочтительно в количестве менее 20 мкг/дозу, вводят только один раз животному, которое нуждается в таком лечении.

Следующим более общим объектом настоящего изобретения является способ лечения или предупреждения заражения PCV2 или снижения клинических признаков, вызываемых или ассоциированных с заражением PCV2, у молодых животных, заключающийся в том, что осуществляют стадию, на которой животному, которое нуждается в таком лечении, вводят в эффективном количестве полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении.

Понятие «молодое животное» в контексте настоящего описания относится к животному возрастом от 1 до 22 дней. Предпочтительно под понятием молодое животное подразумевают животное возрастом от 1 до 20 дней. Более предпочтительно под понятием молодое животное подразумевают животное возрастом от 1 до 15 дней, еще более предпочтительно возрастом от 1 дня до 14 дней, еще более предпочтительно возрастом от 1 до 12 дней, еще более предпочтительно возрастом от 1 до 10 дней, еще более предпочтительно возрастом от 1 до 8 дней, еще более предпочтительно возрастом от 1 до 7 дней, еще более предпочтительно возрастом от 1 до 6 дней, еще более

предпочтительно возрастом от 1 до 5 дней, еще более предпочтительно
возрастом от 1 до 4 дней, еще более предпочтительно возрастом от 1 до 3 дней,
еще более предпочтительно возрастом от 1 до 2 дней, наиболее предпочтительно
животное возрастом 1 день. Таким образом, еще одним объектом настоящего
5 изобретения является способ лечения или предупреждения заражения PCV2 или
снижения клинических признаков, вызываемых или ассоциированных с
заражением PCV2, у молодых животных, заключающийся в том, что
осуществляют стадию, на которой вводят в эффективном количестве
полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, животному, которое
10 нуждается в таком лечении, возрастом 1-22 дня, предпочтительно возрастом 1-20
дней, более предпочтительно возрастом 1-15 дней, еще более предпочтительно
возрастом 1-14 дней, еще более предпочтительно возрастом 1-12 дней, еще более
предпочтительно возрастом 1-10 дней, еще более предпочтительно возрастом 1-8
дней, еще более предпочтительно возрастом 1-7 дней, еще более
15 предпочтительно возрастом 1-6 дней, еще более предпочтительно возрастом 1-15
дней, еще более предпочтительно возрастом 1-4 дня, еще более предпочтительно
возрастом 1-3 дня, еще более предпочтительно возрастом 1 или 2 дня, наиболее
предпочтительно возрастом 1 день. Например, установлено, что
вакцинация/обработка, которую проводят в возрасте от 19 до 22 дней,
20 предпочтительно является высокоэффективной вакцинацией. Кроме того,
установлено, что вакцинация/обработка, которую проводят в возрасте от 12 до
18 дней, предпочтительно от 12 до 14 дней, предпочтительно является очень
эффективной в отношении снижения клинических признаков, ассоциированных
с заражением PCV2, снижения общей вирусной нагрузки, снижения
25 продолжительности виремии, замедления начала виремии, прироста массы.
Кроме того, вакцинация, которую проводят в возрасте 1 неделя,
предпочтительно является очень эффективной в отношении снижения
клинических признаков, ассоциированных с заражением PCV2, снижения общей
вирусной нагрузки, снижения продолжительности виремии, замедления начала
30 виремии, прироста массы. Предпочтительно для придания иммунитета
указанным молодым животным требуется менее 20 мкг полипептида,
предлагаемого в настоящем изобретении/дозу. Таким образом, согласно более
предпочтительному варианту осуществления изобретения полипептид,

предлагаемый в изобретении, вводят предпочтительно в количестве менее 20 мкг только один раз указанному молодому животному, которое нуждается в таком лечении.

Из-за повсеместного распространения PCV2 в полевых условиях бóльшая часть молодых поросят является серопозитивной в отношении PCV2. Таким образом, еще одним объектом настоящего изобретения является способ лечения или предупреждения заражения PCV2 или снижения клинических признаков, вызываемых или ассоциированных с заражением PCV2, предпочтительно у животных, которые имеют антитела к PCV2 в день вакцинации, заключающийся в том, что осуществляют стадию, на которой животному возрастом 1-22 дня, предпочтительно возрастом 1-20 дней, более предпочтительно возрастом 1-15 дней, еще более предпочтительно возрастом 1-14 дней, еще более предпочтительно возрастом 1-12 дней, еще более предпочтительно возрастом 1-10 дней, еще более предпочтительно возрастом 1-8 дней, еще более предпочтительно возрастом 1-7 дней, еще более предпочтительно возрастом 1-6 дней, еще более предпочтительно возрастом 1-5 дней, еще более предпочтительно возрастом 1-4 дня, еще более предпочтительно возрастом 1-3 дня, еще более предпочтительно возрастом 1 или 2 дня, наиболее предпочтительно возрастом 1 день, которое нуждается в таком лечении, вводят в эффективном количестве полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении. Предпочтительно указанное молодое животное в день вакцинации/обработки имеет выявляемый титр антител к PCV2 вплоть до 1:100, предпочтительно превышающий 1:100, еще более предпочтительно превышающий 1:250, еще более предпочтительно превышающий 1:500, еще более предпочтительно 1:640, еще более предпочтительно превышающий 1:750, наиболее предпочтительно превышающий 1:1000. Предпочтительно для придания иммунитета указанным молодым животным требуется менее 20 мкг полипептида, предлагаемого в настоящем изобретении/дозу. Таким образом, согласно более предпочтительному варианту осуществления изобретения полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, вводят предпочтительно в количестве менее 20 мкг только один раз указанному молодому животному, которое нуждается в таком лечении.

Как описано выше, вакцинация/лечение молодых животных полипептидом, предлагаемым в настоящем изобретении, приводит к укорочению фазы виремии по сравнению с невакцинированными контрольными животными. Среднее укорочение времени составляет 9,5 дня по сравнению с невакцинированными контрольными животными этого же вида. Таким образом, еще одним объектом настоящего изобретения является также способ лечения или предупреждения заражения PCV2 или снижения клинических признаков, вызываемых или ассоциированных с заражением PCV2, у молодых животных, заключающийся в том, что осуществляют стадию, на которой вводят в эффективном количестве полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, животному, которое нуждается в таком лечении, при этом лечение или предупреждение приводит к укорочению фазы виремии на 5 или более дней, предпочтительно на 6 или более дней, еще более предпочтительно на 7 или более дней, еще более предпочтительно на 8 или более дней, еще более предпочтительно на 9 дней, еще более предпочтительно на 10 дней, еще более предпочтительно на 12 дней, еще более предпочтительно на 14 дней, наиболее предпочтительно более чем на 16 дней, по сравнению с животными этого же вида из необработанной контрольной группы. В некоторых случаях фаза виремии укорачивается более чем на 20 дней. В целом, вакцинация молодых поросят приводит к снижению потери прироста массы, укорочению продолжительности виремии, более раннему окончанию виремии и пониженной вирусной нагрузке. Таким образом, еще одним объектом настоящего изобретения является также способ лечения или предупреждения заражения PCV2 или снижения клинических признаков, вызываемых или ассоциированных с заражением PCV2, у молодых животных, заключающийся в том, что осуществляют стадию, на которой животному, которое нуждается в таком лечении, вводят в эффективном количестве полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, при этом лечение или предупреждение заражения PCV2 приводит к улучшению по сравнению с животными этих же видов из необработанной контрольной группы параметра эффективности, выбранного из группы, включающей снижение потери прироста массы, укорочение продолжительности виремии, более раннее окончание виремии, понижение вирусной нагрузки или их комбинации. Предпочтительно требуется менее 20 мкг полипептида, предлагаемого в настоящем изобретении,

на дозу для повышения указанного выше параметра эффективности вакцины. Кроме того, для достижения повышения указанного выше параметра эффективности вакцины требуется только однократное введение одной дозы.

Понятие «эффективное количество» в контексте настоящего описания означает (но, не ограничиваясь только указанным) количество полипептида, предлагаемого в настоящем изобретении, которое вызывает или может вызывать иммунный ответ у животного, которому вводят полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, в эффективной дозе. Предпочтительно эффективное количество означает количество полипептида, предлагаемого в настоящем изобретении, при использовании которого продолжительность иммунитета (DOI) составляет примерно 10 недель, предпочтительно DOI составляет по меньшей мере 12 недель, более предпочтительно DOI составляет по меньшей мере 15 недель, наиболее предпочтительно DOI составляет по меньшей мере 20 недель.

Эффективное количество зависит от ингредиентов вакцины и схемы введения. Как правило, когда в комбинированной вакцине применяют препарат инактивированного вируса или модифицированного живого вируса, то вакцину применяют в количестве, соответствующем от примерно $10^{2,0}$ до примерно $10^{9,0}$ TCID₅₀ на дозу, предпочтительно от примерно $10^{3,0}$ до примерно $10^{8,0}$ TCID₅₀ на дозу, более предпочтительно от примерно $10^{4,0}$ до примерно $10^{8,0}$ TCID₅₀ на дозу. В частности, когда в вакцинах применяют модифицированный живой PCV2, то рекомендованная для введения чувствительному животному доза составляет предпочтительно от примерно $10^{3,0}$ TCID₅₀ (средняя цитопатогенная доза, инфицирующая 50% клеток)/дозу до примерно $10^{6,0}$ TCID₅₀/дозу и более предпочтительно от примерно $10^{4,0}$ TCID₅₀/дозу до примерно $10^{5,0}$ TCID₅₀/дозу. В целом, количество антигена должно составлять от примерно 0,2 до 5000 мкг и от $10^{2,0}$ до $10^{9,0}$ TCID₅₀, предпочтительно от $10^{3,0}$ до $10^{6,0}$ TCID₅₀, более предпочтительно от $10^{4,0}$ до $10^{5,0}$ TCID₅₀, при применении очищенного антигена.

Субъединичные вакцины, как правило, вводят с уровнем включения белка, составляющим по меньшей мере 0,2 мкг белка на дозу, предпочтительно от примерно 0,2 до примерно 400 мкг/дозу, еще более предпочтительно от примерно 0,3 до примерно 200 мкг/дозу, еще более предпочтительно от примерно 0,35 до примерно 100 мкг/дозу, еще более предпочтительно от

примерно 0,4 до примерно 50 мкг/дозу, еще более предпочтительно от примерно 0,45 до примерно 30 мкг/дозу, еще более предпочтительно от примерно 0,5 до примерно 18 мкг/дозу, еще более предпочтительно от примерно 0,6 до примерно 16 мкг/дозу, еще более предпочтительно от примерно 0,75 до примерно 8 мкг/дозу, еще более предпочтительно от примерно 1,0 до примерно 6 мкг/дозу, еще более предпочтительно от примерно 1,3 до примерно 3,0 мкг/дозу.

Предпочтительно профилактическое применение описанных выше иммуногенных композиций является эффективным в отношении снижения клинических признаков, вызываемых или ассоциированных с заражением PCV2, предпочтительно у молодых животных и/или у животных, имеющих пассивный иммунитет против PCV2 в день обработки. В частности, профилактическое применение описанных выше иммуногенных композиций, и в частности композиций, содержащих полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, предпочтительно является эффективным в отношении снижения лимфаденопатии, лимфоидного истощения и/или уменьшения количества многоядерных/гигантских гистиоцитов у животных, зараженных PCV2 и имеющих полученные от матери антитела к PCV-2, в день обработки/вакцинации. В частности, как указано в настоящем описании, профилактическое применение иммуногенных композиций, предлагаемых в изобретении, является эффективным в отношении снижения лимфоидного истощения, лимфоидного воспаления, положительной ИГХ-оценки в отношении антигена PCV2 в лимфоидной ткани, виремии, выделений из носа, пирексии, пониженного усредненного суточного прибавления массы, воспаления легких, положительной ИГХ-оценки в отношении антигена PCV2 в легочной ткани.

Кроме того, профилактическое применение иммуногенных композиций, указанных в настоящем описании, предпочтительно является эффективным в отношении уменьшения таких показателей, как (1) интерстициальная пневмония, сопровождающаяся интерглобулярным отеком, (2) бледность кожи или желтуха новорожденных, (3) пятнистая атрофия печени, (4) язва желудка, (5) нефрит и (6) репродуктивные нарушения, такие, например, как выкидыш, мертворождение, высыхание плода в матке и т.д., (7) Pia-подобные повреждения, как правило, ассоциированные с заражением *Lawsonia intracellularis* (илеит), (8) лимфаденопатия, (9) лимфоидное истощение и/или (10) уровень

многоядерных/гигантских гистиоцитов, (11) синдром свиного дерматита и нефропатии (PDNS), (12) ассоциированная с PCVAD смертность, (13) ассоциированная с PCVAD потеря массы, (14) относительная вариабельность роста, (15) пониженная частота появления «карликовых» животных, (16) пониженное совместное заражение комплексом возбудителей репродуктивно-респираторного синдрома свиней (PRRSV). Указанная иммуногенная композиция обладает эффективностью также в отношении повышения экономической важности параметров роста, таких как время до убоя, масса мясной туши, относительное содержание тощей массы. Таким образом, понятие «клинические признаки» в контексте настоящего описания означают (но, не ограничиваясь только ими) (1) интерстициальную пневмонию, сопровождающуюся интерглобулярным отеком, (2) бледность кожи или желтуху новорожденных, (3) пятнистую атрофию печени, (4) язву желудка, (5) нефрит и (6) репродуктивные нарушения, такие, например, как выкидыш, мертворождение, высыхание плода в матке и т.д., (7) Pia-подобные повреждения, как правило, ассоциированные с заражением *Lawsonia intracellularis* (илеит), (8) лимфаденопатию, (9) лимфоидное истощение и/или (10) уровень многоядерных/гигантских гистиоцитов, (11) синдром свиного дерматита и нефропатии (PDNS), (12) ассоциированную с PCVAD смертность, (13) ассоциированную с PCVAD потерю массы, (14) относительную вариабельность роста, (15) пониженную частоту появления «карликовых» животных, (16) пониженное совместное заражение комплексом возбудителей репродуктивно-респираторного синдрома свиней (PRRSV), (17) лимфоидное воспаление, (18) положительную ИГХ-оценку в отношении антигена PCV2 в лимфоидной ткани, (19) виремию, (20) выделения из носа, (21) пирексию, (22) пониженное усредненное суточное прибавление массы, (23) воспаление легких, (24) положительную ИГХ-оценку в отношении антигена PCV2 в легочной ткани. Кроме того, иммуногенная композиция, представленная в настоящем описании, снижает общую нагрузку цирковируса, включая более позднее начало, укороченную продолжительность и более раннее окончание виремии, а понижение вирусной нагрузки и ее иммуносупрессорного действия на молодых животных, в частности имеющих антитела к PCV2 в день вакцинации, приводит

к более высокому уровню общей устойчивости к заболеванию и снижению случаев ассоциированных с PCV2 заболеваний и клинических признаков.

Таким образом, еще одним объектом изобретения является способ лечения или предупреждения заражения PCV2 или снижения клинических признаков, вызываемых или ассоциированных с заражением PCV2, у молодых животных и/или у животных, которые предпочтительно имеют антитела к PCV2, заключающийся в том, что осуществляют стадию, на которой вводят в эффективном количестве полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, или иммуногенную композицию, содержащую полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, животному, которое нуждается в таком лечении, где клинические признаки выбирают из группы, включающей: (1) интерстициальную пневмонию, сопровождающуюся интерглобулярным отеком, (2) бледность кожи или желтуху новорожденных, (3) пятнистую атрофию печени, (4) язву желудка, (5) нефрит и (6) репродуктивные нарушения, такие, например, как выкидыш, мертворождение, высыхание плода в матке и т.д., (7) P1a-подобные повреждения, как правило, ассоциированные с заражением *Lawsonia intracellularis* (илеит), (8) лимфаденопатию, (9) лимфоидное истощение и/или (10) уровень многоядерных/гигантских гистиоцитов, (11) синдром свиного дерматита и нефропатии (PDNS), (12) ассоциированную с PCVAD смертность, (13) ассоциированную с PCVAD потерю массы, (14) относительную вариабельность роста, (15) пониженную частоту появления «карликовых» животных, (16) пониженное совместное заражение комплексом возбудителей репродуктивно-респираторного синдрома свиней (PRRSV), (17) лимфоидное воспаление, (18) положительную ИГХ-оценку в отношении антигена PCV2 в лимфоидной ткани, (19) виремию, (20) выделения из носа, (21) пирексию, (22) пониженное усредненное суточное прибавление массы, (23) воспаление легких, (24) положительную ИГХ-оценку в отношении антигена PCV2 в легочной ткани. Таким образом, следующим объектом настоящего изобретения является способ лечения или предупреждения заражения PCV2 или снижения клинических признаков, вызываемых или ассоциированных с заражением PCV2, у молодых животных, заключающийся в том, что осуществляют стадию, на которой вводят в эффективном количестве полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, животному, которое нуждается в таком лечении, где указанные клинические

признаки выбирают из группы, включающей: (1) интерстициальную пневмонию, сопровождающуюся интерглобулярным отеком, (2) бледность кожи или желтуху новорожденных, (3) пятнистую атрофию печени, (4) язву желудка, (5) нефрит и (6) репродуктивные нарушения, такие, например, как выкидыш, мертворождение, высыхание плода в матке и т.д., (7) Pia-подобные повреждения, как правило, ассоциированные с заражением *Lawsonia intracellularis* (илеит), (8) лимфаденопатию, (9) лимфоидное истощение и/или (10) уровень многоядерных/гигантских гистиоцитов, (11) синдром свиного дерматита и нефропатии (PDNS), (12) ассоциированную с PCVAD смертность, (13) ассоциированную с PCVAD потерю массы, (14) относительную вариабельность роста, (15) пониженную частоту появления «карликовых» животных, (16) пониженное совместное заражение комплексом возбудителей репродуктивно-респираторного синдрома свиней (PRRSV), (17) лимфоидное воспаление, (18) положительную ИГХ-оценку в отношении антигена PCV2 в лимфоидной ткани, (19) виремию, (20) выделения из носа, (21) пирексию, (22) пониженное усредненное суточное прибавление массы, (23) воспаление легких, (24) положительную ИГХ-оценку в отношении антигена PCV2 в легочной ткани.

Композицию, предлагаемую в изобретении, можно вводить орально, внутривенно, внутритрахеально или интраназально. Предпочтительно композицию следует вводить внутримышечно или интраназально, наиболее предпочтительно внутримышечно. Может оказаться предпочтительным вводить описанные выше фармацевтические композиции в организм животного внутривенно или путем инъекции непосредственно в ткани-мишени. Для системного введения предпочтительными являются внутривенный, внутрисосудистый, внутримышечный, интраназальный, внутриартериальный, внутрибрюшинный, оральный или внутриоболочечный пути введения. Более локальное введение можно осуществлять подкожно, интрадермально, внутривенно, внутрисердечно, внутридольково, интрамедуллярно, внутрилегочно или непосредственно в ткань, подлежащую обработке, или в близлежащую область (соединительная, костная, мышечная, нервная, эпителиальная ткань). В зависимости от требуемой продолжительности и эффективности лечения композиции, предлагаемые в изобретении, можно вводить один или несколько раз, а также периодически, например, с интервалом

один день в течение нескольких дней, недель или месяцев или с использованием различных доз.

Предпочтительно одну дозу описанной выше иммуногенной композиции вводят внутримышечно индивидууму, нуждающемуся в этом. Еще одним объектом изобретения является полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, или иммуногенная композиция, содержащая любой полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, который представлен в настоящем описании, которую фасуют в пузырьки и вводят из расчета один (1) мл на дозу. Таким образом, еще одним объектом настоящего изобретения является

5 иммуногенная композиция объемом 1 мл, которая содержит полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, который указан в настоящем описании, предназначенная для лечения или предупреждения заражения PCV2 или

10 снижения клинических признаков, вызываемых или ассоциированных с заражением PCV2, у молодых животных, заключающегося в том, что осуществляют стадию, на которой вводят в эффективном количестве

15 полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, животному, которое нуждается в таком лечении. Таким образом, еще одним объектом настоящего изобретения является также иммуногенная композиция объемом 1 мл, которая содержит полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, который указан

20 в настоящем описании, предназначенная для лечения или предупреждения заражения PCV2 или снижения клинических признаков, вызываемых или ассоциированных с заражением PCV2, у животных, которые имеют антитела к PCV2, заключающегося в том, что осуществляют стадию, на которой вводят в

25 эффективном количестве полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, или иммуногенной композиции, содержащей полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, животному, которое нуждается в таком лечении.

Таким образом, еще одним объектом изобретения является по меньшей мере одно дополнительное введение одной дозы иммуногенной композиции, описанной выше, животному, которое нуждается в этом, где второе или любое

30 дополнительное введение осуществляют по меньшей мере через 14 дней после первого или любого другого предыдущего введения. Предпочтительно иммуногенную композицию вводят в сочетании с агентом, стимулирующим иммунитет. Предпочтительно указанный агент, стимулирующий иммунитет,

вводят по меньшей мере дважды. Предпочтительно между первым и вторым или любым следующим введением агента, стимулирующего иммунитет, должно пройти по меньшей мере 3 дня, более предпочтительно по меньшей мере 5 дней, еще более предпочтительно по меньшей мере 7 дней. Предпочтительно агент, стимулирующий иммунитет, вводят по меньшей мере через 10 дней, предпочтительно 15 дней, еще более предпочтительно 20 дней, еще более предпочтительно по меньшей мере 22 дня, после первоначального введения иммуногенной композиции, предлагаемой в изобретении. Предпочтительным агентом, стимулирующим иммунитет, является, например, гемоцианин лимфы улитки (KLH), предпочтительно эмульгированный с неполным адъювантом Фрейнда (KLH/ICFA). Однако, как должно быть очевидно, можно применять любой другой агент, стимулирующий иммунитет, известный специалисту в данной области. Понятие «агент, стимулирующий иммунитет» в контексте настоящего описания относится к любому агенту, который может «запускать» иммунный ответ, предпочтительно без инициации или повышения специфического иммунного ответа, например, иммунного ответа на специфический патоген. Кроме того, принято вводить агент, стимулирующий иммунитет, в приемлемой дозе.

20 Подробное описание предпочтительных вариантов осуществления изобретения

Ниже в примерах представлены предпочтительные материалы и процедуры, применяемые в настоящем изобретении. Хотя при воплощении на практике и проверке настоящего изобретения можно применять любые методы и материалы, аналогичные или эквивалентные представленным в настоящем описании, ниже описаны предпочтительные методы, устройства и материалы. Однако следует понимать, что эти примеры даны только с целью иллюстрации и не направлены на ограничение общего объема изобретения.

Пример 1

Материалы и процедура/конструирование мутантов

30 Аминокислотную последовательность OPC2 PCV2a белка OPC2 PCV2, включенную в продукт CIRCOFLEX®, выравнивали с аминокислотной последовательностью OPC2 штамма PCV2b BDH и несколькими другими опубликованными аминокислотными последовательностями OPC2 PCV2a и

PCV2b из Genbank, применяя метод Clustal W. Положения основных аминокислотных различий между последовательностями OPC2 PCV2a и PCV2b идентифицировали в качестве потенциальных положений, которые можно подвергать мутациям (см. фиг. 1). Используя идентифицированные основные изменения аминокислот, получали семь кодирующих последовательностей OPC2 PCV2b с заменами аминокислот из OPC2 штамма PCV2b BDH на соответствующие аминокислоты из OPC2 PCV2a. Кодоны OPC2 PCV2a (CIRCOFLEX®) применяли для того, чтобы кодировать мутантные аминокислоты. Ниже подробно описаны семь мутантных конструкций OPC2 PCV2b:

1. OPC2 PCV2b BDH K59A;
2. OPC2 PCV2b BDH R63T;
3. OPC2 PCV2b BDH R63K;
4. OPC2 PCV2b BDH SFCO P88K T151P**;
5. OPC2 PCV2b BDH G191R;
6. OPC2 PCV2b BDH I206K;
7. OPC2 PCV2b BDH N232E.

Все кодирующие последовательности синтезировали на фирме Integrated DNA Technologies, за исключением конструкции №4, которую создавали путем сайтнаправленного мутагенеза синтезированной кодирующей последовательности OPC2 PCV2b BDH SFCO.

** SFCO обозначает кодоны, оптимизированные для *Spodoptera frugiperda*. Указанную конструкцию создавали перед описанной выше процедурой сравнительного анализа первичной структуры, путем предварительной оценки последовательностей. При оценке указанной последовательности идентифицировано также две мутации.

Получение содержащего мутантную OPC2 PCV2b бакуловируса

Каждую из семи мутантных кодирующих последовательностей OPC2 PCV2b, а также немутантную кодирующую последовательность OPC2 штамма PCV2b BDH клонировали в бакуловирусном вирусе-переносчике pVL1393 и совместно трансфецировали с бакуловирусной ДНК Sf9-клетки. Каждый образовавшийся рекомбинантный бакуловирол проверяли в отношении экспрессии OPC2 PCV2b с помощью IFA. Амплифицированные штаммы каждого

рекомбинантного бакуловируса получали на Sf⁺-клетках и титровали, применяя метод определения титра бакуловируса на основе величины TCID₅₀.

Оценка экспрессии мутантных OPC2 PCV2b в бакуловирусе

Каждый рекомбинантный бакуловирс оценивали в отношении экспрессии кодирующей последовательности OPC2 PCV2b путем заражения Sf⁺-клеток при заданном значении MOI, составляющим 0,1. Инфекциям давали развиваться в течение 5 – 7 дней, после чего продукт собирали путем центрифугирования при 20000g в течение 20 мин для удаления клеточного дебриса и нерастворимого белка. Собранные супернатанты фильтровали через фильтр с размером пор 0,2 мкм и оценивали непосредственно экспрессию OPC2 PCV2b с помощью вестерн-блоттинга, используя антитела к PCV2 (см., например, фиг. 2). Собранные супернатанты оценивали также в отношении присутствия макромолекулярных структур. В целом, метод состоял в следующем: образец каждого собранного супернатанта центрифугировали при 100000g в течение 2 ч. Образовавшийся дебрис ресуспендировали в небольшом объеме TBS и разделяли с помощью ДСН-ПААГ. Полосы, соответствующие OPC2 PCV2b, обнаруживали в окрашенных гелях путем сравнения размеров с OPC2 PCV2a (см., например, фиг. 3). Ресуспендированный дебрис разделяли в непрерывном градиенте от 10% до 60% сахарозы путем центрифугирования при 100000g в течение 2 ч для частичной очистки белков OPC2 PCV2b с целью количественной оценки и подтверждения образованием ВПЧ с помощью электронной микроскопии (ЭМ) (см., например, фиг. 4).

После разделения в градиенте сахарозы содержащие OPC2 PCV2b фракции объединяли и концентрацию OPC2 PCV2b определяли с помощью денситометрии геля после осуществления ДСН-ПААГ в сравнении со стандартной кривой, построенной для БСА. Кроме того, образец продукта, очищенного с помощью градиента сахарозы, дополнительно концентрировали для подтверждения образованием ВПЧ с помощью ЭМ, используя фосфоровольфрамую кислоту для негативного окрашивания (см., например, фиг. 5).

Таблица результатов, полученных при оценке мутантных конструкций OPC2 PCV2b BDH, представлены на фиг. 6. Результаты продемонстрировали, что единичная аминокислотная мутация, приводящая к замене аргинина на

треонин в положении 63, повышала уровень экспрессии OPC2 PCV2b BDH в Sf⁺-клетках почти в 10 раз. Единичная мутация R63T повышала уровень экспрессии OPC2 PCV2b BDH в Sf⁺-клетках до уровня, сходного с OPC2 PCV2a. Анализ аминокислотной последовательности OPC2 PCV2b BDH позволил предположить, что ВС-петля может обладать чувствительностью к расщеплению напоминающими трипсин протеазами. Структурные данные, опубликованные Khayat и др., в 2011 г., позволяют предположить, что аргинин в положении 63 на ВС-петле наиболее далеко выступает из капсида вируса PCV2, образованного белком OPC2, оставляя его чувствительным в протезам, которые высвобождаются после лизиса Sf⁺-клеток в процессе размножения бакуловируса.

Помимо замены на треонин в положении 63, в другом варианте осуществления изобретения аргинин заменяют на другие незаряженные полярные аминокислоты, включая серин, тирозин, аспарагин и глутамин, с получением такого же стабилизирующего действия. Кроме того, для получения такого же действия можно применять неполярные аминокислоты, включая глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин, фенилаланин и триптофан.

Пример 2

В данном эксперименте продемонстрирована эффективность одного из варианта вакцины на основе OPC2b свиного цирковируса типа 2 против контрольного заражения PCV2a и/или PCV2b. В этом опыте применяли родившихся с помощью кесарева сечения поросят с недостатком молозива (CDGD), которых разделяли на 2 группы; 1) поросят, вакцинированные экспериментальной вакциной на основе свиного цирковируса, включающей вариант OPC2 PCV2b R63T, описанный в примере 1 (убитый бакуловирусный вектор), которых подвергали контрольному заражению вирулентным PCV2b, и 2) невакцинированные подвергнутые контрольному заражению контрольные поросят, для контрольного заражения которых применяли вирулентный PCV2b. В день 0 группе 1 вводили внутримышечно (IM) 1 мл вакцины, а группа 2, т.е. невакцинированные подвергнутые контрольному заражению контрольные поросят, не получали никакой обработки. В день 28 всех поросят из групп 1 и 2 подвергали контрольному заражению 1 мл вирулентного PCV2b, который вводили интраназально (IN), и IM-вводили 1 мл дозы, примерно соответствующей 3,0 Log₁₀TCID₅₀/мл живого вируса. Всех поросят

обрабатывали IM 2,0 мл гемоцианина лимфы улитки, эмульгированного в неполном адьюванте Фрейнда (KLH/ICFA), в дни 25 и 31. Осуществляли ежедневный мониторинг поросят в отношении клинических признаков, и периодически отбирали образцы крови для серологического тестирования. В день 56 осуществляли аутопсию всех поросят и требуемые ткани собирали и подвергали обследованию в отношении макроскопической патологии.

В целом, у вакцинированных животных обнаружено уменьшение всех протестированных параметров по сравнению с соответствующими подвергнутыми контрольному заражению контрольными группами.

Пример 3

Получали несколько других замен в аминокислотном положении 63 для сравнения с OPC нативного штамма PCV2b BDH. Результаты оценки мутантных конструкций OPC2 PCV2b BDH представлены на фиг. 7А и 7Б. Результаты продемонстрировали, что добавление к аминокислотной мутации, приводящей к замене аргинина (R) на треонин (T) в положении 63, аргинина (R) 63 на глицин (G), аргинина (R) 63 на глутамин (Q) и аргинина (R) 63 на аспарат (D), повышали уровень экспрессии OPC2 PCV2b BDH в Sf⁺-клетках по меньшей мере в 4 раза по сравнению с диким типом. В частности, единичные мутации R63G и R63Q повышали уровень экспрессии OPC2 PCV2b BDH в Sf⁺-клетках до уровней, сходных с уровнями OPC2 PCV2a.

Создание рекомбинантного бакуловируса, кодирующего мутанты OPC2 PCV2b R63

Создавали точечные мутации в кодирующей последовательности OPC2 PCV2b в аминокислотном положении 63 с помощью сайтнаправленного мутагенеза. В целом, метод состоял в следующем: плазмиду-переносчик бакуловируса pVL1393-OPC2 PCV2b подвергали сайтнаправленному мутагенезу с использованием праймеров, представленных в таблице 1. Полученные бакуловирусные векторы-переносчики секвенировали для подтверждения правильной мутации кодирующей последовательности, а затем Sf9-клетки совместно трансфецировали с линейаризованной ДНК бакуловируса. Продукты совместной трансфекции собирали через 5 дней и оценивали в отношении экспрессии OPC2 PCV2b с помощью IFA, используя PCV2-специфические антитела. Амплифицированные штаммы каждого бакуловируса создавали на Sf9-

клетках и титровали, применяя метод IFA для определения титра бакуловируса на основе величины TCID₅₀, используя моноклональное антитело к gp64 α-бакуловируса.

Таблица 1. Праймеры для сайтнаправленного мутагенеза

Праймер	Последовательность
Прямой	5'-СТГТСААГААААССАСAGTCX ¹ X ² X ³ ACGCCCTCCTGGAATGTG-3'
Обратный	Обратный комплемент прямого праймера

Мутация	X ¹	X ²	X ³
R63D	G	A	C
R63Q	C	A	G
R63G	G	G	A
R63L	T	T	G
R63T	A	C	A

Экспрессия и количественная оценка ВПЧ, включающих OPC2 PCV2b

SF⁺-клетки заражали во вращающихся колбах рекомбинантным бакуловирусом при значении MOI, составляющим 0,1, и инкубировали при 27°C при постоянном перемешивании примерно при 100 об/мин. Зараженные культуры собирали, когда жизнеспособность SF⁺-клеток падала ниже 30% или через 7 дней после заражения. Сырые сборы бакуловируса центрифугировали при 20000g в течение 20 мин при 4°C для получения клеточных пеллетов и нерастворимого дебриса, а затем фильтровали через фильтр с размером пор 0,2 мкм. Осветленные жидкие сборы бакуловируса (35 мл) подвергали центрифугированию при относительной центробежной силе (RCF) 100000g в течение 2 ч при 4°C для пеллетирования ВПЧ, включающих OPC2 PCV2b. Образовавшиеся пеллеты ресуспендировали в TBS и затем разделяли с помощью непрерывного градиента от 10% до 60% сахарозы при RCF 100000g в течение 2 ч при 4°C. Фракции, содержащие главным образом OPC2 PCV2b по данным ДСН-ПААГ и вестерн-блоттинга с использованием антител к α-PCV2, объединяли и оценивали с помощью денситометрии. В целом, метод состоял в следующем: объединенные содержащие OPC2 PCV2b фракции разделяли с помощью ДСН-ПААГ и окрашивали красителем SIMPLYBLUE™ Safe. Собирали изображения гелей и анализировали с использованием камеры Alpha View и программного обеспечения. Массу полос, соответствующих OPC2 PCV2b, рассчитывали с использованием стандартной кривой, построенной для БСА, который включали в

каждый гель. Концентрацию OPC2 PCV2b пула рассчитывали путем деления массы полосы(с) OPC2 PCV2b на общий объем образца, загруженного в гель. Концентрации OPC2 PCV2b в собранном материале рассчитывали путем умножения концентрации OPC2 PCV2b в пуле на объем пула и последующего деления полученного результата на объем собранных жидкостей, применяемых для центрифугирования.

Пример 4

В данном эксперименте изучали эффективность прототипической вакцины на основе OPC2b свиного цирковируса типа 2 (включающей рекомбинантный бакуловирус, экспрессирующий белок OPC2 PCV2b, имеющий SEQ ID NO: 1) в отношении контрольного заражения PCV2b, которому подвергали поросят трехнедельного возраста.

Сорок два здоровых CDCD-поросенка (по X поросят из каждого X приплода и X поросят из каждого X приплода) разделяли на группы и распределяли по шести боксам. Поросят в каждом боксе произвольно разделяли на одну из пяти групп обработки: группа 1 (строгие отрицательные контроли), состоящие из X поросят, которые не получали никакой обработки, группа 2 (контроли, которых подвергали контрольному заражению, $n=X$), которые не получали никакой обработки, группа 3 (экспериментальная вакцина на основе PCV2b, содержащего SEQ ID NO: 1 + карбопол, $n=X$), группа 4 (экспериментальная вакцина на основе PCV2b, содержащего SEQ ID NO: 1 + адъювант ISA207VG, $n=X$). Обзор групп обработки представлен в таблице 2.

Таблица 2:

Группа	Кол-во поросят	Обработка	День 0	День 11 и день 17	День 14	День 42
1	≥5	Строгий отрицательный контроль	n/a	n/a	Аутопсия	n/a
2	≥20	Контроль, подвергнутый контрольному заражению	n/a	Обработка KLH/ICFA	Контрольное заражение PCV2b	Аутопсия
3	≥20	Белок OPC2 PCV2b + карбопол	Вакцинация	Обработка KLH/ICFA	Контрольное заражение PCV2b	Аутопсия
4	≥20	Белок OPC2 PCV2b + ISA207VG	Вакцинация	Обработка KLH/ICFA	Контрольное заражение PCV2b	Аутопсия
5	≥20	Белок OPC2 PCV2a/PCV2b + карбопол	Вакцинация	Обработка KLH/ICFA	Контрольное заражение PCV2b	Аутопсия

В день D0 поросята имели возраст 24 дня и группе 3 поросят вводили внутримышечно (IM) составляющую 1 мл дозу вакцины. В дни D11 и D17 всем поросятам вводили внутримышечно (IM) составляющую 2,0 мл дозу KLH/ICFA. В день D14 всех поросят подвергали контрольному заражению, используя дозу 1,0 мл, соответствующую примерно $5,0 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{мл}$ живого вирулентного PCV2b, которую вводили IM в правую область шеи, и дозу 1,0 мл, которую вводили в нос. Общее состояние здоровья поросят оценивали ежедневно.

Образцы крови собирали в дни D-4, D14, D21, D28, D33 и D42 и тестировали сыворотку в отношении PCV2-виремии с помощью количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени во все дни за исключением дня -4. У вакцинированных животных обнаружена существенно пониженная виремия и пониженные клинические симптомы или их отсутствие по сравнению с невакцинированными животными после контрольного заражения PCV2b.

В контексте изобретения и представленных экспериментальных данных принимались следующие положения:

касательно лимфоидного истощения: для подтверждения данных о том, что вакцина «способствует предупреждению лимфоидного истощения», поросята рассматривались как позитивные, если один или несколько из 4 образцов лимфоидной ткани (миндалины, TBLN, MLN или ILN) был(и) гистологически позитивным(и) по лимфоидному истощению;

касательно лимфоидного воспаления: для подтверждения данных о том, что вакцина «способствует предупреждению лимфоидного воспаления», поросята рассматривались как позитивные, если один или несколько из 4 образцов лимфоидной ткани (миндалина, TBLN, MLN или ILN) был(и) гистологически позитивным(и) по лимфоидному воспалению;

касательно колонизации лимфоидной ткани: для подтверждения данных о том, что поросята точно инфицированы через 4 недели после обработки вирусом, поросята рассматривались как позитивные, если один или несколько из 4 образцов лимфоидной ткани (миндалина, TBLN, MLN или ILN) был(и) позитивными в отношении колонизации лимфоидной ткани PCV2 по данным ИГХ;

касательно виремии: для подтверждения данных о том, что вакцина «способствует предупреждению виремии», поросята рассматривались как позитивные в день отбора образца, если по данным оценки сыворотки с помощью ОТ-ПЦР установлено наличие $\geq 1,0 \times 10^4$ геномных эквивалентов PCV2 (линейный более низкий уровень); и

касательно смертности: для подтверждения данных о том, что вакцина «способствует предупреждению смертности» поросята рассматривались как позитивные в отношении смертности, при оценке их ответа на контрольное заражение (гибель или необходимость в умерщвлении по гуманным соображениям из-за клинических признаков, макроскопическим повреждением и/или гистологическими повреждениями, присущих PCV2).

В перечне последовательностей:

SEQ ID NO: 1 соответствует SEQ ID NO: 2, включающей замену R63T;

SEQ ID NO: 2 соответствует последовательности белка OPC2 PCV2b дикого типа;

SEQ ID NO: 3 соответствует последовательности белка OPC2 PCV2a дикого типа;

SEQ ID NO: 4 соответствует полинуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 1,

SEQ ID NO: 5 соответствует последовательности белка OPC2 PCV2b дикого типа;

SEQ ID NO: 6 соответствует последовательности полипептида, предлагаемого в настоящем изобретении, который состоит из 233 аминокислотных остатков и имеет в аминокислотном положении 59 остаток аргинина;

5 SEQ ID NO: 7 соответствует последовательности полипептида, предлагаемого в настоящем изобретении, который состоит из 233 аминокислотных остатков и имеет в аминокислотном положении 59 остаток лизина;

10 SEQ ID NO: 8 соответствует последовательности полипептида, предлагаемого в настоящем изобретении, который состоит из 234 аминокислотных остатков и имеет в аминокислотном положении 59 остаток аргинина;

15 SEQ ID NO: 9 соответствует последовательности полипептида, предлагаемого в настоящем изобретении, который состоит из 234 аминокислотных остатков и имеет в аминокислотном положении 59 остаток лизина;

20 SEQ ID NO: 10 соответствует последовательности аминокислотных положений 58-66 (обозначена в контексте настоящего описания также как «BC-петля») полипептида, предлагаемого в настоящем изобретении, который имеет в аминокислотном положении 59 остаток аргинина и имеет в аминокислотном положении 63 остаток аланина;

25 SEQ ID NO: 11 соответствует последовательности аминокислотных положений 58-66 (обозначена в контексте настоящего описания также как «BC-петля») полипептида, предлагаемого в настоящем изобретении, который имеет в аминокислотном положении 59 остаток аргинина и имеет в аминокислотном положении 63 остаток цистеина;

30 SEQ ID NO: 12 соответствует последовательности аминокислотных положений 58-66 (обозначена в контексте настоящего описания также как «BC-петля») полипептида, предлагаемого в настоящем изобретении, который имеет в аминокислотном положении 59 остаток аргинина и имеет в аминокислотном положении 63 остаток аспартата;

SEQ ID NO: 13 соответствует последовательности аминокислотных положений 58-66 (обозначена в контексте настоящего описания также как «BC-

петля») полипептида, предлагаемого в настоящем изобретении, который имеет в аминокислотном положении 59 остаток аргинина и имеет в аминокислотном положении 63 остаток глутамата;

5 SEQ ID NO: 14 соответствует последовательности аминокислотных положений 58-66 (обозначена в контексте настоящего описания также как «BC-петля») полипептида, предлагаемого в настоящем изобретении, который имеет в аминокислотном положении 59 остаток аргинина и имеет в аминокислотном положении 63 остаток фенилаланина;

10 SEQ ID NO: 15 соответствует последовательности аминокислотных положений 58-66 (обозначена в контексте настоящего описания также как «BC-петля») полипептида, предлагаемого в настоящем изобретении, который имеет в аминокислотном положении 59 остаток аргинина и имеет в аминокислотном положении 63 остаток глицина;

15 SEQ ID NO: 16 соответствует последовательности аминокислотных положений 58-66 (обозначена в контексте настоящего описания также как «BC-петля») полипептида, предлагаемого в настоящем изобретении, который имеет в аминокислотном положении 59 остаток аргинина и имеет в аминокислотном положении 63 остаток гистидина;

20 SEQ ID NO: 17 соответствует последовательности аминокислотных положений 58-66 (обозначена в контексте настоящего описания также как «BC-петля») полипептида, предлагаемого в настоящем изобретении, который имеет в аминокислотном положении 59 остаток аргинина и имеет в аминокислотном положении 63 остаток изолейцина;

25 SEQ ID NO: 18 соответствует последовательности аминокислотных положений 58-66 (обозначена в контексте настоящего описания также как «BC-петля») полипептида, предлагаемого в настоящем изобретении, который имеет в аминокислотном положении 59 остаток аргинина и имеет в аминокислотном положении 63 остаток лейцина;

30 SEQ ID NO: 19 соответствует последовательности аминокислотных положений 58-66 (обозначена в контексте настоящего описания также как «BC-петля») полипептида, предлагаемого в настоящем изобретении, который имеет в аминокислотном положении 59 остаток аргинина и имеет в аминокислотном положении 63 остаток метионина;

SEQ ID NO: 20 соответствует последовательности аминокислотных положений 58-66 (обозначена в контексте настоящего описания также как «BC-петля») полипептида, предлагаемого в настоящем изобретении, который имеет в аминокислотном положении 59 остаток аргинина и имеет в аминокислотном

5 положении 63 остаток аспарагина;

SEQ ID NO: 21 соответствует последовательности аминокислотных положений 58-66 (обозначена в контексте настоящего описания также как «BC-петля») полипептида, предлагаемого в настоящем изобретении, который имеет в аминокислотном положении 59 остаток аргинина и имеет в аминокислотном

10 положении 63 остаток пролина;

SEQ ID NO: 22 соответствует последовательности аминокислотных положений 58-66 (обозначена в контексте настоящего описания также как «BC-петля») полипептида, предлагаемого в настоящем изобретении, который имеет в аминокислотном положении 59 остаток аргинина и имеет в аминокислотном

15 положении 63 остаток глутамина;

SEQ ID NO: 23 соответствует последовательности аминокислотных положений 58-66 (обозначена в контексте настоящего описания также как «BC-петля») полипептида, предлагаемого в настоящем изобретении, который имеет в аминокислотном положении 59 остаток аргинина и имеет в аминокислотном

20 положении 63 остаток серина;

SEQ ID NO: 24 соответствует последовательности аминокислотных положений 58-66 (обозначена в контексте настоящего описания также как «BC-петля») полипептида, предлагаемого в настоящем изобретении, который имеет в аминокислотном положении 59 остаток аргинина и имеет в аминокислотном

25 положении 63 остаток треонина;

SEQ ID NO: 25 соответствует последовательности аминокислотных положений 58-66 (обозначена в контексте настоящего описания также как «BC-петля») полипептида, предлагаемого в настоящем изобретении, который имеет в аминокислотном положении 59 остаток аргинина и имеет в аминокислотном

30 положении 63 остаток валина;

SEQ ID NO: 26 соответствует последовательности аминокислотных положений 58-66 (обозначена в контексте настоящего описания также как «BC-петля») полипептида, предлагаемого в настоящем изобретении, который имеет в

аминокислотном положении 59 остаток аргинина и имеет в аминокислотном положении 63 остаток триптофана;

5 SEQ ID NO: 27 соответствует последовательности аминокислотных положений 58-66 (обозначена в контексте настоящего описания также как «ВС-петля») полипептида, предлагаемого в настоящем изобретении, который имеет в аминокислотном положении 59 остаток аргинина и имеет в аминокислотном положении 63 остаток тирозина;

10 SEQ ID NO: 28 соответствует последовательности аминокислотных положений 58-66 (обозначена в контексте настоящего описания также как «ВС-петля») полипептида, предлагаемого в настоящем изобретении, который имеет в аминокислотном положении 59 остаток аргинина и имеет в аминокислотном положении 63 остаток аланина;

15 SEQ ID NO: 29 соответствует последовательности аминокислотных положений 58-66 (обозначена в контексте настоящего описания также как «ВС-петля») полипептида, предлагаемого в настоящем изобретении, который имеет в аминокислотном положении 59 остаток лизина и имеет в аминокислотном положении 63 остаток цистеина;

20 SEQ ID NO: 30 соответствует последовательности аминокислотных положений 58-66 (обозначена в контексте настоящего описания также как «ВС-петля») полипептида, предлагаемого в настоящем изобретении, который имеет в аминокислотном положении 59 остаток лизина и имеет в аминокислотном положении 63 остаток аспартата;

25 SEQ ID NO: 31 соответствует последовательности аминокислотных положений 58-66 (обозначена в контексте настоящего описания также как «ВС-петля») полипептида, предлагаемого в настоящем изобретении, который имеет в аминокислотном положении 59 остаток лизина и имеет в аминокислотном положении 63 остаток глутамата;

30 SEQ ID NO: 32 соответствует последовательности аминокислотных положений 58-66 (обозначена в контексте настоящего описания также как «ВС-петля») полипептида, предлагаемого в настоящем изобретении, который имеет в аминокислотном положении 59 остаток лизина и имеет в аминокислотном положении 63 остаток фенилаланина;

SEQ ID NO: 33 соответствует последовательности аминокислотных положений 58-66 (обозначена в контексте настоящего описания также как «BC-петля») полипептида, предлагаемого в настоящем изобретении, который имеет в аминокислотном положении 59 остаток лизина и имеет в аминокислотном

5 положении 63 остаток глицина;

SEQ ID NO: 34 соответствует последовательности аминокислотных положений 58-66 (обозначена в контексте настоящего описания также как «BC-петля») полипептида, предлагаемого в настоящем изобретении, который имеет в аминокислотном положении 59 остаток лизина и имеет в аминокислотном

10 положении 63 остаток гистидина;

SEQ ID NO: 35 соответствует последовательности аминокислотных положений 58-66 (обозначена в контексте настоящего описания также как «BC-петля») полипептида, предлагаемого в настоящем изобретении, который имеет в аминокислотном положении 59 остаток лизина и имеет в аминокислотном

15 положении 63 остаток изолейцина;

SEQ ID NO: 36 соответствует последовательности аминокислотных положений 58-66 (обозначена в контексте настоящего описания также как «BC-петля») полипептида, предлагаемого в настоящем изобретении, который имеет в аминокислотном положении 59 остаток лизина и имеет в аминокислотном

20 положении 63 остаток лейцина;

SEQ ID NO: 37 соответствует последовательности аминокислотных положений 58-66 (обозначена в контексте настоящего описания также как «BC-петля») полипептида, предлагаемого в настоящем изобретении, который имеет в аминокислотном положении 59 остаток лизина и имеет в аминокислотном

25 положении 63 остаток метионина;

SEQ ID NO: 38 соответствует последовательности аминокислотных положений 58-66 (обозначена в контексте настоящего описания также как «BC-петля») полипептида, предлагаемого в настоящем изобретении, который имеет в аминокислотном положении 59 остаток лизина и имеет в аминокислотном

30 положении 63 остаток аспарагина;

SEQ ID NO: 39 соответствует последовательности аминокислотных положений 58-66 (обозначена в контексте настоящего описания также как «BC-петля») полипептида, предлагаемого в настоящем изобретении, который имеет в

аминокислотном положении 59 остаток лизина и имеет в аминокислотном положении 63 остаток пролина;

5 SEQ ID NO: 40 соответствует последовательности аминокислотных положений 58-66 (обозначена в контексте настоящего описания также как «ВС-петля») полипептида, предлагаемого в настоящем изобретении, который имеет в аминокислотном положении 59 остаток лизина и имеет в аминокислотном положении 63 остаток глутамина;

10 SEQ ID NO: 41 соответствует последовательности аминокислотных положений 58-66 (обозначена в контексте настоящего описания также как «ВС-петля») полипептида, предлагаемого в настоящем изобретении, который имеет в аминокислотном положении 59 остаток лизина и имеет в аминокислотном положении 63 остаток серина;

15 SEQ ID NO: 42 соответствует последовательности аминокислотных положений 58-66 (обозначена в контексте настоящего описания также как «ВС-петля») полипептида, предлагаемого в настоящем изобретении, который имеет в аминокислотном положении 59 остаток лизина и имеет в аминокислотном положении 63 остаток треонина;

20 SEQ ID NO: 43 соответствует последовательности аминокислотных положений 58-66 (обозначена в контексте настоящего описания также как «ВС-петля») полипептида, предлагаемого в настоящем изобретении, который имеет в аминокислотном положении 59 остаток лизина и имеет в аминокислотном положении 63 остаток валина;

25 SEQ ID NO: 44 соответствует последовательности аминокислотных положений 58-66 (обозначена в контексте настоящего описания также как «ВС-петля») полипептида, предлагаемого в настоящем изобретении, который имеет в аминокислотном положении 59 остаток лизина и имеет в аминокислотном положении 63 остаток триптофана.

30 SEQ ID NO: 45 соответствует последовательности аминокислотных положений 58-66 (обозначена в контексте настоящего описания также как «ВС-петля») полипептида, предлагаемого в настоящем изобретении, который имеет в аминокислотном положении 59 остаток лизина и имеет в аминокислотном положении 63 остаток тирозина,

SEQ ID NO: 46 соответствует последовательности полипептида, предлагаемого в настоящем изобретении, который состоит из 234 аминокислотных остатков и имеет в аминокислотном положении 63 остаток треонина.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> БЁРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ ВЕТМЕДИКА, ИНК.

5 <120> ВАРИАНТ БЕЛКА ОРС2 РСВ2 И СОДЕРЖАЩИЕ ЕГО ВИРУСОПОДОБНЫЕ ЧАСТИЦЫ

<130> P10-0163

<160> 46

10 <170> PatentIn , версия 3.5

<210> 1

<211> 234

15 <212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> соответствует SEQ ID NO:2 с заменой R63T

20 <400> 1

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

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

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

35 Leu Ser Arg Thr Ile Gly Tyr Thr Val Lys Lys Thr Thr Val Thr Thr
50 55 60

40 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 Asn Pro Leu Thr Val Pro Phe Glu Tyr Tyr
85 90 95

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

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

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

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

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

20 Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Thr Gly Asn
180 185 190

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

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

35 Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Asn Pro Lys
225 230

40 <210> 2
<211> 234
<212> PRT
<213> Цирковирс свиной

45 <400> 2

50 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 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

5
Pro Pro Gly Gly Gly Ser Asn Pro Leu Thr Val Pro Phe Glu Tyr Tyr
85 90 95

10
Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr
100 105 110

15
Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn
115 120 125

20
Phe Val Thr Lys Ala Asn Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr
130 135 140

25
Ser Ser Arg His Thr Ile Thr Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr
145 150 155 160

30
Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Arg Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro
165 170 175

35
Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Thr Gly Asn
180 185 190

40
Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Ile Tyr Asp
195 200 205

45
Gln Asp Tyr Asn Ile Arg Ile Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe
210 215 220

50
Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Asn Pro Lys
225 230

<210> 3
<211> 233
<212> PRT
<213> Цирковирс свиней
<400> 3

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

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

210 215 220

Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Glu Pro

5 225 230

<210> 4

<211> 705

10 <212> DNA

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> кодирует SEQ ID NO:1

15

<220>

<221> misc_feature

<222> (187)..(189)

20

<400> 4

atgacgtatc caaggaggcg tttccgcaga cgaagacacc gcccccgag ccattcttggc 60

cagatcctcc gccgccgccc ctggctcgtc ccccccgcc accgttaccg ctggagaagg 120

25 aaaaatggca tcttcaacac ccgcctctcc cgcaccatcg gttatactgt caagaaaacc 180

acagtcacaa cgccctcctg gaatgtggac atgatgagat ttaatatata tgattttctt 240

30 cccccaggag ggggctcaaa cccctcact gtgccctttg aatactacag aataaggaag 300

gttaagggtg agttctggcc ctgctcccca atcaccagg gtgacagggg agtgggctcc 360

actgctgtta ttctagatga taactttgta acaaaggcca atgccctaac ctatgacccc 420

35 tatgtaaaact actcctcccg ccataccata acccagccct tctcctacca ctcccggtac 480

tttaccgccg aacctgtcct tgataggaca atcgattact tccaacccaa taacaaaaga 540

40 aatcaactct ggctgagact acaaactact ggaaatgtag accatgtagg cctcggcact 600

gcgttcgaaa acagtatata cgaccaggac tacaatatcc gtataaccat gtatgtacaa 660

ttcagagaat ttaattctaa agacccccca cttaacccta agtga 705

45

<210> 5

<211> 233

<212> PRT

50 <213> Цирковирус свиней

<400> 5

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

5
Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro
20 25 30

10 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 Arg Thr
15 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

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

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

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

40 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

45 Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Ala Gly Asn
180 185 190

50 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

5

Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Asn Pro
225 230

10

<210> 6
<211> 233
<212> PRT
<213> Цирковирус свиней

15

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> Хаа может обозначать любую встречающуюся в естественных условиях

20

аминокислоту
<220>
<221> misc_feature
<222> (53)..(53)
<223> Хаа может обозначать любую встречающуюся в естественных условиях

25

аминокислоту
<220>
<221> misc_feature
<222> (57)..(57)

30

<223> Хаа может обозначать любую встречающуюся в естественных условиях
аминокислоту
<220>

35

<221> MISC_FEATURE
<222> (63)..(63)
<223> Хаа в положении 63 выбирают из группы, состоящей из Ala,
Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr,
Trp, Tyr и Val.

40

<220>
<221> misc_feature
<222> (68)..(68)
<223> Хаа может обозначать любую встречающуюся в естественных условиях
аминокислоту

45

<220>
<221> misc_feature
<222> (89)..(90)
<223> Хаа может обозначать любую встречающуюся в естественных условиях

50

аминокислоту
<220>

<221> misc_feature
 <222> (121)..(121)
 <223> Хаа может обозначать любую встречающуюся в естественных условиях
 5 аминокислоту
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (134)..(134)
 10 <223> Хаа может обозначать любую встречающуюся в естественных условиях
 аминокислоту
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (169)..(169)
 15 <223> Хаа может обозначать любую встречающуюся в естественных условиях
 аминокислоту
 <220>
 <221> misc_feature
 20 <222> (190)..(190)
 <223> Хаа может обозначать любую встречающуюся в естественных условиях
 аминокислоту
 <220>
 25 <221> MISC_FEATURE
 <222> (210)..(210)
 <223> Хаа в положении 210 выбирают из группы, состоящей из Asp
 и Glu
 30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (215)..(215)
 <223> Хаа может обозначать любую встречающуюся в естественных условиях
 35 аминокислоту
 <400> 6
 Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Xaa Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg
 1 5 10 15
 40 Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro
 20 25 30
 45 Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg
 35 40 45
 50 Leu Ser Arg Thr Xaa Gly Tyr Thr Xaa Lys Arg Thr Thr Val Xaa Thr
 50 55 60

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

5
Pro Pro Gly Gly Gly Ser Asn Pro Xaa Xaa Val Pro Phe Glu Tyr Tyr
85 90 95

10
Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr
100 105 110

15
Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Xaa Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn
115 120 125

20
Phe Val Thr Lys Ala Xaa 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

25
Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Xaa Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro
165 170 175

30
Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Xaa Gly Asn
180 185 190

35
Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Ile Tyr Asp
195 200 205

40
Gln Xaa Tyr Asn Ile Arg Xaa Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe
210 215 220

Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Asn Pro
225 230

45
<210> 7
<211> 233
<212> PRT
<213> Цирковирус свиной

50
<220>

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50

<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> Хаа может обозначать любую встречающуюся в естественных условиях аминокислоту

<220>
<221> misc_feature
<222> (53)..(53)
<223> Хаа может обозначать любую встречающуюся в естественных условиях аминокислоту

<220>
<221> misc_feature
<222> (57)..(57)
<223> Хаа может обозначать любую встречающуюся в естественных условиях аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (63)..(63)
<223> Хаа в положении 63 выбирают из группы, состоящей из Ala, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr и Val.

<220>
<221> misc_feature
<222> (68)..(68)
<223> Хаа может обозначать любую встречающуюся в естественных условиях аминокислоту

<220>
<221> misc_feature
<222> (89)..(90)
<223> Хаа может обозначать любую встречающуюся в естественных условиях аминокислоту

<220>
<221> misc_feature
<222> (121)..(121)
<223> Хаа может обозначать любую встречающуюся в естественных условиях аминокислоту

<220>
<221> misc_feature
<222> (134)..(134)
<223> Хаа может обозначать любую встречающуюся в естественных условиях аминокислоту

<220>
<221> misc_feature
<222> (169)..(169)

<223> Хаа может обозначать любую встречающуюся в естественных условиях аминокислоту

<220>

5 <221> misc_feature

<222> (190)..(190)

<223> Хаа может обозначать любую встречающуюся в естественных условиях аминокислоту

10 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (210)..(210)

<223> Хаа в положении 210 выбирают из группы, состоящей из Asp и Glu

15

<220>

<221> misc_feature

<222> (215)..(215)

<223> Хаа может обозначать любую встречающуюся в естественных условиях аминокислоту

20

<400> 7

25

Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Xaa 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

30

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

35

Leu Ser Arg Thr Xaa Gly Tyr Thr Xaa Lys Lys Thr Thr Val Xaa Thr
50 55 60

40

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

45

Pro Pro Gly Gly Gly Ser Asn Pro Xaa Xaa Val Pro Phe Glu Tyr Tyr
85 90 95

50

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 Xaa Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn

	115	120	125
5	Phe Val Thr Lys Ala Xaa Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr 130 135 140		
10	Ser Ser Arg His Thr Ile Thr Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr 145 150 155 160		
15	Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Xaa Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro 165 170 175		
20	Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Xaa Gly Asn 180 185 190		
25	Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Ile Tyr Asp 195 200 205		
30	Gln Xaa Tyr Asn Ile Arg Xaa Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe 210 215 220		
35	Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Asn Pro 225 230		
40	<210> 8 <211> 234 <212> PRT <213> Цирковирс свиной		
45	<220> <221> misc_feature <222> (8)..(8) <223> Хаа может обозначать любую встречающуюся в естественных условиях аминокислоту		
50	<220> <221> misc_feature <222> (53)..(53) <223> Хаа может обозначать любую встречающуюся в естественных условиях аминокислоту		

<223> Хаа может обозначать любую встречающуюся в естественных условиях аминокислоту

<220>

5 <221> MISC_FEATURE

<222> (63)..(63)

<223> Хаа в положении 63 выбирают из группы, состоящей из Ala, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr и Val.

10

<220>

<221> misc_feature

<222> (68)..(68)

15 <223> Хаа может обозначать любую встречающуюся в естественных условиях аминокислоту

<220>

<221> misc_feature

<222> (89)..(90)

20 <223> Хаа может обозначать любую встречающуюся в естественных условиях аминокислоту

<220>

<221> misc_feature

25 <222> (121)..(121)

<223> Хаа может обозначать любую встречающуюся в естественных условиях аминокислоту

<220>

30 <221> misc_feature

<222> (134)..(134)

<223> Хаа может обозначать любую встречающуюся в естественных условиях аминокислоту

35

<220>

<221> misc_feature

<222> (169)..(169)

<223> Хаа может обозначать любую встречающуюся в естественных условиях аминокислоту

40

<220>

<221> misc_feature

<222> (190)..(190)

45 <223> Хаа может обозначать любую встречающуюся в естественных условиях аминокислоту

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (210)..(210)

50 <223> Хаа в положении 210 выбирают из группы, состоящей из Asp и Glu

<220>
<221> misc_feature
<222> (215)..(215)
<223> Xaa может обозначать любую встречающуюся в естественных условиях
аминокислоту

<220>
<221> misc_feature
<222> (234)..(234)
<223> Xaa может обозначать любую встречающуюся в естественных условиях
аминокислоту

<400> 8

Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Xaa 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 Xaa Gly Tyr Thr Xaa Lys Arg Thr Thr Val Xaa Thr
50 55 60

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

Pro Pro Gly Gly Gly Ser Asn Pro Xaa Xaa 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 Xaa Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn
115 120 125

Phe Val Thr Lys Ala Xaa 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

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

10 Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Xaa Gly Asn
180 185 190

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

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

25 Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Asn Pro Xaa
225 230

<210> 9
<211> 234
<212> PRT
<213> Цирковирс свиной

30 <220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> Xaa может обозначать любую встречающуюся в естественных условиях аминокислоту

35 <220>
<221> misc_feature
<222> (53)..(53)
<223> Xaa может обозначать любую встречающуюся в естественных условиях аминокислоту

40 <220>
<221> misc_feature
<222> (57)..(57)
<223> Xaa может обозначать любую встречающуюся в естественных условиях аминокислоту

45 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (63)..(63)

50 <223> Xaa в положении 63 выбирают из группы, состоящей из Ala,
Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr,
Trp, Tyr и Val.

- 5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (68)..(68)
 <223> Хаа может обозначать любую встречающуюся в естественных условиях
 аминокислоту
- 10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (89)..(90)
 <223> Хаа может обозначать любую встречающуюся в естественных условиях
 аминокислоту
- 15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (121)..(121)
 <223> Хаа может обозначать любую встречающуюся в естественных условиях
 аминокислоту
- 20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (134)..(134)
 <223> Хаа может обозначать любую встречающуюся в естественных условиях
 аминокислоту
- 25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (169)..(169)
 <223> Хаа может обозначать любую встречающуюся в естественных условиях
 аминокислоту
- 30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (190)..(190)
 <223> Хаа может обозначать любую встречающуюся в естественных условиях
 аминокислоту
- 35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (210)..(210)
 <223> Хаа в положении 210 выбирают из группы, состоящей из Asp
 и Glu
- 40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (210)..(210)
 <223> Хаа в положении 210 выбирают из группы, состоящей из Asp
 и Glu
- 45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (215)..(215)
 <223> Хаа может обозначать любую встречающуюся в естественных условиях
 аминокислоту
- 50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (234)..(234)

<223> Хаа может обозначать любую встречающуюся в естественных условиях аминокислоту

<400> 9

5

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

10

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

15

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

20

Leu Ser Arg Thr Xaa Gly Tyr Thr Xaa Lys Lys Thr Thr Val Xaa Thr
50 55 60

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

25

Pro Pro Gly Gly Gly Ser Asn Pro Xaa Xaa Val Pro Phe Glu Tyr Tyr
85 90 95

30

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

35

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

40

Phe Val Thr Lys Ala Xaa 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

45

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

50

Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Xaa Gly Asn
180 185 190

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

5
Gln Xaa Tyr Asn Ile Arg Xaa Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe
210 215 220

10
Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Asn Pro Xaa
225 230

15
<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> Цирковирс свиней

20
<400> 10
Lys Arg Thr Thr Val Ala Thr Pro Ser
1 5

25
<210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> Цирковирс свиней

30
<400> 11
Lys Arg Thr Thr Val Cys Thr Pro Ser
1 5

35
<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> Цирковирс свиней

40
<400> 12
Lys Arg Thr Thr Val Asp Thr Pro Ser
1 5

45
<210> 13
<211> 9
<212> PRT
50 <213> Цирковирс свиней
<400> 13

Lys Arg Thr Thr Val Glu Thr Pro Ser
1 5

5

<210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> Цирковирус свиней

10

<400> 14

Lys Arg Thr Thr Val Phe Thr Pro Ser
1 5

15

<210> 15
<211> 9
<212> PRT
<213> Цирковирус свиней

20

<400> 15

Lys Arg Thr Thr Val Gly Thr Pro Ser
1 5

25

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> Цирковирус свиней

30

<400> 16

35

Lys Arg Thr Thr Val His Thr Pro Ser
1 5

40

<210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> Цирковирус свиней

45

<400> 17

Lys Arg Thr Thr Val Ile Thr Pro Ser
1 5

50

<210> 18
<211> 9
<212> PRT

<213> Цирковирус свиней

<400> 18

5 Lys Arg Thr Thr Val Leu Thr Pro Ser
1 5

<210> 19

10 <211> 9

<212> PRT

<213> Цирковирус свиней

<400> 19

15 Lys Arg Thr Thr Val Met Thr Pro Ser
1 5

<210> 20

20 <211> 9

<212> PRT

<213> Цирковирус свиней

<400> 20

25 Lys Arg Thr Thr Val Asn Thr Pro Ser
1 5

<210> 21

30 <211> 9

<212> PRT

<213> Цирковирус свиней

<400> 21

35 Lys Arg Thr Thr Val Pro Thr Pro Ser
1 5

<210> 22

40 <211> 9

<212> PRT

45 <213> Цирковирус свиней

<400> 22

50 Lys Arg Thr Thr Val Gln Thr Pro Ser
1 5

<210>	23
<211>	9
<212>	PRT
<213>	Цирковирус свиней

<400> 23

Lys Arg Thr Thr Val Ser Thr Pro Ser
1 5

<210>	24
<211>	9
<212>	PRT
<213>	Цирковирус свиней

<400> 24

Lys Arg Thr Thr Val Thr Thr Pro Ser
1 5

<210>	25
<211>	9
<212>	PRT
<213>	Цирковирус свиней

<400> 25

Lys Arg Thr Thr Val Val Thr Pro Ser
1 5

<210>	26
<211>	9
<212>	PRT
<213>	Цирковирус свиной

<400> 26

Lys Arg Thr Thr Val Trp Thr Pro Ser
1 5

<210>	27
<211>	9
<212>	PRT
<213>	Цирковирус свиней

<400> 27

Lys Arg Thr Thr Val Tyr Thr Pro Ser

1 5

5 <210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> Цирковирус свиней

10 <400> 28
Lys Lys Thr Thr Val Ala Thr Pro Ser
1 5

15 <210> 29
<211> 9
<212> PRT
<213> Цирковирус свиней

20 <400> 29
Lys Lys Thr Thr Val Cys Thr Pro Ser
1 5

25 <210> 30
<211> 9
<212> PRT
<213> Цирковирус свиней

30 <400> 30
Lys Lys Thr Thr Val Asp Thr Pro Ser
1 5

35 <210> 31
<211> 9
<212> PRT
40 <213> Цирковирус свиней

<400> 31

45 Lys Lys Thr Thr Val Glu Thr Pro Ser
1 5

50 <210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> Цирковирус свиней

<400> 32

Lys Lys Thr Thr Val Phe Thr Pro Ser
1 5

5

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

10 <213> Цирковирс свиной

<400> 33

Lys Lys Thr Thr Val Gly Thr Pro Ser
1 5

15

<210> 34

<211> 9

20 <212> PRT

<213> Цирковирс свиной

<400> 34

25 Lys Lys Thr Thr Val His Thr Pro Ser
1 5

<210> 35

30 <211> 9

<212> PRT

<213> Цирковирс свиной

<400> 35

35

Lys Lys Thr Thr Val Ile Thr Pro Ser
1 5

40 <210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Цирковирс свиной

45 <400> 36

Lys Lys Thr Thr Val Leu Thr Pro Ser
1 5

50

<210> 37

<211> 9

<212> PRT
<213> Цирковирус свиней

<400> 37

5

Lys Lys Thr Thr Val Met Thr Pro Ser
1 5

10

<210> 38
<211> 9
<212> PRT
<213> Цирковирус свиней

15

<400> 38

Lys Lys Thr Thr Val Asn Thr Pro Ser
1 5

20

<210> 39
<211> 9
<212> PRT
<213> Цирковирус свиней

25

<400> 39

Lys Lys Thr Thr Val Pro Thr Pro Ser
1 5

30

<210> 40
<211> 9
<212> PRT
<213> Цирковирус свиней

35

<400> 40

Lys Lys Thr Thr Val Gln Thr Pro Ser
1 5

40

<210> 41
<211> 9
<212> PRT
<213> Цирковирус свиней

45

<400> 41

50

Lys Lys Thr Thr Val Ser Thr Pro Ser
1 5

<210> 42
<211> 9
<212> PRT
5 <213> Цирковирс свиной

<400> 42

Lys Lys Thr Thr Val Thr Thr Pro Ser
10 1 5

<210> 43
<211> 9
15 <212> PRT
<213> Цирковирс свиной

<400> 43

Lys Lys Thr Thr Val Val Thr Pro Ser
20 1 5

<210> 44
25 <211> 9
<212> PRT
<213> Цирковирс свиной

<400> 44

Lys Lys Thr Thr Val Trp Thr Pro Ser
30 1 5

<210> 45
35 <211> 9
<212> PRT
<213> Цирковирс свиной

<400> 45

Lys Lys Thr Thr Val Tyr Thr Pro Ser
40 1 5

<210> 46
45 <211> 234
<212> PRT
<213> Цирковирс свиной

50 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (63)..(63)

<223> Хаа в положении 63 выбирают из группы, состоящей из Ala,
Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr,
Trp, Tyr и Val.

<400> 46

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

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

20 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 Xaa Thr
50 55 60

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

30 Pro Pro Gly Gly Gly Ser Asn Pro Leu Thr Val Pro Phe Glu Tyr Tyr
85 90 95

35 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

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

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

50 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

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

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

15 Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Asn Pro Lys
225 230

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полипептид, выбранный из группы, которая состоит из следующих белков, указанных в подпунктах (а), (б) и (в):

5 (а) белок OPC2 PCV2, имеющий:

- в аминокислотном положении 59 остаток аргинина или остаток лизина и/или

- в аминокислотном положении 88 остаток пролина, и/или

- в аминокислотном положении 151 остаток треонина, и/или

10 - в аминокислотном положении 206 остаток изолейцина, и/или

- в аминокислотном положении 232 остаток аспарагина,

и имеющий в аминокислотном положении 63 аминокислотный остаток, отличный от остатка аргинина или остатка лизина,

15 где нумерация аминокислотных положений соответствует нумерации в аминокислотной последовательности белка OPC2 PCV2 дикого типа;

(б) белок OPC2 PCV2, отличающийся тем, что он (I) содержит по меньшей мере одну мутацию в ВС-петле и (II) предпочтительно экспрессируется в существенно больших количествах по сравнению с белком OPC2 PCV2, который не содержит указанную мутацию;

20 (в) комбинация белков, указанных в подпунктах (а) и (б).

2. Полипептид по п. 1, в котором указанный в подпункте (а) белок OPC2 PCV2 имеет в аминокислотном положении 63 встречающийся в естественных условиях предпочтительно генетически кодируемый аминокислотный остаток.

25

3. Полипептид по п. 1 или п. 2, в котором указанный в подпункте (а) белок OPC2 PCV2 имеет в аминокислотном положении 63 аминокислотный остаток, выбранный из группы, которая состоит из аминокислотного остатка с полярной, но не заряженной боковой цепью, аминокислотного остатка с гидрофобной боковой цепью и остатка глицина.

30

4. Полипептид по п. 3, в котором указанный аминокислотный остаток с полярной, но незаряженной боковой цепью выбирают из группы, состоящей из

остатка серина, остатка треонина, остатка тирозина, остатка аспарагина и остатка глутамина, и/или в котором аминокислотный остаток с гидрофобной боковой цепью выбирают из группы, состоящей из остатка аланина, остатка валина, остатка лейцина, остатка изолейцина, остатка фенилаланина и остатка триптофана.

5. Полипептид по одному из п.п. 1-4, в котором указанный в подпункте (а) белок OPC2 PCV2 имеет в аминокислотном положении 63 аминокислотный остаток, выбранный из группы, которая состоит из остатка серина и остатка треонина.

6. Полипептид по одному из п.п. 1-5, в котором указанный в подпункте (б) белок OPC2 PCV2, содержащий по меньшей мере одну мутацию в ВС-петле, экспрессируется в существенно большем количестве, предпочтительно по меньшей мере в 2 раза большем количестве, более предпочтительно по меньшей мере в 3 раза большем количестве, еще более предпочтительно по меньшей мере в 5 раз большем количестве, еще более предпочтительно по меньшей мере в 8 раз большем количестве, по сравнению с белком OPC2 PCV2, который не содержит указанную мутацию, где указанный белок OPC2 PCV2, содержащий по меньшей мере одну мутацию в ВС-петле экспрессируется в большем количестве в бакуловирусной экспрессионной системе по сравнению с указанным белком OPC2 PCV2, который не содержит указанную мутацию, и/или где указанный белок OPC2 PCV2, который не содержит указанную мутацию, представляет собой белок OPC2 PCV2 дикого типа.

7. Полипептид по одному из п.п. 1-6, в котором указанная в подпункте (б) по меньшей мере одна мутация в ВС-петле представляет собой по меньшей мере одну мутацию в области, состоящей из аминокислотных положений 58-66, и где нумерация аминокислотных положений соответствует нумерации в аминокислотной последовательности белка OPC2 PCV2 дикого типа.

8. Полипептид по одному из п.п. 1-7, в котором указанная в подпункте (б) по меньшей мере одна мутация в ВС-петле содержит или состоит из делеции,

замены и/или добавления от одного до 7 аминокислотных остатков в области, состоящей из аминокислотных положений 60-66, и где нумерация аминокислотных положений соответствует нумерации в аминокислотной последовательности белка OPC2 PCV2 дикого типа.

5

9. Полипептид по одному из п.п. 1-8, в котором указанная в подпункте (б) по меньшей мере одна мутация в ВС-петле представляет собой делецию, замену и/или добавление одного аминокислотного остатка в аминокислотное положение 63, и где нумерация аминокислотных положений соответствует нумерации в аминокислотной последовательности белка OPC2 PCV2 дикого типа.

10

10. Полипептид по одному из п.п. 1-9, в котором указанная в подпункте (б) по меньшей мере одна мутация в ВС-петле представляет собой замену аминокислотного остатка в аминокислотном положении 63 на аминокислотный остаток, отличный от остатка аргинина или остатка лизина, и где нумерация аминокислотных положений соответствует нумерации в аминокислотной последовательности белка OPC2 PCV2 дикого типа.

15

11. Полипептид по одному из п.п. 1-10, в котором указанная в подпункте (б) по меньшей мере одна мутация в ВС-петле представляет собой замену остатка аргинин или остатка лизина в аминокислотном положении 63 на аминокислотный остаток, отличный от остатка аргинина или остатка лизина, и/или где OPC2 PCV2, которая не содержит указанную мутацию, имеет остаток аргинина или остаток лизина в аминокислотном положении 63, и где нумерация аминокислотных положений соответствует нумерации в аминокислотной последовательности белка OPC2 PCV2 дикого типа.

20

25

12. Полипептид по п. 10 или п. 11, в котором указанный аминокислотный остаток, отличный от остатка аргинина или остатка лизина, представляет собой встречающийся в естественных условиях, предпочтительно генетически кодируемый аминокислотный остаток.

30

13. Полипептид по одному из п.п. 10-12, в котором указанный аминокислотный остаток, отличный от остатка аргинина или остатка лизина, выбирают из группы, состоящей из аминокислотного остатка с полярной, но не заряженной боковой цепью, аминокислотного остатка с гидрофобной боковой цепью и остатка глицина.

14. Полипептид по п. 13, в котором указанный аминокислотный остаток с полярной, но не заряженной боковой цепью выбирают из группы, состоящей из остатка серина, остатка треонина, остатка тирозин, остатка аспарагина и остатка глутамина, и/или в котором указанный аминокислотный остаток с гидрофобной боковой цепью выбирают из группы, состоящей из остатка аланина, остатка валина, остатка лейцина, остатка изолейцина, остатка фенилаланина и остатка триптофана.

15. Полипептид по одному из п.п. 10-14, в котором указанный аминокислотный остаток, отличный от остатка аргинина или остатка лизина, выбирают из группы, состоящей из остатка серина и остатка треонина.

16. Полипептид по одному из п.п. 1-15, где указанный полипептид представляет собой рекомбинантный белок OPC2 PCV2, предпочтительно экспрессируемый в рекомбинантном бакуловирусе белок OPC2 PCV2.

17. Полипептид по одному из п.п. 1-16, где указанный полипептид представляет собой белок OPC2 PCV2 подтипа b (PCV2b).

18. Полипептид по одному из п.п. 1-17, где указанный полипептид представляет собой белок OPC2 PCV2, который содержит аминокислотную последовательность, которая идентична по меньшей мере на 90% аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, или состоит из нее.

19. Полипептид по одному из п.п. 1-18, где указанный полипептид выбирают из группы, состоящей из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 6-9,

и/или где указанный полипептид содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10-45.

5 20. Полипептид по одному из п.п. 1-19, где указанный белок OPC2 PCV2 представляет собой белок, представленный в SEQ ID NO: 2.

10 21. Иммуногенная композиция, содержащая полипептид по одному из п.п. 1-20, где необязательно указанная иммуногенная композиция дополнительно содержит полипептид OPC2 PCV2a, где указанный полипептид OPC2 PCV2a предпочтительно по меньшей мере на 94% или предпочтительно по меньшей мере на 95% идентичен последовательности SEQ ID NO: 3.

15 22. Полинуклеотид, содержащий последовательность, которая кодирует полипептид по одному из п.п. 1-20.

23. Плазида, предпочтительно экспрессионный вектор, которая содержит полинуклеотид, содержащий последовательность, которая кодирует полипептид по одному из п.п. 1-20.

20 24. Клетки, содержащую плазмиду, предпочтительно экспрессионный вектор, которая содержит полинуклеотид, содержащий последовательность, которая кодирует полипептид по одному из п.п. 1-20.

25 25. Вирусоподобная частица, состоящая из множества полипептидов по одному из п.п. 1-20.

26. Бакуловирус, содержащий полинуклеотид, который содержит последовательность, кодирующую полипептид по одному из п.п. 1-20.

30 27. Клетка, предпочтительно клетка насекомого, содержащая бакуловирус, который содержит полинуклеотид, содержащий последовательность, которая кодирует полипептид по одному из п.п. 1-20.

28. Применение:

- полипептида по одному из п.п. 1-20,
- иммуногенной композиции по п. 21,
- полинуклеотида по п. 22,
- 5 - вирусоподобной частицы по п. 25,
- бакуловируса по п. 26,
- плазмиды по п. 23 и/или
- клетки по п. 24 или п. 27

для приготовления лекарственного средства, предпочтительно вакцины.

10

29. Полипептид по одному из п.п. 1-20 или иммуногенная композиция по п. 21, предназначенный/предназначенная для применения в способе лечения или предупреждения заражения PCV2, снижения, предупреждения или лечения клинических признаков, вызываемых заражением PCV2, или предупреждения

15 или лечения заболевания, вызываемого заражением PCV2.

15

30. Полипептид по одному из п.п. 1-20 или иммуногенная композиция по п. 21, предназначенный/предназначенная для применения по п. 25, где заражение PCV2 представляет собой заражение PCV2 подтипа b (PCV2b) и/или PCV2

20 подтипа, отличного от подтипа 2b.

20

31. Полипептид по одному из п.п. 1-20 или иммуногенная композиция по п. 21, предназначенный/предназначенная для применения по п. 29 или п. 30, где заражение PCV2 представляет собой заражение PCV2 подтипа, отличного от

25 подтипа 2b.

25

32. Полипептид по одному из п.п. 1-20 или иммуногенная композиция по п. 21, предназначенный/предназначенная для применения по п. 30, где заражение PCV2 представляет собой одновременное (конкурентное) заражение (I) PCV2b и

30 (II) PCV2 подтипа, отличного от подтипа 2b.

30

33. Полипептид по одному из п.п. 1-20 или иммуногенная композиция по п. 21, предназначенный/предназначенная для применения по одному из п.п. 30-32,

где заражение PCV2, отличным от подтипа 2b, представляет собой заражение PCV2 подтипа а (PCV2a) и/ил PCV2 подтипа с (PCV2с).

34. Полипептид по одному из п.п. 1-20 или иммуногенная композиция по п. 21, предназначенный/предназначенная для применения по одному из п.п. 30-33, где заражение PCV2, отличным от подтипа 2b, представляет собой заражение PCV2a.

35. Полипептид по одному из п.п. 1-20 или иммуногенная композиция по п. 21, предназначенный/предназначенная для применения по одному из п.п. 30-34, где заражение PCV2 представляет собой одновременное заражение (I) PCV2b и (II) PCV2a.

36. Полипептид по одному из п.п. 1-20 или иммуногенная композиция по п. 21, предназначенный/предназначенная для применения по одному из п.п. 29-35, где указанное заражение PCV2b представляет собой заражение PCV2, который содержит полипептид, идентичный по меньшей мере на 94% или предпочтительно по меньшей мере на 95% последовательности SEQ ID NO: 2, или который содержит полинуклеотид, содержащий последовательность, которая кодирует полипептид, идентичный по меньшей мере на 94% или предпочтительно по меньшей мере на 95% последовательности SEQ ID NO: 2.

37. Полипептид по одному из п.п. 1-20 или иммуногенная композиция по п. 21, предназначенный/предназначенная для применения по одному из п.п. 23-35, где указанное заражение PCV2a представляет собой заражение PCV2, содержащим полипептид, который по меньшей мере на 94% или предпочтительно по меньшей мере на 95% идентичен последовательности SEQ ID NO: 3, или содержащим полинуклеотид, который содержит последовательность, кодирующую полипептид, который по меньшей мере на 94% или предпочтительно по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 3.

38. Полипептид по одному из п.п. 1-20 или иммуногенная композиция по п. 21, предназначенный/предназначенная для применения по одному из п.п. 29-37, где лечение или предупреждение заражения PCV2 основано или содержит, или состоит в индукции иммунного ответа против PCV2, указанные клинические
5 признаки выбирают из группы, состоящей из лимфоидного истощения, лимфоидного воспаления, положительной ИГХ-оценки в отношении антигена PCV2 лимфоидной ткани, виремии, выделений из носа, пирексии, пониженного усредненного суточного прибавления массы, воспаления легких, положительной ИГХ-оценки в отношении антигена PCV2 в легочной ткани, или указанное
10 заболевание представляет собой PMWS.

39. Полипептид по одному из п.п. 1-20 или иммуногенная композиция по п. 21, предназначенный/предназначенная для применения по п.п. 30-38, где лечение или предупреждение заражения PCV2 подтипа, отличного от подтипа
15 2b, основано или содержит, или состоит в индукции иммунного ответа против указанного PCV2 подтипа, отличного от подтипа 2b, или одновременной индукции иммунного ответа против указанного PCV2 подтипа, отличного от подтипа 2b, и PCV2b.

40. Способ лечения или предупреждения заражения PCV2, снижения, предупреждения или лечения клинических признаков, вызываемых заражением PCV2, или предупреждения или лечения заболевания, вызываемого заражением PCV2, включающий введение животному полипептида по одному из п.п. 1-20 или иммуногенной композиции по п. 21, в котором указанное заражение PCV2
20 предпочтительно представляет собой заражение PCV2 по одному из п.п. 30-38.

41. Применение полипептида по одному из п.п. 1-20 или иммуногенной композиции по п. 21 для приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения или предупреждения заражения PCV2, снижения, предупреждения или лечения клинических признаков, вызываемых заражением PCV2, или предупреждения или лечения заболевания, вызываемого заражением PCV2, где указанное заражение PCV2 предпочтительно представляет собой
30 заражение PCV2 по одному из п.п. 30-38.

42. Способ по п. 40 или применение по п. 41, в котором лечение или предупреждение заражения PCV2 основано или содержит, или состоит в индукции иммунного ответа против указанного PCV2, или в котором

5 предупреждение, снижение или лечение заражения PCV2 подтипа, отличного от подтипа 2а, основано или содержит, или состоит в индукции иммунного ответа против указанного PCV2 подтипа, отличного от подтипа 2а, или одновременной индукции иммунного ответа против PCV2 подтипа, отличного от подтипа PCV2а, указанные клинические признаки выбирают из группы, состоящей из

10 лимфоидного истощения, лимфоидного воспаления, положительной ИГХ-оценки в отношении антигена PCV2 лимфоидной ткани, виремии, выделений из носа, пирексии, пониженного усредненного суточного прибавления массы, воспаления легких, положительной ИГХ-оценки в отношении антигена PCV2 в легочной ткани, или указанное заболевание представляет собой PMWS.

15 43. Полипептид по одному из п.п. 1-20 или иммуногенная композиция по п. 21, предназначенный/предназначенная для применения по одному из п.п. 29-39, или способ по п. 40 или п. 42, или применение по п. 41 или 42, где указанный полипептид или указанную иммуногенную композицию применяют только один

20 раз.

44. Способ получения полипептида по одному из п.п. 1-20, включающий трансфекцию клетки плазмидой по п. 23.

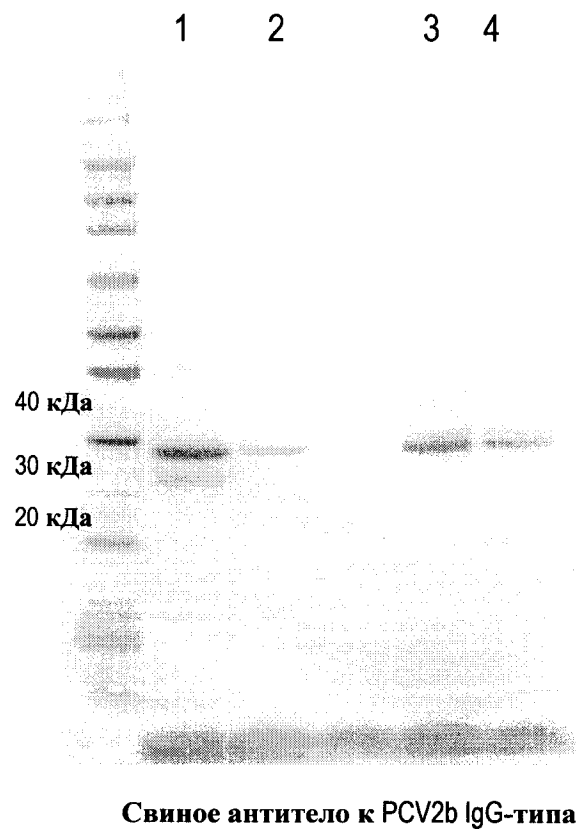
25 45. Способ получения полипептида по одному из п.п. 1-20, включающий заражение клетки, предпочтительно клетки насекомого бакуловирусом по п. 26.

ФИГ. 1

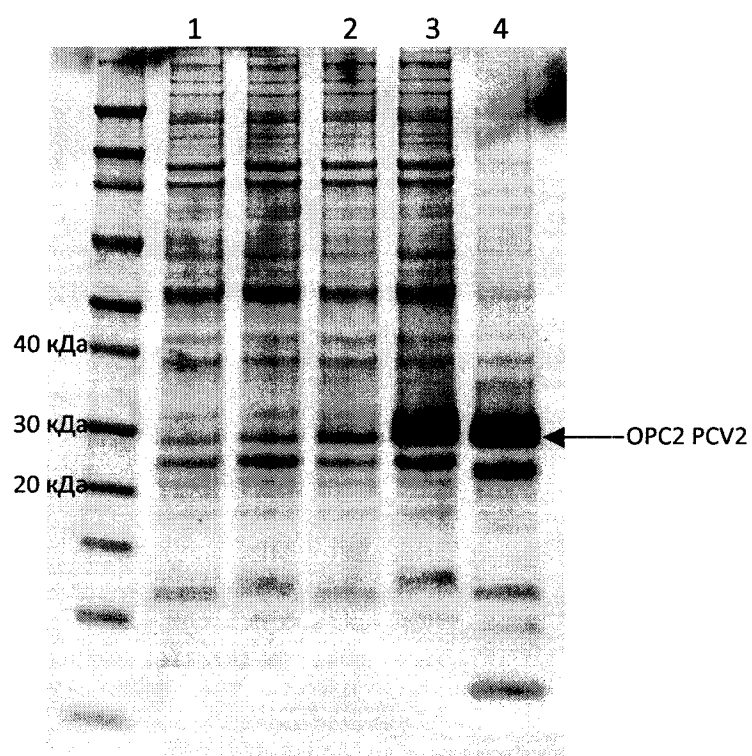
Положение	2a	2b
59	A	R/K
63	T	R/K
88	K	P
151	P	T
191	R	G
206	K	I
232	E	N

2/8

ФИГ. 2

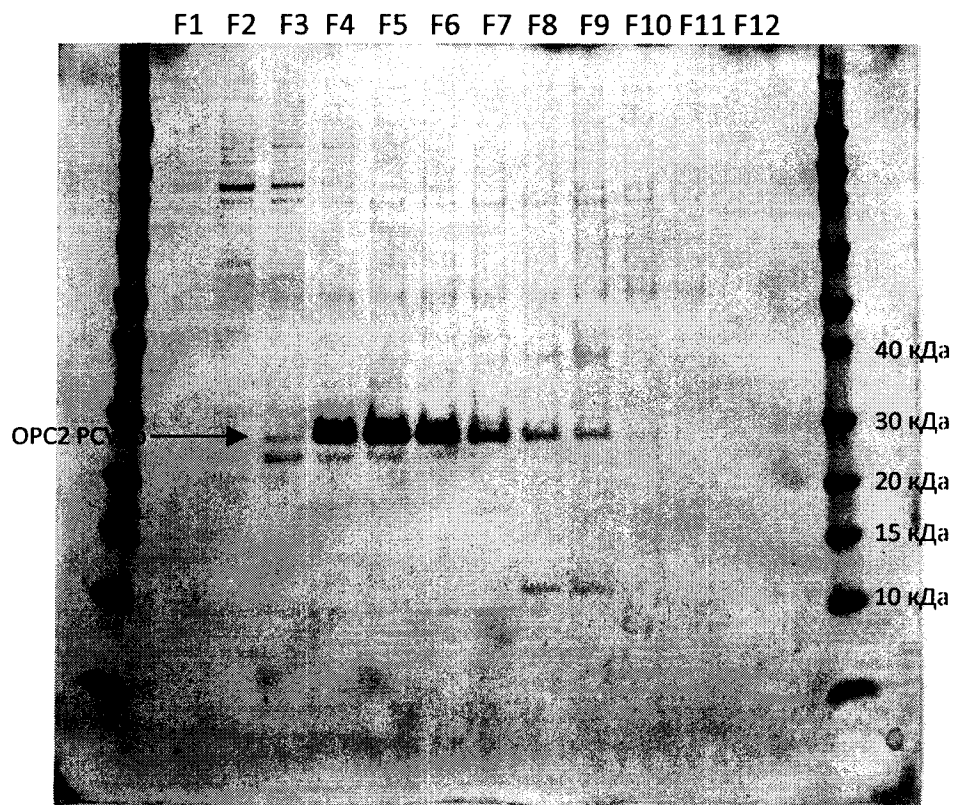


ФИГ. 3



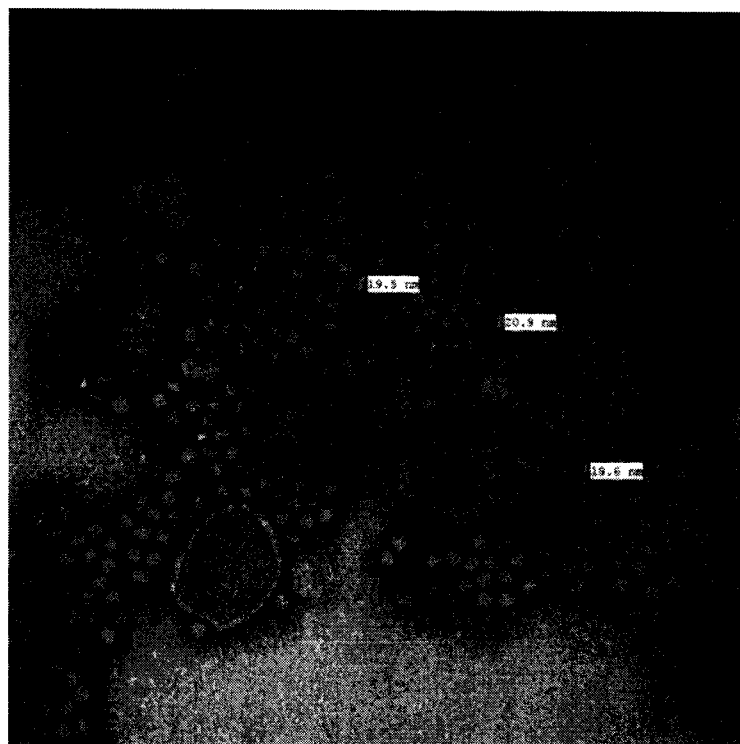
4/8

ФИГ. 4



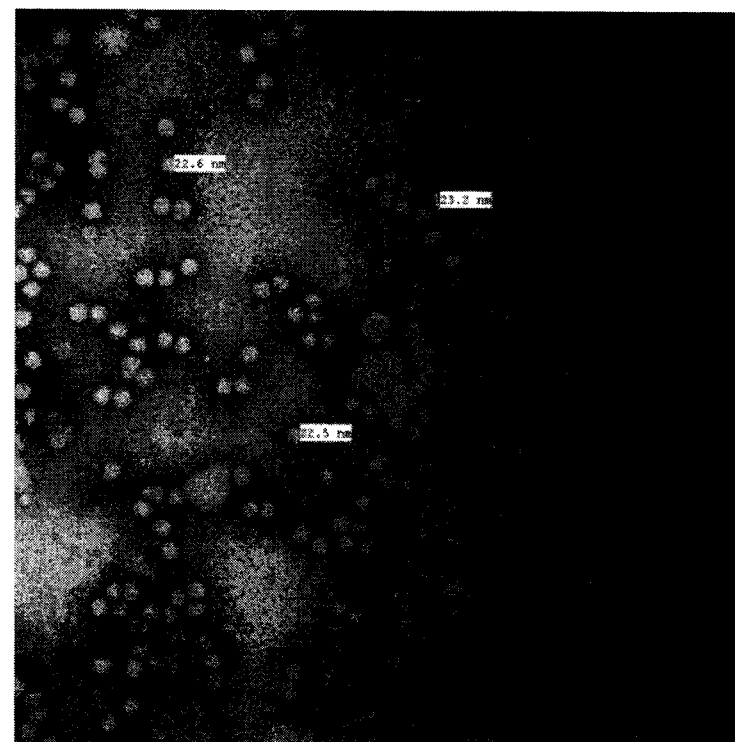
ДСН-ПААГ

ФИГ. 5А



ВПЧ ОРС2 PCV2a

ФИГ. 5Б



ВПЧ ОРС2 PCV2b

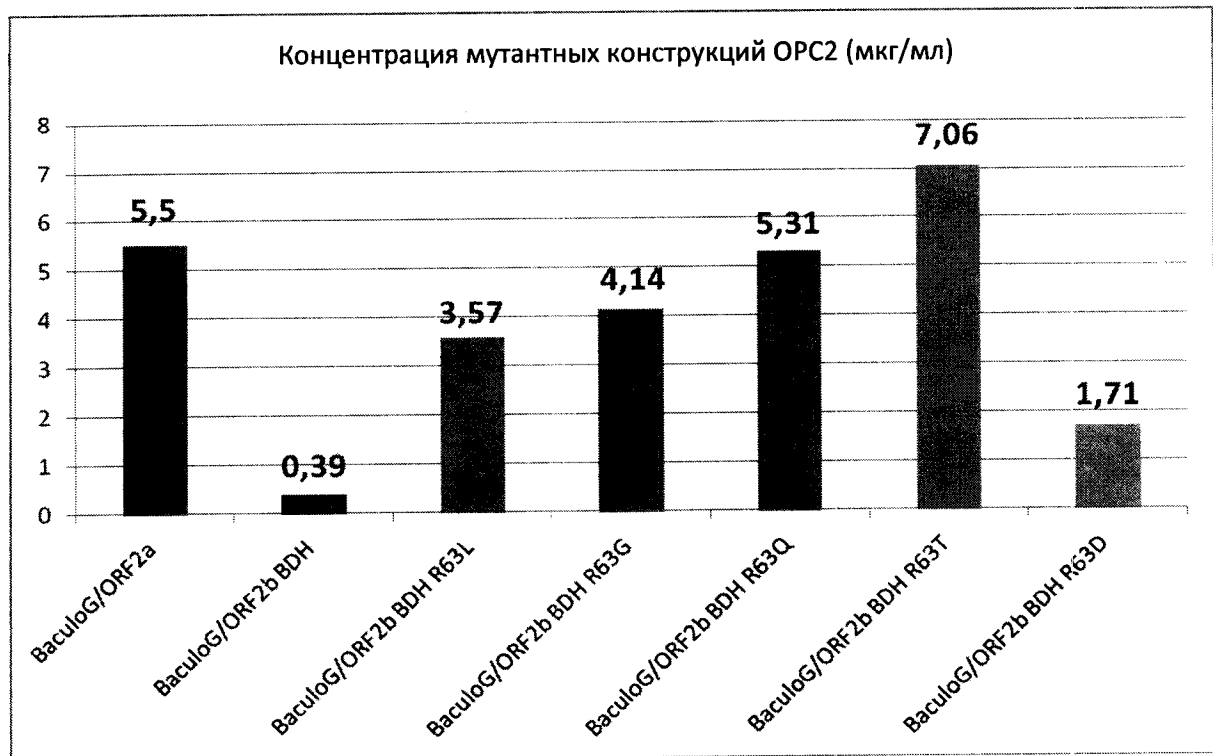
ФИГ. 6

Конструкция	подтверждение ЕМ VLP	Выход VLP при производстве в масштабе 1 л
ORF2a	Y	5,5 мг/л
ORF2b BDH		
ORF2b BDH SFCO	Y	0,4 мг/л
ORF2b BDH K59A	Y	0,34 мг/л
ORF BDH R63K		
ORF2b BDH R63T	Y	3,2 мг/л
ORF2b BDH SFCO P88K T151P	**	**
ORF2b BDH G191R	N	N/A
ORF2b BDH N232E	Y	0,57 мг/л
ORF2b BDH I206K	N	N/A

ФИГ. 7А

конструкции	концентрация(мкг/мл)
BaculoG/ORF2a	5.5
BaculoG/ORF2b BDH	0.39
BaculoG/ORF2b BDH R63L	3.57
BaculoG/ORF2b BDH R63G	4.14
BaculoG/ORF2b BDH R63Q	5.31
BaculoG/ORF2b BDH R63T	7.06
BaculoG/ORF2b BDH R63D	1.71

ФИГ. 7Б



[illegible]