

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **028376**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2017.11.30

(21) Номер заявки
201370140

(22) Дата подачи заявки
2011.12.20

(51) Int. Cl. *C12N 7/00* (2006.01)
C12N 15/34 (2006.01)
C07K 14/01 (2006.01)
C07K 16/08 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
A61P 31/20 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)
C12R 1/93 (2006.01)

(54) ЦИРКОВИРУС СВИНЕЙ 2 ТИПА (ЦВС2), СОДЕРЖАЩАЯ ЕГО ИММУНОГЕННАЯ КОМПОЗИЦИЯ, НАБОР ДЛЯ АНАЛИЗА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 61/426,087

(32) 2010.12.22

(33) US

(43) 2013.10.30

(86) PCT/CN2011/084277

(87) WO 2012/083837 2012.06.28

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
СБК ВИРБАК ЛИМИТЕД (CN)

(72) Изобретатель:
**Ко Тсунь-Юньг, Чэнь Хсу Чунг
Габриель, У Чунг-Чин, Чэнь Хань-
Тин (CN)**

(74) Представитель:
Носырева Е.Л. (RU)

(56) GenBank registry number: AY291317, 02 June 2003 (02.06.2003), see nucleotide and amino acid sequence see the whole document

GenBank registry number: GQ359002, 19 August 2009 (19.08.2009), see nucleotide and amino acid sequence see the whole document

CN-A-101549155

CN-A-101343671

WO-A1-2010061000

WO-A2-2009126356

DONG, Xintian et al., Preparation and Immune Efficacy of Inactivated Vaccine against Porcine Circovirus 2, ACTA VETERINARIA ET ZOOTECHICA SINICA, ISSN: 0366-6964, vol. 39, no. 5, pages 639-644, 31 December 2008 (31.12.2008), see the whole document

CAI, Baoxiang, Advances in detection and vaccination techniques of porcine circovirus type 2, ANIMAL HUSBANDRY & VETERINARY MEDICINE, ISSN: 0529-5130, vol. 40, no. 9, pages 89-92, 31 December 2008 (31.12.2008), see the whole document

(57) Изобретение предусматривает новый штамм цирковируса свиней 2 типа (ЦВС2), который был депонирован в Китайском центре коллекции типовых культур (CCTCC) под номером доступа V201117. Изобретение также предусматривает иммуногенные композиции, содержащие новый штамм ЦВС2, набор для анализов на ЦВС2 и применения нового штамма ЦВС2.

B1

028376

028376 B1

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к области ветеринарии, в частности к новому штамму цирковируса свиней 2 типа (ЦВС2), иммуногенной композиции, содержащей штамм вируса, набору для анализа ЦВС2 и применению штамма вируса.

Предпосылки изобретения

Впервые цирковирус свиней (ЦВС) был обнаружен в клеточной линии почек свиньи (РК-15, ATCC CCL33). Несмотря на то, что цирковирус свиней может постоянно контаминировать клетки РК-15, вирус не вызывает цитопатический эффект (CPE) на контаминированные клетки РК-15. Более того, ЦВС, полученный из РК-15, считается непатогенным. Несмотря на то, что цирковирус свиней может инфицировать свиней, он не вызывает патологических изменений у инфицированных свиней. Цирковирус свиней представляет собой вирус икосаэдрической формы с одноцепочечной ДНК и кольцевым геномом из 1759 пар оснований (п.о.). ЦВС, полученный из РК-15, в 1995 г. был отнесен к семейству *Circoviridae*.

В 1991 г. в Канаде у свиней впервые был зарегистрирован синдром мультисистемного истощения после отъема (PMWS). PMWS поражает поросят возрастом от 5 до 12 недель. Клинически он характеризуется такими симптомами, как прогрессирующая потеря веса, одышка, бледность и периодическая желтуха. Характерные для него микроскопические поражения включают истощение лимфоидной ткани с гистиоцитарными инфильтратами в пределах лимфоидных органов, пневмонию, гранулематозное воспаление, гепатит и нефрит. После вспышки 1991 г. в Канаде о PMWS сообщали во многих странах Северной Америки, Европы и Азии. Позже из свиней с PMWS был выделен новый цирковирус. Поскольку морфология цирковируса свиней, выделенного при PMWS, очень подобна морфологии ЦВС, полученного из РК-15, два цирковируса свиней имеют только 68-76% гомологии в их геномных последовательностях. Непатогенный ЦВС, полученный из РК-15, и патогенный ЦВС, полученный при PMWS, были дополнительно идентифицированы как цирковирус свиней 1 типа (ЦВС1) и цирковирус свиней 2 типа (ЦВС2) соответственно.

Цирковирус свиней 2 типа (ЦВС2) также принадлежит к семейству *Circoviridae*. ЦВС2 представляет собой вирус без оболочки, икосаэдрической формы, диаметром 17 нм с одноцепочечной кольцевой ДНК и известный как один из самых маленьких вирусов животных. Кольцевой геном ЦВС2 содержит точку начала репликации со структурой типа "стебель-петля", которая является общей характеристикой цирковирусов. Геном ЦВС2 включает 1767 или 1768 нуклеотидов и, как предполагается, имеет 11 потенциальных открытых рамок считывания (ORF). Среди 11 ORF ORF 1 и ORF 2, вероятно, являются наиболее важными генами, которые кодируют репликацию белков (Rep и Rep') и капсидный белок (Cap) соответственно. Капсидный белок (Cap), кодируемый геном ORF2 ЦВС2, по всей вероятности, будет представлять собой антиген, который индуцирует выработку нейтрализующих антител.

Инфекция ЦВС2 широко распространена на большинстве свиноферм в мире. Было обнаружено, что ЦВС2 является причиной низких уровней выживаемости и низких коэффициентов конверсии корма (FCR) у инфицированных свиней и приводит к большим экономическим потерям в свиноводстве. Следовательно, важно разработать наборы для анализов ЦВС2 и вакцину против ЦВС2.

Краткое описание изобретения

Первый аспект настоящего изобретения относится к штамму ЦВС2, выделенному из свиней, у которых проявлялись клинические симптомы синдрома мультисистемного истощения после отъема (PMWS), и в дальнейшем исследован и подтвержден как новый штамм ЦВС2 (штамм ЦВС2 Н). Положительная (+) цепь генома штамма ЦВС2 (штамма ЦВС2 Н) имеет последовательность ДНК SEQ ID No:1. Новый штамм ЦВС2 был депонирован в Китайском центре коллекции типовых культур (CCTCC) 5 ноября 2011 г. под номером доступа V201117.

Второй аспект настоящего изобретения относится к иммуногенной композиции, содержащей новый штамм ЦВС2 (штамм ЦВС2 Н). В одном предпочтительном варианте осуществления иммуногенная композиция представляет собой вакцину, содержащую инактивированный вирус или аттенуированный вирус нового штамма ЦВС2 (штамма ЦВС2 Н) и фармацевтически приемлемый носитель. Однако типы вакцины включают без ограничения инактивированную вакцину, живую (аттенуированную) вакцину (путем ослабления вируса), субъединичную вакцину, ДНК-вакцину и другие вакцины, полученные и произведенные из нового штамма ЦВС2 (штамма ЦВС2 Н) или из ДНК или аминокислотных последовательностей нового штамма ЦВС2 (штамма ЦВС2 Н).

Способ инактивации (или инактивирующая обработка) настоящего изобретения включает без ограничения обработку инактивирующим реагентом, тепловую обработку и другие способы обработки, известные специалисту в данной области. Инактивирующие реагенты включают без ограничения формальдегид, параформальдегид, бета-пропиолактон (BPL), бинарный этиленимин (BEI) или другие инактивирующие реагенты, пригодные для настоящего изобретения.

Фармацевтически приемлемые носители включают без ограничения растворитель, эмульгатор, суспендирующее вещество, деструктор, связующее вещество, наполнитель, стабилизатор, хелатообразователь, разбавитель, загуститель, консервант, смазывающее вещество, поверхностно-активное вещество, адъювант или другие пригодные носители.

Адъювант включает без ограничения масляный адъювант (такой как минеральное масло, расти-

тельное масло, животный жир, полный адъювант Фрейнда, неполный адъювант Фрейнда и т.д.), водный адъювант (такой как гидроксид алюминия), двухфазный адъювант для образования эмульсий (такой как вода в масле в воде, в/м/в, эмульсионный адъювант), биологический адъювант (такой как CpG-олигонуклеотид и токсин) и т.д. Двухфазный адъювант для образования эмульсий включает поверхностно-активное вещество и маслянистое вещество. Поверхностно-активное вещество представляет собой одно или несколько веществ, выбранных из группы, включающей сложный эфир сорбита и жирной кислоты; концентрат сложного эфира сорбита и жирной кислоты и этиленоксида (или пропиленоксида); сложный эфир маннита и жирной кислоты; концентрат сложного эфира маннита и жирной кислоты и этиленоксида (или пропиленоксида); сложный эфир модифицированного маннита и жирной кислоты с гидрофильной группой, которая представляет собой одну или несколько групп, выбранных из группы, включающей карбоновую кислоту, амин, амид, спирт, полиол, простой эфир и оксид; сложный эфир ангидроманнита и жирной кислоты; сложный эфир модифицированного ангидроманнита и жирной кислоты с гидрофильной группой, которая представляет собой одну или несколько групп, выбранных из группы, включающей карбоновую кислоту, амин, амид, спирт, полиол, простой эфир и оксид; сложный эфир сахарозы и жирной кислоты; концентрат сложного эфира сахарозы и жирной кислоты и этиленоксида (или пропиленоксида); сложный эфир глицерина и жирной кислоты; концентрат сложного эфира глицерина и жирной кислоты и этиленоксида (или пропиленоксида); концентрат жирной кислоты и этиленоксида (или пропиленоксида); концентрат жирного спирта и этиленоксида (или пропиленоксида) и глицерофосфолипид. Маслянистое вещество представляет собой одно или больше одного веществ, выбранных из группы, включающей минеральное масло, растительное масло и животный жир.

Иммуногенная композиция настоящего изобретения дополнительно содержит по меньшей мере один антиген патогена. Антигены патогенов включают без ограничения антиген вируса свиного гриппа (SIV), антиген вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней (PRRSV), антиген микоплазмы, антиген парвовируса свиней (PPV), антиген рожи свиней и антиген вируса псевдобешенства (болезни Ауески). Типы антигенов патогенов включают без ограничения рекомбинантные белки, субъединичные белки, патогены с дефектом гена, антигены инактивированных патогенов и т.д.

Третий аспект настоящего изобретения относится к способу защиты свиней от инфекции ЦБС2, который включает введение иммунологически эффективной дозы указанной иммуногенной композиции ЦБС2 свинье для повышения ее иммунитета против инфекции ЦБС2, снижения тяжести вирусемии и клинических симптомов, а также повышения уровня выживаемости и массы тела.

Четвертый аспект настоящего изобретения относится к антителу к ЦБС2, полученному из нового штамма ЦБС2 (штамма ЦБС2 Н). Антитело включает без ограничения моноклональные антитела, поликлональные антитела и полученные способами генной инженерии антитела. В одном предпочтительном варианте осуществления антитело представляет собой поликлональное антитело, полученное посредством инъекции животному нового штамма ЦБС2 (штамма ЦБС2 Н). В другом предпочтительном варианте осуществления антитело представляет собой моноклональное антитело, полученное посредством скрининга библиотеки гибридом моноклональных антител.

Пятый аспект настоящего изобретения относится к фрагментам ДНК нового штамма ЦБС2 (штамма ЦБС2 Н). Фрагменты ДНК имеют нуклеотидные последовательности SEQ ID No: 1, 2, 4 и 6. Применения фрагментов ДНК включают без ограничения производство ДНК-вакцины и субъединичной вакцины и конструирование праймеров или зондов для обнаружения ЦБС2 в образце. В одном предпочтительном варианте осуществления фрагмент ДНК представляет собой последовательность полноразмерного генома (SEQ ID No: 1) нового штамма ЦБС2 (штамма ЦБС2 Н). В другом предпочтительном варианте осуществления фрагменты ДНК представляют собой открытые рамки считывания (ORF) нового штамма ЦБС2 (штамма ЦБС2 Н), которые включают без ограничения

открытую рамку считывания 1 (ORF1), имеющую нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 2, которая кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID No: 3,

открытую рамку считывания 2 (ORF2), имеющую нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 4, которая кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID No: 5, и

открытую рамку считывания 3 (ORF3), имеющую нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 6, которая кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID No: 7.

Шестой аспект настоящего изобретения относится к набору для анализа на ЦБС2. Набор для анализа применяется для обнаружения ЦБС2 или антител к ЦБС2 в исследуемом образце. Набор для анализа содержит без ограничения (1) антиген нового штамма ЦБС2 (штамма ЦБС2 Н), в одном предпочтительном варианте осуществления антиген нанесен на планшет с антигеном и инактивирован инактивирующим реагентом; (2) моноклональное или поликлональное антитело, полученное из нового штамма ЦБС2 (штамма ЦБС2 Н); (3) полученный(ое) способами генной инженерии антиген или антитело, происходящие из последовательности полноразмерного генома (SEQ ID No: 1) или нуклеотидных фрагментов (SEQ ID No: 2, 4 и 6) нового штамма ЦБС2 (штамма ЦБС2 Н); и (4) полинуклеотид, полученный из последовательности полноразмерного генома (SEQ ID No: 1) или нуклеотидных фрагментов (SEQ ID No: 2, 4 и 6) нового штамма ЦБС2 (штамма ЦБС2 Н). Полинуклеотид включает без ограничения праймеры и зонды. В одном предпочтительном варианте осуществления полинуклеотид представляет собой праймер, кото-

рый может быть использован для обнаружения нового штамма ЦВС2 (штамма ЦВС2 Н), и при этом праймеры имеют нуклеотидные последовательности SEQ ID No: 8-11.

Типы набора для анализа включают без ограничения набор для твердофазного иммуносорбентного анализа (ELISA), набор с микрочипом, набор для иммунофлуоресцентного анализа (IFA), набор для полимеразной цепной реакции (PCR) и другие наборы для анализов, полученные на основе нового штамма ЦВС2 (штамма ЦВС2 Н). В одном предпочтительном варианте осуществления набор для анализа содержит, по меньшей мере, планшет с антигеном, который включает новый штамм ЦВС2 (штамм ЦВС2 Н), и при этом набор для анализа может быть использован для обнаружения антител к ЦВС2 в исследуемом образце.

Новый штамм ЦВС2 (штамм ЦВС2 Н) настоящего изобретения включает все субкультивируемые пассажи и мутанты, которые имеют сходные вирусные характеристики, геном или патогенность, как у нового штамма ЦВС2 (штамма ЦВС2 Н).

Выражения "ДНК (нуклеиновая кислота)", "полинуклеотид", "аминокислота", "пептид", "полипептид" в настоящем изобретении могут встречаться в естественном, выделенном, рекомбинантном или синтетическом состоянии.

Выражения "предупреждение", "защита" и "против" относятся к результатам наблюдения, которые сравнивали с результатами наблюдения в отношении невакцинированных раскрытой иммуногенной композицией животных, при этом вакцинированные раскрытой иммуногенной композицией животные могут обладать повышенной способностью противостоять инфекции ЦВС2 и родственным заболеваниям, возникшим в результате инфекции ЦВС2.

Значение технических и научных выражений, как описано в данном документе, может быть четко понято специалистом в данной области.

Настоящее изобретение более подробно описано в нижеследующих иллюстративных примерах. Хотя примеры могут представлять только выбранные варианты осуществления настоящего изобретения, следует понимать, что нижеследующие примеры являются иллюстративными, а не ограничивающими.

Краткое описание графических материалов

- Фиг. 1А - неинфицированные клетки РК-15, культивируемые в течение 4 дней (масштаб (100×));
- фиг. 1В - клетки РК-15, инфицированные штаммом ЦВС2 Н, культивируемые в течение 4 дней (масштаб (100×));
- фиг. 2 - филогенетический анализ геномной последовательности штамма ЦВС2 Н;
- фиг. 3 - выравнивание аминокислотной последовательности ORF2 (SEQ ID No: 5) штамма ЦВС2 Н и трех других аминокислотных последовательностей, которые имеют наибольшие сходства последовательностей с аминокислотной последовательностью ORF2 штамма ЦВС2 Н в базе данных GenBank Национального центра биотехнологической информации (NCBI);
- фиг. 4 - выравнивание аминокислотной последовательности ORF2 штамма ЦВС2 Н и аминокислотной последовательности ORF2 (доступ в GenBank: ADD25772) прототипа ЦВС2 2d (доступ в GenBank: ZJ0955b);
- фиг. 5 - результаты ELISA ЦВС2 образцов сыворотки, полученных в различные моменты времени от мышей, вакцинированных инактивированной вакциной на основе штамма ЦВС2 Н;
- фиг. 6 - результаты IFA ЦВС2 образцов сыворотки, полученных в различные моменты времени от поросят, вакцинированных инактивированной вакциной на основе нового штамма ЦВС2 Н;
- фиг. 7 - массы тел поросят, вакцинированных инактивированной вакциной на основе штамма ЦВС2 Н.

Подробное описание предпочтительных вариантов осуществления

Пример 1. Выделение и идентификация ЦВС2.

1. Источник и выделение посевного вируса.

Образцы ткани отбирали из легких и лимфоузлов поросят на свиноферме в Синьчжу, Тайвань. У данных поросят 8-недельного возраста проявлялись клинические симптомы синдрома мультисистемного истощения после отъема (PWMS). Образцы легких и лимфоузлов собирали и замораживали при -70°C.

Для выделения вирусов образцы тканей гомогенизировали и 0,2 мл каждого гомогената инокулировали в монослой клеток РК-15 или их производные клеточные линии, которые не содержат цирковируса свиней (ЦВС), вирус классической чумы свиней (CSFV), аденовирус свиней, парвовирус свиней, вирус репродуктивно-респираторного синдрома свиней (PRRSV), вирус псевдобешенства (PRV), вирус везикулярной болезни свиней (SVDV), микоплазму и бактерии. После инкубирования в течение 1 ч при 37°C, 5% CO₂, клетки три раза отмывали стерильным фосфатно-буферным солевым раствором (PBS). Затем в течение 4 ч клетки инкубировали в среде MEM, содержащей 2% FBS, при 37°C, 5% CO₂. После этого среду MEM удаляли и клетки инкубировали с 300 мМ D-глюкозамина в течение 30 мин. Затем клетки три раза отмывали стерильным PBS и инкубировали в течение 72 ч в среде MEM, содержащей 8% FBS, при 37°C, 5% CO₂. В заключение, культуры клеток исследовали на ЦВС2 при помощи иммунофлуоресцентного анализа (IFA).

Протокол IFA описан следующим образом.

Во-первых, клетки образцов три раза отмывали стерильным PBS, 5 мин каждый раз, и фиксировали с помощью 75 мкл 80% ацетона в течение 30 мин при 4°C. Затем ацетон удаляли и клетки отмывали три раза стерильным PBS, 5 мин каждый раз. После этого клетки инкубировали с 75 мкл противовирусной поликлональной иммунной сыворотки к цирковирусу свиней (VMRD®) (первичное антитело, разведение 1:1500 в PBS) в течение 30 мин при 37°C. Затем удаляли иммунную сыворотку и клетки отмывали три раза стерильным PBS, 5 мин каждый раз. После этого клетки инкубировали с 75 мкл конъюгата FITC-IgG кролика к антителу свиньи (целая молекула) (Sigma, F1638) (вторичное антитело, разведение 1:1000 в PBS) в течение 30 мин при 37°C. Затем антитело удаляли и клетки отмывали три раза стерильным PBS, 5 мин каждый раз. В заключение, каждый из образцов клеток помещали в 96-луночный культуральный планшет в 200 мкл PBS для флуоресцентного микроскопического исследования.

Вирус, который инфицировал клетки и дал наибольшее количество положительных результатов IFA, выбирали в качестве посевного вируса. Затем определяли геномную последовательность посевного вируса, как указано в SEQ ID No: 1. Последовательность выравнивали, анализировали и в заключение утверждали как новый штамм ЦВС2 (анализы и результаты выравнивания последовательности описаны ниже). Данный новый штамм ЦВС2 назвали штаммом ЦВС2 Н.

2. Пересев посевного вируса.

Свежеполученные клетки РК-15 или их производные клеточные линии инокулировали новым штаммом ЦВС2 (штаммом ЦВС2 Н), и вирус, полученный из инокулированных клеток, представлял собой пассаж 1 (P₁) штамма ЦВС2 Н. Супернатант культуры клеток, который содержал P₁ штамма ЦВС2 Н, собирали, разводили (1:2) и инокулировали в свежеполученные клетки РК-15 или их производные клеточные линии. После этого инокулированные клетки инкубировали в течение 3 дней, супернатант культуры клеток, который содержал пассаж 2 (P₂) штамма ЦВС2 Н, собирали, разводили (1:2) и инокулировали в свежеполученные клетки РК-15 или их производные клеточные линии. Инокулированные клетки инкубировали в течение 3 дней и в дальнейшем собирали супернатант культуры клеток, который содержал пассаж 3 (P₃) штамма ЦВС2 Н. Процесс повторяли еще три раза для получения пассажа 6 (P₆) штамма ЦВС2 Н.

Во время процесса культивирования клеток РК-15 или их производных клеточных линий, которые инокулированы штаммом ЦВС2 Н, в инокулированных клетках наблюдали цитопатический эффект (CPE), как показано на фиг. 1В. Кроме того, на фиг. 1А показана морфология и рост неинокулированных клеток РК-15 через 4 дня культивирования (100×), тогда как на фиг. 1В показана морфология и рост инокулированных штаммом ЦВС2 Н клеток РК-15 через 4 дня культивирования (100×). Подобным образом, CPE, наблюдаемый в производных клеточных линиях РК-15, которые инокулированы штаммом ЦВС2 Н, на фиг. 1В может быть приведен для сравнения.

3. Идентификация посевного вируса.

Геном штамма ЦВС2 Н, выделенного в настоящем изобретении, имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 1. Нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 1 сравнивали с последовательностями в базе данных GenBank Национального центра биотехнологической информации (NCBI). Результаты сравнения показали, что штамм ЦВС2 Н был на 99% гомологичным некоторым последовательностям ЦВС2 (табл. 1), но в базе данных не было последовательности, идентичной (гомологичной на 100%) геномной последовательности штамма ЦВС2 Н (SEQ ID No: 1). Таким образом, на основании результатов выравнивания показано, что вирус, выделенный в настоящем изобретении, штамм ЦВС2 Н, принадлежит к семейству ЦВС2 и является новым штаммом. На основании филогенетического анализа геномной последовательности штамма ЦВС2 Н, представленного на фиг. 2, показано, что штамм ЦВС2 Н является членом подгруппы ЦВС2 2d.

Таблица 1

Результаты сравнения геномной ДНК штамма ЦБС2 Н и последовательностей в базе данных GenBank NCBI с использованием NCBI BLAST

Номер доступа	Описание	Максимальный показатель	Суммарный показатель	Максимальная идент.
HM038017.1	цирковирус свиней 2, штамм BDH	3236	3236	99%
GU001710.1	цирковирус свиней 2, изолят BJ0901b	3236	3236	99%
EF675230.1	цирковирус свиней 2, штамм GXHZ-1	3236	3236	99%
GU083583.1	цирковирус свиней 2, изолят ЦБС2С53	3230	3230	99%
GQ359002.1	цирковирус свиней 2, штамм GX0839	3230	3230	99%
FJ644929.1	цирковирус свиней 2, изолят GL08	3230	3230	99%
FJ426398.1	цирковирус свиней 2, штамм GXWZ-1	3230	3230	99%
HM038030.1	цирковирус свиней 2, штамм АН	3229	3229	99%
HM161710.1	цирковирус свиней 2, изолят ВХ-2	3225	3225	99%

Анализ показывает, что штамм ЦБС2 Н настоящего изобретения имеет открытые рамки считывания (ORF) 1, 2 и 3. ORF1 имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 2, которая кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID No: 3. ORF2 имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 4, которая кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID No: 5. ORF3 имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 6, которая кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID No: 7.

Поскольку капсидный белок, кодируемый геном ORF2 ЦБС2, по всей вероятности, являлся бы антигеном, который индуцирует выработку нейтрализующих антител, то нуклеотидную последовательность (SEQ ID No: 4) и аминокислотную последовательность (SEQ ID No: 5) ORF2 штамма ЦБС2 Н сравнивали с последовательностями в базе данных GenBank NCBI. Результаты сравнения показали, что в базе данных GenBank NCBI нет последовательности, идентичной (гомологичной на 100%) нуклеотидной последовательности (SEQ ID No: 4) или аминокислотной последовательности (SEQ ID No: 5) ORF2 штамма ЦБС2 Н. Наибольшая гомология между аминокислотной последовательностью ORF2 штамма ЦБС2 Н (SEQ ID No: 5) и последовательностями в базе данных Genbank составляет 98%. На фиг. 3 показано выравнивание аминокислотной последовательности ORF2 штамма ЦБС2 Н (SEQ ID No: 5) и верхние три последовательности с наибольшей гомологией, при этом выравнивание указывает на то, что 6 аминокислот SEQ ID No: 5 отличаются от верхних трех последовательностей. Аминокислотную последовательность (SEQ ID No: 5) ORF2 штамма ЦБС2 Н дополнительно сравнивали с аминокислотной последовательностью (доступ в GenBank: ADD25772) ORF2 прототипа ЦБС2 подгруппы 2d (доступ в GenBank: ZJ0955b), и результаты, показанные на фиг. 4, указывают на то, что в двух последовательностях различаются 7 аминокислот, и две последовательности обладают гомологией 97%.

В дополнение нуклеотидные последовательности (SEQ ID No: 2 и 6) и аминокислотные последовательности (SEQ ID No: 3 и 7) ORF1 и ORF3 штамма ЦБС2 Н сравнивали с последовательностями в базе данных GenBank NCBI. Результаты сравнения показали, что в базе данных GenBank NCBI нет последовательности, идентичной (гомологичной на 100%) нуклеотидным последовательностям или аминокислотным последовательностям ORF1 или ORF3 штамма ЦБС2 Н.

Исследования указывают на то, что штамм ЦБС2 Н настоящего изобретения является новым штаммом цирковируса свиней 2 типа (ЦБС2). Новый штамм ЦБС2 был депонирован в Китайском центре коллекции типовых культур (CCTCC) 5 ноября 2011 г. под номером доступа V201117.

Пример 2. Получение вакцины на основе штамма ЦБС2 Н.

1. Культивирование вируса.

Клетки РК-15, которые не содержали цирковирус свиней (ЦВС), вирус классической чумы свиней (CSFV), аденовирус свиней, парвовирус свиней, вирус репродуктивно-респираторного синдрома свиней (PRRSV), вирус псевдобешенства (PRV), вирус везикулярной болезни свиней (SVDV), микоплазму и бактерии, культивировали в ростовой среде для культур клеток (среда MEM, содержащая 5% FBS, pH 7,2±0,2) при 37°C, 5% CO₂. После образования монослоя клеток РК-15 клетки РК-15 разделяли 0,2% трипсином-ЭДТА и суспендировали в поддерживающей среде для культур клеток (среда MEM, содержащая 2% FBS, pH 7,4±0,2) для подсчета клеток. Затем клетки разбавляли ростовой средой для культуры клеток до конечной концентрации 3,0×10⁵ клеток/мл и распределяли по роллер-флаконам для культивирования в течение 3-4 дней при 37°C, чтобы добиться слившегося монослоя. После этого среду для куль-

тур клеток удаляли из роллер-флаконов и клетки отмывали PBS. Исходный раствор вируса штамма ЦВС2 Н развели поддерживающей средой для культур клеток до конечной концентрации $10^{4,0}$ TCID₅₀/мл и инокулировали им монослой клеток РК-15 в роллер-флаконах. Для культивирования вируса инфицированные клетки инкубировали в течение 48-96 ч при 37°C. Титр вируса штамма ЦВС2 Н контролировали с помощью иммунофлуоресцентного анализа (IFA). Затем для получения раствора вируса штамма ЦВС2 Н собирали супернатант культур клеток, когда титр вируса достигал $10^{6,0}$ TCID₅₀/мл или выше, или когда цитопатический эффект (CPE) достигал 70-80%.

2. Способ инаktivации.

37 вес.% формальдегида добавляли к раствору вируса штамма ЦВС2 Н, полученному на вышеуказанном этапе, до конечной концентрации 0,2% (вес./об.), а затем вирус инаktivировали путем непрерывного встряхивания с формальдегидом в течение по меньшей мере 24 ч, предпочтительно 48 ч при 37°C. После того как вирус был полностью инаktivирован, раствор вируса штамма ЦВС2 Н, содержащий формальдегид, центрифугировали для удаления формальдегида. Затем центрифугированный раствор вируса суспендировали в буферном растворе, таком как дистиллированная вода или фосфатно-буферный солевой раствор (PBS), и суспендированный раствор вируса, представляющий собой инаktivированный исходный раствор антигена инаktivированной вакцины на основе штамма ЦВС2 Н, хранили при 4°C для дальнейшего применения.

3. Получение инаktivированной вакцины на основе штамма ЦВС2 Н.

Стерилизованный двухфазный адьювант для образования эмульсий, такой как масляный адьювант вакцины MONTANIDE™ ISA 206 для эмульсии вода в масле в воде (в/м/в), добавляли к инаktivированному исходному раствору антигена инаktivированной вакцины на основе штамма ЦВС2 Н до конечной концентрации 50% (об./об.) в резервуаре для эмульсии для смешивания и эмульгирования. Эмульгированный продукт представляет собой инаktivированную вакцину на основе штамма ЦВС2 Н с маслом-адьювантом.

Другие пригодные адьюванты для инаktivированной вакцины ЦВС2 настоящего изобретения, известные специалистам в данной области, также могут применяться в настоящем изобретении в качестве адьювантов. Двухфазный адьювант для образования эмульсий (такой как эмульсионный адьювант вода в масле в воде), применяемый в данном примере, может быть заменен без ограничения масляным адьювантом (таким как минеральное масло, растительное масло, животный жир, полный адьювант Фрейнда, неполный адьювант Фрейнда и т.д.), водным адьювантом (таким как гидроксид алюминия) или биологическим адьювантом (таким как CpG-олигодеоксинуклеотид и токсин).

Пример 3. Получение набора для анализа на ЦВС2 - 1.

Набор для анализа на ЦВС2 в данном примере представляет собой планшет с антигеном, содержащий вирусный антиген штамма ЦВС2 Н. Во-первых, клетки РК-15 или их моноклональные клеточные линии культивировали, трипсинизировали и повторно суспендировали в среде для культур клеток при конечной концентрации 2×10^5 клеток/мл. 50 мкл клеток РК-15 и 50 мкл исходного раствора вируса штамма ЦВС2 Н (1×10^3 TCID₅₀/мл) добавляли в каждую лунку 96-луночного планшета для культур клеток (плоское дно) и инкубировали в течение 72 ч при 37°C, 5% CO₂. Клетки, инфицированные штаммом ЦВС2 Н, дважды отмывали стерильным PBS и фиксировали 80% ацетоном в течение 15 мин при комнатной температуре. Затем удаляли ацетон и три раза отмывали клетки стерильным PBS. После этого планшет переворачивали и потом просушивали в термостате при 37°C. Просушенный планшет представляет собой планшет с антигеном, содержащий вирусный антиген штамма ЦВС2 Н, и может быть использован в анализе ELISA для определения количества антител к ЦВС2 в образце сыворотки. Затем планшет хранили при -20°C для дальнейшего применения (Tischer с соавт., 1995).

Пример 4. Получение набора для анализа на ЦВС2 - 2.

Набор для анализа на ЦВС2 в данном примере представляет собой планшет с антигеном, содержащий рекомбинантный капсидный белок штамма ЦВС2 Н. Рекомбинантный капсидный белок представляет собой антиген планшета с антигеном. Капсидный белок кодируется геном ORF2 штамма ЦВС2 Н и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 5.

Нуклеотидную последовательность ORF2 штамма ЦВС2 Н сначала амплифицировали путем полимеразной цепной реакции (ПЦР). Вирусную ДНК штамма ЦВС2 Н применяли в качестве матричной ДНК в реакции ПЦР. Прямой праймер и обратный праймер конструировали для амплификации нуклеотидной последовательности ORF2. Прямой праймер в данном примере имеет сайт расщепления HindIII, а обратный праймер в данном примере имеет сайт расщепления XhoI. Праймеры могут быть сконструированы специалистами в данной области согласно нуклеотидной последовательности ORF2 (SEQ ID No: 4) настоящего изобретения. Для реакции ПЦР ПЦР-смесь, содержащую 8 мкл матричной ДНК, 5 мкл 10× буфера ПЦР (MDBio, Inc.), 8 мкл dNTP (каждого по 1,25 мМ), 1 мкл каждого праймера (каждого по 50 мкМ) и 0,5 мкл Pfu ДНК-полимеразы (MDBio, Inc.), в конечном объеме 50 мкл помещали в реактор GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems). Реакцию ПЦР начинали с исходного этапа предварительного нагревания ПЦР-смеси при 95°C в течение 5 мин и амплификацию ДНК выполняли за 25 циклов при следующих параметрах: денатурирование при 95°C в течение 30 с, отжиг при 55°C в течение 30 с и

удлинение при 72°C в течение 30 с. Реакцию ПЦР завершали этапом конечной достройки в течение 5 мин при 72°C. Продукты ПЦР очищали при помощи набора для PCR-M Clean Up (Viogen).

После очистки продукты ПЦР встраивали в вектор экспрессии pET24a. Очищенные продукты ПЦР и вектор экспрессии pET24a (Novagen) расщепляли двумя ферментами рестрикции (New England Biolabs), HindIII и XhoI, соответственно, в течение 8 ч при 37°C. После реакции расщепления ферментами рестрикции расщепленные продукты ПЦР и вектор экспрессии pET24a очищали с помощью набора для PCR-M Clean Up (Viogen) соответственно. Очищенные продукты ПЦР пришивали к очищенному вектору экспрессии pET24a и продукт сшивания трансформировали в клетку-хозяина (*E. coli*). Отбирали трансформанты, а клон с соответствующей последовательностью идентифицировали путем секвенирования ДНК и обозначили как pET24a-ORF2.

Бактерии с pET24a-ORF2 культивировали в 2 мл бульона LB в течение 16-18 ч при 37°C, а затем культуру добавляли в свежий бульон LB, содержащий 25 мкг/мл канамицина, в соотношении 1:50 и культивировали при 37°C, 200 об/мин. Когда оптическая плотность культуры при длине волны 600 нм (OD600) достигала 0,6, то в культуру добавляли изопропил-β-D-тиогалактозид (IPTG) до конечной концентрации 1 mM и инкубировали культуру в течение еще 6 ч при 37°C, 200 об/мин. 1 мл культуры центрифугировали (10000×g) и затем при помощи B-PERTM Bacterial Protein Extraction (Pierce Protein Research Products) определяли, являлись рекомбинантные белки растворимыми белками или вирусным включением. 40 мкл реагента добавляли к центрифугированным бактериям и взбалтывали на вихревой мешалке в течение 1 мин. Смесь затем центрифугировали при 10000×g. Белки, суспендированные в супернатанте, представляли собой растворимые белки, тогда как белки в нижней части (осадок) представляли собой тельца включения. Растворимые белки растворяли в 1× буфере для образца для анализа SDS-PAGE, тогда как вирусные включения смешивали с 2× буфером для образца для анализа SDS-PAGE. Оба образца кипятили в течение 20 мин и затем центрифугировали. Белки в супернатанте обоих образцов разделяли с помощью 15% SDS-PAGE для анализа экспрессии рекомбинантного капсидного белка штамма ЦВС2 Н. После анализов рекомбинантные капсидные белки штамма ЦВС2 Н применяли для получения планшетов с антигеном.

Рекомбинантный капсидный белок штамма ЦВС2 Н разводили PBS (pH 9,6) до конечной концентрации 10 мкг/мл. Разведенный рекомбинантный белок наносили на 96-луночный планшет для культуры клеток (плоское дно) (100 мкл/лунка) при 37°C в течение 2 ч и затем при 4°C в течение ночи. После этого каждую лунку планшета отмывали три раза PBS в течение 3-5 мин и добавляли 200 мкл 0,15% блокирующего раствора BSA для блокирования рекомбинантного белка в течение 2 ч при 37°C. Затем каждую лунку планшета отмывали PBS и планшет хранили при 4°C для дальнейшего применения.

Пример 5. Получение антител к штамму ЦВС2 Н.

1. Поликлональные антитела к штамму ЦВС2 Н.

Инактивированный штамм ЦВС2 Н с достаточным титром вируса смешивали с подходящим адъювантом, таким как полный адъювант Фрейнда. Прежде всего, смесью заражали животных, таких как мыши, свиньи, козы и кролики, а при необходимости после соответствующего периода времени (такого как 2-3 недели) можно было провести вторую иммунизацию. После еще одного соответствующего периода времени (такого как 2-3 недели) сыворотку зараженных животных собирали как поликлональные антитела к штамму ЦВС2 Н.

При необходимости поликлональные антитела к штамму ЦВС2 Н могут быть конъюгированы с хромогенными или флуоресцентными репортерами.

При необходимости зараженные животные могут быть дополнительно вакцинированы для повышения титра антител после первой или второй иммунизации.

Животные, которые могут быть заражены для выработки поликлональных антител к штамму ЦВС2 Н, включают без ограничения мышей, кроликов, птиц (яйца), свиней, коз, крупный рогатый скот и водных животных.

2. Моноклональные антитела к штамму ЦВС2 Н.

Инактивированным штаммом ЦВС2 Н с достаточным титром вируса или специфическим фрагментом антигена (например, ORF2) штамма ЦВС2 Н в первую очередь заражали животное (такое как мышь). При необходимости инактивированный вирус или фрагмент антигена может быть смешан с подходящим адъювантом, таким как полный адъювант Фрейнда. Также при необходимости после соответствующего периода времени (такого как 2-3 недели) может быть проведена вторая иммунизация. После еще одного соответствующего периода времени (такого как 2-3 недели) сыворотку зараженного животного брали для оценки, являлись ли клетки селезенки животного пригодными для выработки моноклональных антител к штамму ЦВС2 Н. Слияние пригодных клеток селезенки, взятых у зараженных животных, и клеток миеломы (таких как клеточная линия FO и клеточная линия NS) осуществляли с применением полиэтиленгликоля (PEG, такого как PEG1500). Гибридомы, которые вырабатывают антитела соответствующей специфичности, отбирали из слитых клеток и затем субклонировали для того, чтобы они стали гибридомами, пригодными для выработки моноклональных антител к штамму ЦВС2 Н.

Моноклональные антитела к штамму ЦВС2 Н можно применять в наборах для анализов, при лече-

нии или в пищевой или кормовой добавке для повышения иммунитета у животных.

Пример 6. Испытание эффективности инактивированной вакцины на основе ЦВС2 - 1.

1. Протокол вакцинации и отбор образцов.

Мышей Balb/c пятинедельного-шестинедельного возраста без особых патогенов (SPF) случайно разделяли на 4 группы по 15 мышей в каждой. Анализ ELISA показал, что все 60 мышей были отрицательны в отношении антител к ЦВС2. Мышам из 3 вакцинных групп (групп 1-3) делали внутримышечную инъекцию инактивированной вакцины на основе штамма ЦВС2 Н по 0,2 мл из 3 различных партий соответственно. Спустя две недели после первой иммунизации (р.и.) мышей из 3 вакцинных групп повторно иммунизировали такой же дозой вакцины из 3 различных партий. Мышей из группы 4 не вакцинировали, и они служили в качестве отрицательного контроля. На 2, 3, 4 и 5 неделях после первой иммунизации (р.и.) случайно отбирали по 5 мышей из каждой группы для отбора образцов сыворотки. Все образцы сыворотки анализировали с помощью ELISA.

2. Обнаружение антител к ЦВС2 с помощью ELISA.

Планшеты с антигеном, полученные в примере 3 или 4, в данном примере могут применяться в качестве планшетов для ELISA. Планшеты для ELISA промывали 3 раза 50 ммоль/л PBS (pH 7,2), содержащим 500 мкл/л Tween-20 (т.е. PBST), каждый раз в течение 3-5 мин. Для блокирования планшетов для ELISA в каждую лунку планшетов для ELISA добавляли по 200 мкл 0,15% блокирующего раствора BSA, а затем планшеты для ELISA инкубировали в течение 2 ч при 37°C. После этого планшеты для ELISA промывали PBS. Образцы сыворотки мышей разводили в пятьдесят раз (1:50) с помощью PBS, а затем проводили последовательные 2-кратные разведения. Разведенные образцы сыворотки добавляли в лунки планшетов для ELISA (100 мкл/лунка) и планшеты инкубировали в течение 1 ч при 37°C. После инкубирования планшеты промывали PBS. Затем в лунки добавляли вторичное антитело (такое как вторичное антитело кролика к антителу мыши), конъюгированное с пероксидазой хрена (HRP). После инкубирования в течение 1 ч при 37°C планшеты промывали PBS. Для визуализации результатов в лунки добавляли 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (TMB). После инкубирования реакцию останавливали путем добавления 2 мМ H₂SO₄. Результаты представляли как соотношения положительных-отрицательных (P/N). Соотношение P/N рассчитывали путем деления оптической плотности при 450 нм (OD₄₅₀) данного исследуемого образца на OD₄₅₀ стандартного отрицательного контроля. Соотношения P/N $\geq 2,1$ считали положительными. Максимальными значениями разведений соотношений P/N $\geq 2,1$ считали титры антител из ELISA образцов сыворотки.

В дополнение к HRP и TMB в данном примере также можно применять другие хромогенные репортеры или флуоресцентные метки с такой же функцией, такие как щелочная фосфатаза (AP), 4-метиллумбеллиферилфосфат (4-MUP) и флуоресцеинизотиоцианат (FITC).

3. Результаты.

Через 2 недели после первой иммунизации (р.и.) антитела к штамму ЦВС2 Н обнаружили у всех вакцинированных мышей. После второй иммунизации титры антител из ELISA у вакцинированных мышей достигали 1800-2000 на 35-й день после первой иммунизации (d.p.i.) (фиг. 5). Следовательно, результаты указывали на то, что инактивированная вакцина на основе штамма ЦВС2 Н настоящего изобретения была способна эффективно индуцировать иммунные ответы у мышей.

Пример 7. Испытание эффективности инактивированной вакцины на основе ЦВС2 - 2.

1. Протокол вакцинации и отбор образцов.

Двум здоровым поросётам 5-6-недельного возраста проводили внутримышечное инъекционное введение 1 мл инактивированной вакцины на основе штамма ЦВС2 Н соответственно. Спустя три недели после первой иммунизации (р.и.) поросят повторно иммунизировали такой же дозой вакцины. Образцы сыворотки брали у обоих поросят перед первой иммунизацией (5-6-недельный возраст), перед второй иммунизацией (8-9-недельный возраст) и через 2 недели после второй иммунизации (10-11-недельный возраст). Обоих поросят взвешивали в то самое время, когда делали отбор сыворотки. Все образцы сыворотки анализировали с помощью ELISA.

2. Обнаружение антител к ЦВС2 с помощью ELISA.

Планшеты с антигеном, полученные в примере 3 или 4, в данном примере могут применяться в качестве планшетов для ELISA. Планшеты для ELISA промывали 3 раза 50 ммоль/л PBS (pH 7,2), содержащим 500 мкл/л Tween-20 (т.е. PBST), каждый раз в течение 3-5 мин. Для блокирования планшетов для ELISA в каждую лунку планшетов для ELISA добавляли по 200 мкл 0,15% блокирующего раствора BSA, а затем планшеты для ELISA инкубировали в течение 2 ч при 37°C. После этого планшеты для ELISA промывали PBS. Образцы сыворотки свиней разводили в пятьдесят раз (1:50) с помощью PBS, а затем проводили последовательные 2-кратные разведения. Разведенные образцы сыворотки добавляли в лунки планшетов для ELISA (100 мкл/лунка) и планшеты инкубировали в течение 1 ч при 37°C. После инкубирования планшеты промывали PBS. Затем в лунки добавляли вторичное антитело (такое как вторичное антитело козы к антителу свиньи), конъюгированное с пероксидазой хрена (HRP). После инкубирования в течение 1 ч при 37°C планшеты промывали PBS. Для визуализации результатов в лунки добавляли 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (TMB). После инкубирования реакцию останавливали путем добавления 2

мМ H₂SO₄. Результаты представляли как соотношения положительных-отрицательных (P/N). Соотношение P/N рассчитывали путем деления оптической плотности при 450 нм (OD₄₅₀) данного исследуемого образца на OD₄₅₀ стандартного отрицательного контроля. Соотношения P/N $\geq 2,1$ считали положительными. Максимальными значениями разведений соотношений P/N $\geq 2,1$ считали титры антител из ELISA образцов сыворотки.

3. Результаты.

Через 3 недели после первой иммунизации (р.и.) антитела к штамму ЦВС2 Н обнаружили у обоих вакцинированных поросят. Через 2 недели после второй иммунизации титры антител из ELISA у вакцинированных поросят составляли больше 11000 (табл. 2). Следовательно, результаты указывали на то, что инактивированная вакцина на основе штамма ЦВС2 Н настоящего изобретения была способна эффективно индуцировать иммунные ответы у мышей.

Таблица 2

Титры антител у вакцинированных поросят согласно ELISA			
Момент времени отбора образцов	Перед первой иммунизацией (5-6-недельный возраст)	Перед второй иммунизацией (8-9-недельный возраст)	Через 2 недели после второй иммунизации (10-11-недельный возраст)
Поросенок 1	1	8,490	11,728
Поросенок 2	1	10,263	13,065

Пример 8. Испытание эффективности инактивированной вакцины на основе ЦВС2 - 3.

1. Протокол вакцинации и отбор образцов.

Сорок здоровых поросят 2-недельного возраста случайно разделяли на 4 группы по 10 поросят в каждой. В возрасте 3 недель поросятам из 3 вакцинных групп (групп 1-3) проводили внутримышечную инъекцию инактивированной вакцины на основе штамма ЦВС2 Н по 1 мл из 3 различных партий соответственно. Спустя три недели после первой иммунизации (р.и.) поросят повторно иммунизировали такой же дозой вакцины. Поросят из группы 4 не вакцинировали, и они служили в качестве отрицательного контроля. Образцы сыворотки отбирали у всех поросят за 1 неделю до первой иммунизации (2-недельный возраст) и на 1, 2, 3 и 5 неделях после первой иммунизации (4-, 5-, 6- и 8-недельный возраст соответственно). Всех поросят взвешивали в возрасте 3, 4, 5, 6 и 8 недель. Все образцы сыворотки анализировали с помощью ELISA.

Таблица 3

Схема вакцинации и отбора образцов						
Возраст (недели)	2	3	4	5	6	8
Вакцинация	-	Первая вакцинация	-	-	Вторая вакцинация	-
Тест 1	Отбор крови, IFA	-	Отбор крови, IFA	Отбор крови, IFA	Отбор крови, IFA	Отбор крови, IFA
Тест 2	-	Взвешивание	Взвешивание	Взвешивание	Взвешивание	Взвешивание

2. Обнаружение антител к ЦВС2 с помощью IFA.

Планшеты с антигеном, полученные в примере 3, применяли в данном примере. Планшеты с антигеном брали из -20°C для оттаивания и просушивали при 37°C. Образцы сыворотки свиней разводили в пятьдесят раз (1:50) с помощью PBS, а затем проводили последовательные 2-кратные разведения. Разведенные образцы сыворотки добавляли в лунки планшетов с антигеном (50 мкл/лунка) и планшеты инкубировали в течение 30 мин при 37°C. После инкубирования планшеты промывали 3 раза PBS для удаления необъединенных антител. Затем в лунки добавляли 50 мкл IgG кролика к антителу свиньи, конъюгированного с FITC (1:100, Sigma). После инкубирования в темноте в течение 30 мин планшеты промывали 3 раза PBS и рассматривали под флуоресцентным микроскопом для подсчета титра антител к штамму ЦВС2 Н (Rodriguez-Arrijoja с соавт., 2000).

3. Результаты.

3.1. Титр антител.

Через 2 недели после первой иммунизации (р.и.) образцы сыворотки вакцинированных поросят (в возрасте 5 недель) согласно IFA имели титры приблизительно 600, тогда как образцы сыворотки просят контрольной группы согласно IFA имели титры приблизительно 200 (табл. 4 и фиг. 6). После второй иммунизации согласно IFA титры у вакцинированных поросят (в возрасте 6 недель) резко повышались (согласно IFA титры составляли больше 13000). У вакцинированных поросят в возрасте 8 недель титры согласно IFA составляли больше 46000, тогда как у невакцинированных поросят титры согласно IFA были очень низкими, приблизительно 170.

Таблица 4

Титры антител к штамму ЦВС2 Н у вакцинированных поросят согласно IFA					
Возраст (недели)	2	4	5	6	8
группа 1	800	200	600	13440	48640
группа 2	1680	230	620	20800	46720
группа 3	1100	220	650	18660	49760
группа 4 (контроль)	1880	210	190	300	170

3.2. Прирост массы.

Вакцинированные поросята имели более высокий прирост массы, чем невакцинированные поросята в контрольной группе (табл. 5 и фиг. 7). В возрасте 8 недель вакцинированные поросята были приблизительно на 2 кг тяжелее, чем невакцинированные поросята.

Таблица 5

Массы тел невакцинированных поросят, кг					
Возраст (неделя)	3	4	5	6	8
группа 1	8,4461	9,9512	12,4207	16,1756	20,5284
группа 2	7,3718	9,064	11,7594	15,2267	20,3755
группа 3	7,9564	9,5413	12,3461	15,8561	20,4345
группа 4 (контроль)	7,5906	8,9899	11,724	12,9102	18,6059

Следовательно, результаты указывали на то, что инактивированная вакцина на основе штамма ЦВС2 Н настоящего изобретения была способна эффективно индуцировать иммунные ответы у свиней, повышать иммунитет у свиней и, таким образом, увеличивать прирост массы у свиней.

Пример 9. Испытание эффективности инактивированной вакцины на основе ЦВС2 - 4.

1. Протокол вакцинации и инфицирования ЦВС2.

Поросят в возрасте четырнадцати-шестнадцати дней случайно разделяли на 4 группы по 5 поросят в каждой. Все 20 поросят были отрицательны касательно антител к ЦВС2. Поросятам из 3 вакцинных групп (групп 1-3) проводили внутримышечную инъекцию инактивированной вакцины на основе штамма ЦВС2 Н по 1 мл из 3 различных партий соответственно. Спустя две недели после первой иммунизации (р.и.) поросят повторно иммунизировали такой же дозой вакцины. Поросята из группы 4 были невакцинированными и служили в качестве отрицательного контроля. Через 5 недель после первой иммунизации проводили контрольное заражение всех поросят исходным раствором вируса штамма ЦВС2 Н (вирулентного штамма) в дозе $10^{6,0}$ дозу заражения 50% культуры ткани на мл ($10^{6,0}$ TCID₅₀/мл). Проводили контрольное заражение каждого поросенка интраназально 1 мл исходного раствора вируса и внутримышечно 2 мл исходного раствора вируса. Образцы сыворотки и мазков из носа отбирали через 7, 11, 19 и 25 дней после контрольного заражения для обнаружения вирусемии ЦВС2 с помощью ПЦР.

2. Обнаружение вирусемии ЦВС2 с помощью ПЦР.

Уровни вирусной ДНК во взятых после контрольного заражения ЦВС2 образцах сыворотки свиней определяли с применением ПЦР. Вирусную ДНК выделяли с помощью реагента DNAzol®. Прежде всего к 200 мкл сыворотки добавляли 400 мкл реагента DNAzol® и смесь центрифугировали при 12000 об/мин в течение 15 мин. Супернатант смешивали с двойным объемом абсолютного этанола для преципитации ДНК. Затем смесь центрифугировали при 12000 об/мин в течение 15 мин и удаляли супернатант. Осадок

ДНК отмывали 75% этанолом, центрифугировали при 12000 об/мин в течение 15 мин для удаления этанола и в конечном итоге растворяли в 8 мМ NaOH.

Праймеры для ПЦР, применяемые для обнаружения вирусемии ЦВС2, имеют следующие последовательности:

ЦВС2-F1: 5' GTGAAGTGGTATTTTGGTGCC 3' (SEQ ID No: 8),

ЦВС2-R1: 5' GTCTTCCAATCACGCTTCTGC 3' (SEQ ID No: 9).

Праймеры ЦВС2-F1 (прямой) и ЦВС2-R1 (обратный) применяли для амплификации фрагмента из 284 п.о. из ORF1 ЦВС2. ПЦР-смесь с конечным объемом 25 мкл содержала 1 мкл прямых праймеров, 1 мкл обратных праймеров, 1,5 мкл 25 мМ Mg^{2+} , 2,0 мкл 2,5 мМ dNTP, 2,5 мкл 10× буфера, не содержащего Mg^{2+} , 0,2 мкл Taq ДНК-полимеразы, 11,8 мкл дистиллированной воды и 5 мкл матричной ДНК. Реакцию ПЦР начинали с исходного этапа предварительного нагревания ПЦР-смеси при 95°C в течение 5 мин и амплификацию ДНК выполняли за 38 циклов при следующих параметрах: денатурирование при 94°C в течение 30 с, отжиг при 55°C в течение 30 с и удлинение при 72°C в течение 30 с. Реакцию ПЦР завершали этапом конечной достройки в течение 5 мин при 72°C и затем хранили при 4°C. Продукты ПЦР затем анализировали в 1% агарозном геле и визуализировали с помощью окрашивания бромидом этидия.

Кроме того, другая пара праймеров для ПЦР, применяемая для обнаружения вирусемии ЦВС2, имела следующие последовательности:

ЦВС2-F2: 5' TGTTGGCGAGGAGGGTAATG '3 (SEQ ID No: 10),

ЦВС2-R2: 5' TGGGACAGCAGTTGAGGAGT '3 (SEQ ID No: 11).

Праймеры ЦВС2-F2 (прямой) и ЦВС2-R2 (обратный) применяли для амплификации фрагмента из 676 п.о. из ЦВС2.

3. Вскрытие и исследование на патологии.

На 25 день после контрольного заражения поросят умерщвляли и вскрывали для исследования патологических нарушений в органах и забора образцов лимфатических узлов и легких. Образцы тканей фиксировали в 4% формальдегиде, заливали в парафин и затем делали срезы. Срезы тканей окрашивали гематоксилином и эозином (H&E) и рассматривали под микроскопом.

4. Результаты.

4.1. Оценка вирусемии.

Результаты ПЦР показали, что через 25 дней после контрольного заражения случаев вирусемии у вакцинированных поросят (группы 1-3) было на 40-60% меньше, чем случаев вирусемии у невакцинированных поросят (группа 4) (табл. 6). Результаты показали, что инактивированные вакцины на основе штамма ЦВС2 Н настоящего изобретения были способны индуцировать иммунитет у свиней, уменьшать тяжесть и продолжительность вирусемии у свиней и защищать свиней от инфицирования ЦВС2.

Таблица 6

Вирусемия в сыворотке свиней, определяемая с помощью ПЦР

Группа	До заражения	Дни после контрольного заражения			
		7	11	19	25
группа 1	0/5 ^a	2/5	2/5	1/5	1/5
группа 2	0/5	2/5	1/5	0/5	0/5
группа 3	0/5	3/5	2/5	1/5	1/5
группа 4 (контроль)	0/5	4/5	3/5	4/5	3/5

^a Знаменатели представляют количества подверженных испытанию поросят, а числители представляют количества поросят с вирусемией.

4.2. Гистопатологическое исследование.

Через 25 дней после контрольного заражения поросят умерщвляли и вскрывали. Увеличение паховых, средостенных и брыжеечных лимфоузлов обнаружили у 2 невакцинированных поросят, и срезы лимфатических узлов были бледные. У другого невакцинированного поросенка были не спавшиеся, жесткие легкие, отек легких и покрытые белыми пятнами почки. У всех вакцинированных поросят не обнаружили тяжелых патологических нарушений (табл. 7 и 8).

Таблица 7

Патологические нарушения у вакцинированных и невакцинированных поросят					
Группа	Патологическое нарушение				
	Увеличение лимфоузлов	Отек легких	Покрытые белыми пятнами почки	Слабое увеличение селезенки	Другое нарушение ^b
группа 1	0/5 ^a	0/5	0/5	0/5	0/5
группа 2	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
группа 3	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
группа 4 (контроль)	2/5	1/5	1/5	1/5	0/5

^a Знаменатели представляют количества вскрытых поросят, а числители представляют количества поросят с патологическими нарушениями.

^b Другое нарушение включает слабое увеличение печени или желчного пузыря и кишечный метеоризм.

В табл. 8 показаны результаты микроскопического гистопатологического исследования срезов тканей и результаты оценки вирусемии ЦВС2 с помощью ПЦР. Практически у всех невакцинированных поросят (группа 4) наблюдали гистопатологические изменения в лимфоузлах, такие как лимфопения и инфильтрацию макрофагами, и все взятые образцы лимфоузлов от невакцинированных поросят были положительны на вирусемии PCV2. Кроме того, у 3 невакцинированных поросят наблюдали гистопатологические изменения в легких, такие как инфильтрацию клетками воспаления, и 2 взятых образца тканей легких от невакцинированных поросят были положительны на вирусемии ЦВС2. По сравнению с невакцинированными поросятами у вакцинированных поросят проявлялось значительное уменьшение гистопатологических изменений и вирусемии ЦВС2. Гистопатологические изменения в лимфоузлах наблюдали только у 1 вакцинированного поросенка (свинья № А4) из 15 (группы 1-3), и взятые образцы лимфатических узлов от вакцинированного поросенка (свинья № А4) были единственными положительными на вирусемии ЦВС2 лимфоузлами. Результаты показали, что инактивированная вакцина на основе штамма ЦВС2 Н настоящего изобретения была способна защищать свиней от инфекции ЦВС2, и степень защиты составляла 80-100%.

Таблица 8

Микроскопическое гистопатологическое исследование срезов тканей и оценка вирусемии PCV2 с помощью ПЦР после контрольного заражения ЦВС2

Группа	Свинья №	Лимфатические узлы			Легкие			Частота заболеваний PWMS	Степень защиты (%)
		Тяжелые патологические изменения	Лимфопения	Инфильтрация макрофагами	ПЦР	Тяжелые патологические изменения	Инфильтрация клетками воспаления	ПЦР	
Группа 1	A1	-	-	-	-	-	-	-	-
	A2	-	-	-	-	-	-	-	-
	A3	-	-	-	-	-	-	-	-
	A4	-	+	+	+	-	-	-	+
	A5	-	-	-	-	-	-	-	-
	Промежуточный итог	1/5	1/5	0/5	1/5	0/5	0/5*	0/5*	1/5
Группа 2	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
	B2	-	-	-	-	-	-	-	-
	B3	-	-	-	-	-	-	-	-
	B4	-	-	-	-	-	-	-	-
	B5	-	-	-	-	-	-	-	-
	Промежуточный итог	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	100
Группа 3	C1	-	-	-	-	-	-	-	-
	C2	-	-	-	-	-	-	-	-
	C3	-	-	-	-	-	-	-	-
	C4	-	-	-	-	-	-	-	-
	C5	-	-	-	-	-	-	-	-
	Промежуточный итог	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	100
Группа 4 (контроль)	D1	+	+	+	+	-	+	-	+
	D2	+	+	+	+	+	+	+	+
	D3	-	+	+	+	-	+	+	+
	D4	-	+	+	+	-	-	-	+
	D5	-	+	-	+	-	-	-	+
	Промежуточный итог	2/5	5/5	4/5	5/5	1/5	3/5	2/5	5/5

* Знаменатели представляют количества вскрытых поросят, а числители представляют количества поросят с патологическими нарушениями.

Согласно всех результатов инактивированная вакцина на основе штамма ЦВС2 Н настоящего изобретения эффективно индуцирует иммунитет у свиней, защищает вакцинированных свиней от инфекции

ЦВС2, уменьшает тяжесть и продолжительность вирусемии у свиней, сводит к минимуму клинические симптомы и увеличивает прирост массы тела.

Разумеется, многие изменения и модификации вышеописанного варианта осуществления данного изобретения могут быть выполнены без отклонения от его сущности. Соответственно, изобретение раскрыто для содействия прогрессу в науке и полезных областях техники и должно ограничиваться только объемом формулы изобретения.

Перечень последовательностей

```
<110>  СБК Вирбак Лимитед
<120>  Цирковирус свиней типа 2 (PCV2), содержащая его иммуногенная
        композиция, набор для анализа и их применение
<160>  11
<210>  1
<211>  1767
<212>  ДНК
<213>  Штамм Н цирковируса свиней 2 типа
<220>
<223>  Геномная последовательность штамма Н цирковируса свиней 2 типа
<400>  1
accagcgcac ttcggcagcg gcagcacctc gccagcacct cagcagcaac atgcccagca
60
agaagagtgg aagaagcgga ccccaaccac ataaaagggtg ggtgttcacg ctgaataatc
120
cttcggaaga cgagcgcaag aaaatacggg agctcccaat ctccctatct gattatttta
180
ttgttgccga ggaaggtaat gaggagggcc gaacacccca cctacagggg ttgcctaatt
240
ttgtgaagaa gcaaaactttt aataaagtga agtgggtatct tggtgcccg cgcacatcg
300
agaaaagcgaa aggaacagat cagcagaata aagaatatct cagtaagaa ggcaacttac
360
tgatagaatg tggagctect agatctcaag gacaacggag tgacctctct actgctgtga
420
gtaccttggt ggagagcggg agtctgggtga ccgttcgaga gcagcacctt gtaacgtttg
480
tcagaaaattt ccgcgggctg gctgaacttt tgaaagtga cggaataatg cagaagcgtg
540
attggaagac gaatgtacac gtcattgtgg gccacactgg gtgtggcaaa agcaaatggg
600
ctgctaattt tgcagacccg gaaaccacat actggaaacc acctagaaac aagtgggtgg
660
atggttacca tgggtgaagaa gtggttggtt ttgatgactt ttatggctgg ctgccgtggg
720
atgatctact gagactctgt gatcgatatc ctttgactgt tgagactaaa ggtggaactg
780
```

tacctttttt ggcccgagc attctgatta ccagcaatca gaccccggtg gaatggctact
840

cctcaactgc tgtcccagct gtagaagctc tctatcgag gattacttcc ttggtatttt
900

ggaagaatgc tacagaacaa tccacggagg aagggggcca gtctgtcacc ctttcccccc
960

catgccctga atttccatat gaaataaatt actgagtcct ttttatcact tcgtaattgt
1020

ttttattatt cacttagggg taagtggggg gtctttaaga ttaaattctc tgaattgtac
1080

atacatgggt atacggatat ttagtcctg gtcgtatata ctgttttcga acgcagtgcc
1140

gaggccctaca tgggtctacat ttccagtagt ttgtagtcct agccagagtt gatttctttt
1200

gttattgggt tggaagtaat cgattgtcct atcaaggaca ggtttcgggg taaagtaccg
1260

ggagtggtag gagaagggct gggttatggt atggcgggag gagtagtta cataggggtc
1320

atagggttagg gcattggcct ttgttacaat gttatcatct agaataacag cagtggagct
1380

cactccccctg tcacctggg tgattgggga gcagggccag aattcaacct taaccttctc
1440

tattctgtag tattcaaagg gcacagttag ggggcttgag cccctcctg ggggaagaaa
1500

atcattaata ttaaattctc tcatgtccac attccaggag ggcgttctga ctgtggtttt
1560

cttgacagta taaccgatgg tgcgggagag gcgggtgttg aagatgccat ttttcttct
1620

ccagcggtaa cgggtggcgg ggtggactag ccaggggcgg cggcggagga tctggccaag
1680

atggctgcgg gggcggtgtc ttgctctgcg gtaacgcctc cttggatacg tcatcgctga
1740

aaacgaaaga agtgcgctgt aagtatt
1767

<210> 2
<211> 945
<212> ДНК
<213> Штамм Н цирковируса свиней 2 типа
<220>
<223> Последовательность ДНК открытой рамки считывания 1 (ORF1) штамма Н цирковируса свиней 2 типа

<400> 2

atgcccagca agaagagtgg aagaagcggg ccccaaccac ataaaagggt ggtgttcacg
60

ctgaataatc cttccgaaga cgagcgcaag aaaatacggg agctcccaat ctccctattt
120

gattatttta ttgttgccga ggaaggtaat gaggagggcc gaacacccca cctacagggg
180

ttcgctaatt ttgtgaagaa gcaaaactttt aataaagtga agtggatttt tgggtcccg
240

tgccacatcg agaaagcgaa aggaacagat cagcagaata aagaatattg cagtaaagaa
300

ggcaacttac tgatagaatg tggagctcct agatctcaag gacaacggag tgacctctct
360

actgctgtga gtaccttgtt ggagagcggg agtctggtga ccgttgaga gcagcacct
420

gtaacgtttg tcagaaattt ccgcgggctg gctgaacttt tgaaagttag cgggaaaatg
480

cagaagcgtg attggaagac gaatgtacac gtcattgtgg ggccacctgg gtgtggcaaa
540

agcaaatggg ctgctaattt tgcagaccgg gaaaccacat actggaaacc acctagaaac
600

aagtgggtggg atgggttacca tgggtgaagaa gtggttggtta ttgatgactt ttatggctgg
660

ctgccgtggg atgatctact gagactctgt gatcgatata ctttgactgt tgagactaaa
720

ggtggaactg tacctttttt ggcccgagc attctgatta ccagcaatca gaccccggtg
780

gaatggctact cctcaactgc tgtcccagct gtagaagctc tctatcgag gattacttcc
840

ttggtatttt ggaagaatgc tacagaacaa tccacggagg aagggggcca gtctgtcacc
900

ctttcccccc catgccctga atttccatat gaaataaatt actga
945

<210> 3
<211> 314
<212> БЕЛОК
<213> Штамм Н цирковируса свиней 2 типа

<220>
 <223> Аминокислотная последовательность открытой рамки считывания 1 (ORF1) штамма Н цирковируса свиней 2 типа

<400> 3

Met Pro Ser Lys Lys Ser Gly Arg Ser Gly Pro Gln Pro His Lys Arg
 1 5 10 15

Trp Val Phe Thr Leu Asn Asn Pro Ser Glu Asp Glu Arg Lys Lys Ile
 20 25 30

Arg Glu Leu Pro Ile Ser Leu Phe Asp Tyr Phe Ile Val Gly Glu Glu
 35 40 45

Gly Asn Glu Glu Gly Arg Thr Pro His Leu Gln Gly Phe Ala Asn Phe
 50 55 60

Val Lys Lys Gln Thr Phe Asn Lys Val Lys Trp Tyr Phe Gly Ala Arg
 65 70 75 80

Cys His Ile Glu Lys Ala Lys Gly Thr Asp Gln Gln Asn Lys Glu Tyr
 85 90 95

Cys Ser Lys Glu Gly Asn Leu Leu Ile Glu Cys Gly Ala Pro Arg Ser
 100 105 110

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

Ser Gly Ser Leu Val Thr Val Ala Glu Gln His Pro Val Thr Phe Val
 130 135 140

Arg Asn Phe Arg Gly Leu Ala Glu Leu Leu Lys Val Ser Gly Lys Met
 145 150 155 160

Gln Lys Arg Asp Trp Lys Thr Asn Val His Val Ile Val Gly Pro Pro
 165 170 175

Gly Cys Gly Lys Ser Lys Trp Ala Ala Asn Phe Ala Asp Pro Glu Thr
 180 185 190

Thr Tyr Trp Lys Pro Pro Arg Asn Lys Trp Trp Asp Gly Tyr His Gly
 195 200 205

Glu Glu Val Val Val Ile Asp Asp Phe Tyr Gly Trp Leu Pro Trp Asp
 210 215 220

Asp Leu Leu Arg Leu Cys Asp Arg Tyr Pro Leu Thr Val Glu Thr Lys
 225 230 235 240

Gly Gly Thr Val Pro Phe Leu Ala Arg Ser Ile Leu Ile Thr Ser Asn
 245 250 255

Gln Thr Pro Leu Glu Trp Tyr Ser Ser Thr Ala Val Pro Ala Val Glu
 260 265 270

Ala Leu Tyr Arg Arg Ile Thr Ser Leu Val Phe Trp Lys Asn Ala Thr
 275 280 285

Glu Gln Ser Thr Glu Glu Gly Gly Gln Phe Val Thr Leu Ser Pro Pro
 290 295 300

Cys Pro Glu Phe Pro Tyr Glu Ile Asn Tyr
 305 310

<210> 4
 <211> 705
 <212> ДНК
 <213> Штамм Н цирковируса свиней 2 типа
 <220>
 <223> Последовательность ДНК открытой рамки считывания 2 (ORF2) штамма Н цирковируса свиней 2 типа

<400> 4

atgacgtatc caaggaggcg ttacgcgaga cgaagacacc gccccgcag ccatcttggc
 60

cagatcctcc gccgcgcgcc ctggctagtc caccgccgcc accgttaccg ctggagaagg
 120

aaaaatggca tcttcaacac cgcctctcc cgcaccatcg gttatactgt caagaaaacc
 180

acagtcagaa cgcctoctg gaatgtggac atgatgagat ttaattattaa tgattttctt
 240

ccccaggag ggggtcaag cccctcact gtgcccttg aatactacag aataaggaag
 300

gttaaggttg aattctggcc ctgctcccca atcaccagg gtgacaggg agtgagctcc
 360

actgctgtta ttctagatga taactttgta acaaaggcca atgccctaac ctatgacccc
 420

tatgtaaact actctctcccg ccataccata acccagccct tctctacca cteccggtac
480

tttaccgccga aacctgtcct tgataggaca atcgattact tccaacccaa тааааааааа
540

aatcaactct ggctgagact acaaaactact ggaatgtag accatgtagg cctcggcact
600

gcgttcgaaa acagtatata cgaccaggac tacaatatcc gtataaccat gtatgtacaa
660

ttcagagaat ttaatcttaa agacccccca cttaacccta agtga
705

<210> 5
<211> 234
<212> БЕЛОК
<213> Штамм Н цирковируса свиней 2 типа
<220>
<223> Аминокислотная последовательность открытой рамки считывания 2
(ORF2) штамма Н цирковируса свиней 2 типа

<400> 5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 6
<211> 315
<212> ДНК
<213> Штамм Н цирковируса свиней 2 типа
<220>
<223> Последовательность ДНК открытой рамки считывания 3 (ORF3) штамма Н
цирковируса свиней 2 типу

<400> 6
atgggtaacca tcccaccact tgtttctagg tgggttccag tatgtggttt ccgggtctgc
60

aaaattagca gcccatattgc ttttgcaca ccagggtggc cccacaatga cgtgtacatt
120

cgtcttccaa tcacgcttct gcattttccc gctcactttc aaaagttcag ccagcccgcg
180

gaaattttctg acaaacgtta cagggtgctg ctctgcaacg gtcaccagac tcccgtcttc
240

caacaaggta ctcacagcag tagagaggtc actccgttgt ccttgagatc taggagctcc
300

acattctatc agtaa
315

<210> 7

```

<211> 104
<212> БЕЛОК
<213> Штамм Н цирковируса свиней 2 типа
<220>
<223> Аминокислотная последовательность открытой рамки считывания 3
(ORF3) штамма Н цирковируса свиней 2 типа

<400> 7
Met Val Thr Ile Pro Pro Leu Val Ser Arg Trp Phe Pro Val Cys Gly
1 5 10 15

Phe Arg Val Cys Lys Ile Ser Ser Pro Phe Ala Phe Ala Thr Pro Arg
20 25 30

Trp Pro His Asn Asp Val Tyr Ile Arg Leu Pro Ile Thr Leu Leu His
35 40 45

Phe Pro Ala His Phe Gln Lys Phe Ser Gln Pro Ala Glu Ile Ser Asp
50 55 60

Lys Arg Tyr Arg Val Leu Leu Cys Asn Gly His Gln Thr Pro Ala Leu
65 70 75 80

Gln Gln Gly Thr His Ser Ser Arg Glu Val Thr Pro Leu Ser Leu Arg
85 90 95

Ser Arg Ser Ser Thr Phe Tyr Gln
100

<210> 8
<211> 21
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> Праймер/зонд для обнаружения цирковируса свиней 2 типа

<400> 8
gtgaagtgggt attttggtgc c
21

<210> 9
<211> 21
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> Праймер/зонд для обнаружения цирковируса свиней 2 типа

<400> 9
gttttccaat cacgcttctg c
21

<210> 10
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> Праймер/зонд для обнаружения цирковируса свиней 2 типа

<400> 10
tgttggcgag gagggtaatg
20

<210> 11
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> Праймер/зонд для обнаружения цирковируса свиней 2 типа

<400> 11
tgggacagca gttgaggagt
20

```

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Цирковирус свиней 2 типа (ЦВС2), который содержит геномную последовательность SEQ ID No: 1.
2. Цирковирус свиней 2 типа (ЦВС2) по п.1, который депонирован в Китайском центре коллекции типовых культур (ССТСС) под номером доступа V201117.
3. Цирковирус свиней 2 типа (ЦВС2) по п.1, где ЦВС2 способен вызывать цитопатический эффект (CPE) в клеточной линии РК-15 или ее производных клеточных линиях.
4. Иммуногенная композиция, которая содержит цирковирус свиней 2 типа (ЦВС2) по п.1, где ЦВС2 является инактивированным.
5. Иммуногенная композиция по п.4, которая дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.
6. Иммуногенная композиция по п.5, где носитель представляет собой адъювант.
7. Иммуногенная композиция по п.4, где ЦВС2 инактивирован инактивирующим реагентом или тепловой обработкой.
8. Иммуногенная композиция по п.4, которая дополнительно содержит по меньшей мере один патогенный антиген, выбранный из группы, включающей антиген вируса свиного гриппа (SIV), антиген вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней (PRRSV), антиген микоплазмы, антиген парвови-

руса свиней (PPV), антиген рожи свиней и антиген вируса псевдобешенства.

9. Способ защиты свиньи от инфицирования цирковирусом свиней 2 типа, включающий введение иммуногенной композиции по п.4 свинье для увеличения иммунитета против ЦВС2 у свиньи.

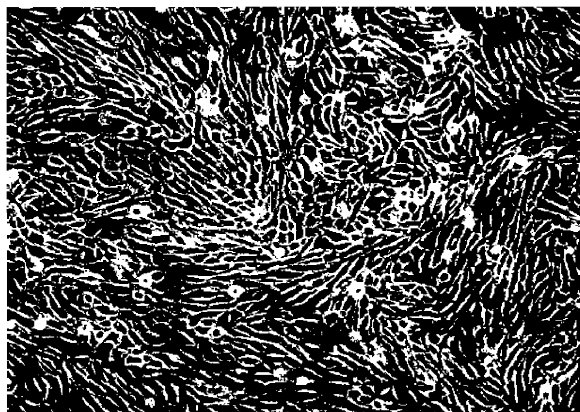
10. Антитело к цирковирусу свиней 2 типа (ЦВС2), полученное с помощью ЦВС2 по п.1.

11. Антитело к цирковирусу свиней 2 типа (ЦВС2) по п.10, которое представляет собой моноклональное антитело, поликлональное антитело или антитело, полученное способами генной инженерии.

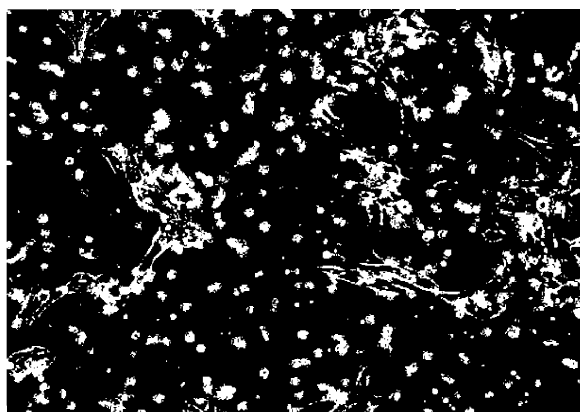
12. Полинуклеотид, кодирующий полипептид открытой рамки считывания 2 (ORF2) вируса ЦВС2 по п.1, при этом полипептид ORF2 имеет последовательность SEQ ID No: 5.

13. Полинуклеотид по п.12, где полинуклеотид содержит последовательность SEQ ID No: 4.

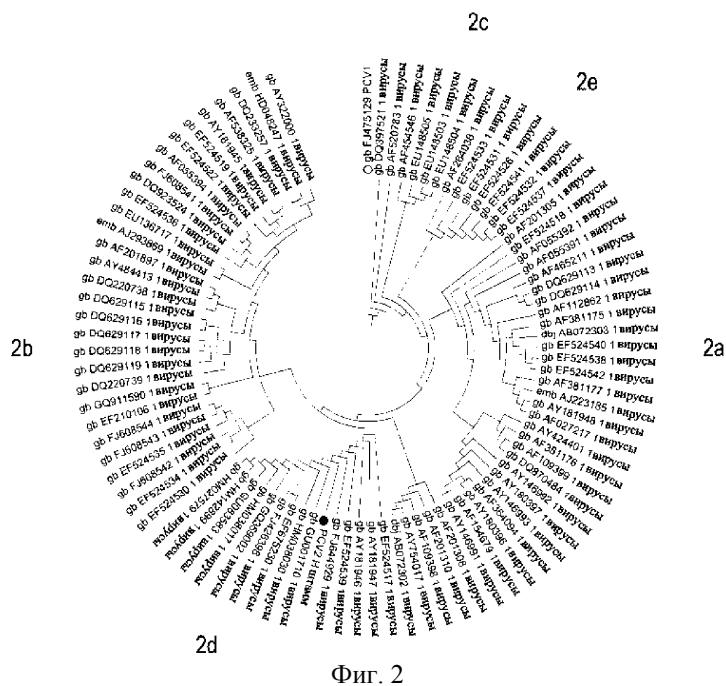
14. Набор для анализа образца на цирковирус свиней 2 типа (ЦВС2), содержащий вирусный антиген вируса по п.1 или антитело по п.10, где антитело представляет собой моноклональное антитело, поликлональное антитело или антитело, полученное способами генной инженерии.



Фиг. 1А



Фиг. 1В



ФИГ. 2

штамм_H_ORF2	MTYPRRRYRRRRHRPRSHLGQILRRRPWLVP	PHRYRWRKNGIFNTRL	SRITGYTVKKT
ABV21950	MTYPRRRFRRRRHRPRSHLGQILRRRPWL	VHPRHRYRWRKNGIFNTRL	SRITGYTVKKT
ADK34046	MTYPRRRFRRRRHRPRSHLGQILRRRPWL	VHPRHRYRWRKNGIFNTRL	SRITGYTVKKT
ADD25772	MTYPRRRFRRRRHRPRSHLGQILRRRPWL	VHPRHRYRWRKNGIFNTRL	SRITGYTVKKT
	*****.	*****.	*****.
штамм_H_ORF2	TVRTPSWNVDDMMRFNINDFLPPGGGSSPL	TVPFYYRIRKVKVEFWPCSPITQ	GDGRGVSS
ABV21950	TVRTPSWNVDDMMRFNINDFLPPGGGSSN	PLTVPFYYRIRKVKVEFWPCSPITQ	GDGRGVGS
ADK34046	TVRTPSWNVDDMMRFNINDFLPPGGGSSN	PLTVPFYYRIRKVKVEFWPCSPITQ	GDGRGVGS
ADD25772	TVRTPSWNVDDMMRFNINDFLPPGGGSSN	PLTMPFYYRIRKVKVEFWPCSPITQ	GDGRGVGS
	*****.	*****.	*****.
штамм_H_ORF2	TAVILDDNFVTKANALTYDPYVNYSSRHT	ITQPFSYHSRYFTPKPVLDR	TIDYFQPNNKR
ABV21950	TAVILDDNFVTKANALTYDPYVNYSSRHT	ITQPFSYHSRYFTPKPVLDR	TIDYFQPN-KR
ADK34046	TAVILDDNFVTKANALTYDPYVNYSSRHT	ITQPFSYHSRYFTPKPVLDR	TIDYFQPNNKR
ADD25772	TAVILDDNFVTKANALTYDPYVNYSSRHT	ITQPFSYHSRYFTPKPVLDR	TIDYFQPNNKR
	*****.	*****.	*****.
штамм_H_ORF2	NQLWLRQLTTGNVDHVGLGTAFENSIYDQ	DYNIRITMYVQFRE	FNLDKDPPLNPK
ABV21950	NQLWLRQLTTGNVDHVGLGTAFENSIYDQ	DYNIRITMYVQFRE	FNLDKDPPLNPK
ADK34046	NQLWLRQLTTGNIDHVGLGTAFENSIYDQ	DYNIRITMYVQFRE	FNLDKDPPLNPK
ADD25772	NQLWLRQLTTGNVDHVGLGTAFENSIYDQ	DYNIRITMYVQFRE	FNLDKDPPLNPK
	*****.	*****.	*****.

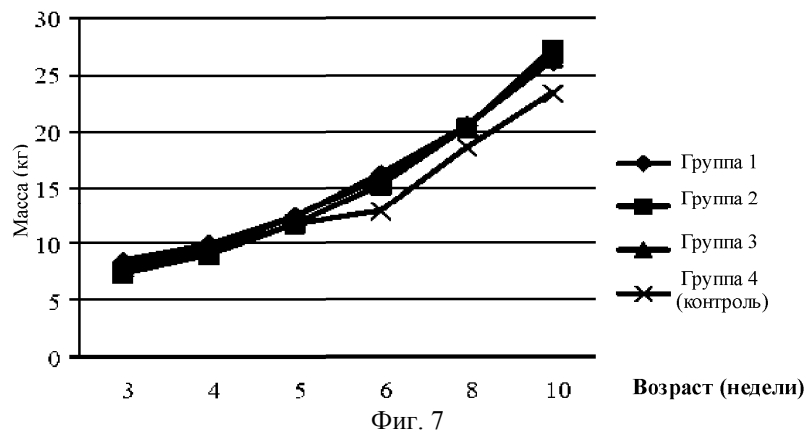
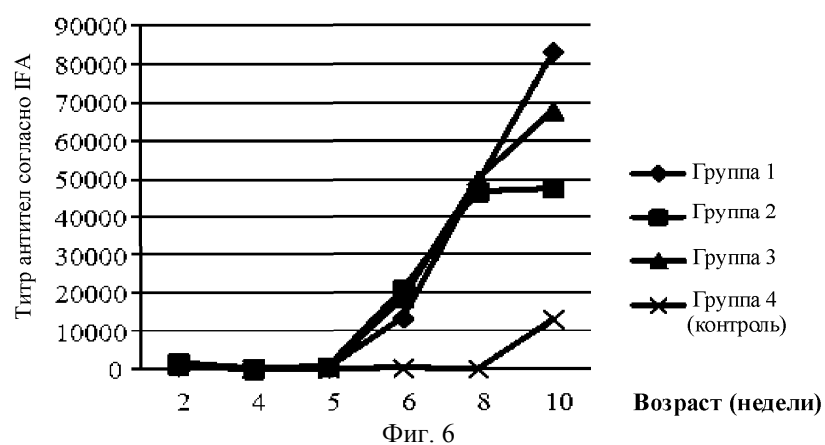
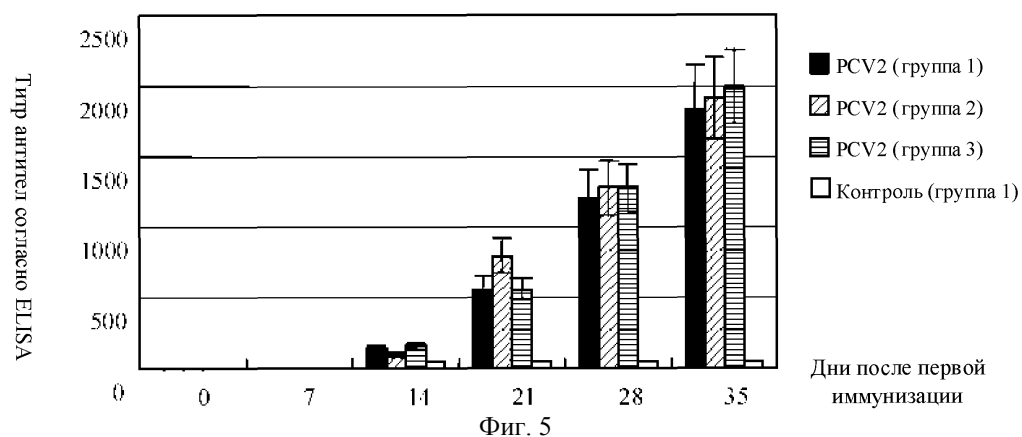
ФИГ. 3

```

штамм_H_ORF2      MTYPRRRYRRRRHRPRSHLGQILRRRPWLHVHPRHRYRWRKNGIFNTRLSRTIGYTVKKT
ADD25772_2d       MTYPRRRYRRRRHRPRSHLGQILRRRPWLHVHPRHRYRWRKNGIFNTRLSRTIGYTVKAT
                    *****
штамм_H_ORF2      TVRTPSWNVDDMMRFNINDFLPPGGGSSPLTVPFEYYRIRKVKVEFWPCSPITOGDRGVSS
ADD25772_2d       TVRTPSWAVDDMMRFNINDFLPPGGGSNPLTVPFEYYRIRKVKVEFWPCSPITQGDGRGVGS
                    *****
штамм_H_ORF2      TAVILDDNFVTKANALTYDPYVNYSSRHTITQPFSYHSRYFTPKPVLDRITIDYFQPNNKR
ADD25772_2d       TAVILDDNFVTKATALTYDPYVNYSSRHTIPQPFYSYHSRYFTPKPVLDRITIDYFQPNNKR
                    *****
штамм_H_ORF2      NQLWLRLQTTGNVDHVGLGTAFENSIYDQDYNIRITMYVQFREFNLKDPPPLNPK
ADD25772_2d       NQLWLRLQTTGNVDHVGLGTAFENSIYDQDYNIRVITMYVQFREFNLKDPPPLNPK
                    *****

```

ФИГ. 4



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2