



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(21) Numer zgłoszenia: **422615**

(22) Data zgłoszenia: **22.08.2017**

(51) Int.Cl.

C07K 16/08 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

A61P 31/20 (2006.01)

(54) **Szczepionka przeciwko zakażeniom cirkowirusowym świń, antygen i jego zastosowanie oraz zestaw immunodiagnostyczny**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

25.02.2019 BUP 05/19

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

28.12.2020 WUP 21/20

(73) Uprawniony z patentu:

**PAŃSTWOWY INSTYTUT WETERYNARYJNY –
PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY,
Puławy, PL**

**UNIwersytet Marii Curie-Skłodowskiej,
Lublin, PL**

**Instytut Immunologii i Terapii
Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk
Im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu,
Wrocław, PL**

**VEPHARM Spółka z ograniczoną
odpowiedzialnością, Puławy, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

PRZEMYSŁAW GREŁA, Lublin, PL

PIOTR KOPER, Lublin, PL

JUSTYNA KUTKOWSKA, Brzozowiec, PL

KRZYSZTOF KWIT, Puławy, PL

ANDRZEJ MAZUR, Lublin, PL

ZYGMUNT PEJSK, Puławy, PL

ANDRZEJ POCHODYŁA, Skowieszyn, PL

KATARZYNA PODGÓRSKA, Lublin, PL

ANDRZEJ RAPAŁ, Brzeg, PL

ANNA SKORUPSKA, Lublin, PL

ANNA SZCZOTKA-BOCHNIARZ, Puławy, PL

MAREK TCHÓRZEWSKI, Lublin, PL

KAMIL ŻEBRAK, Nowodwór, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Gdula

Opis wynalazku

Opis

Przedmiotem wynalazku jest białko cirkowirusa świń typu 2 (PCV2) lub pochodne mu antygeny, szczepionka zawierająca to białko lub antygeny oraz test diagnostyczny do monitorowania poziomu przeciwciał anti-PCV2 w surowicach świń.

Cirkowirus świń typu 2 (PCV2) należy do rodziny Circoviridae obejmującej najmniejsze wirusowe patogeny ulegające replikacji niezależnie w komórkach ssaków. PCV2 uczestniczy w etiologii szeregu chorób trzody chlewnej, określanych wspólnie jako „choroba związana z cirkowirusem świń”, „zakażenie cirkowirusowe świń” czy „cirkowiroza” (porcine circovirus associated disease, PCVD). Najważniejszym z ekonomicznego punktu widzenia schorzeniem z tej grupy jest zakażenie systemowe PCV2 (PCV2-systemic disease, PCV2-SD), znane poprzednio jako pooddsadzeniowy wielonarządowy zespół wyniszczający (porcine multisystemic wasting syndrome, PMWS). Jest to choroba o wieloczynnikowym podłożu, która w zasadniczy sposób obniża wydajność produkcji trzody chlewnej na świecie. Objawy PCV2-SD to wyniszczenie, zaburzenia ze strony układu oddechowego, bladość skóry, uogólnione powiększenie węzłów chłonnych, niekiedy biegunka i żółtaczką oraz wzrost strat w okresie pooddsadzeniowym (od 5 do 15 tygodnia życia) (Allan GM, Ellis JA: Porcine circoviruses: a review. J Vet Diagn Invest 2000, 12, 3).

Oprócz wspomnianego wyżej PMWS, zakażenia PCV2 wiążą się z występowaniem zespołu zaburzeń oddechowych świń (PRDC), zaburzeń w rozrodcie oraz zespołu skórno-nerkowego (PDNS).

Zakażenia cirkowirusowe są szeroko rozpowszechnione w stadach trzody chlewnej na świecie. PCV2 powoduje głównie zakażenia subkliniczne, a objawy kliniczne infekcji obserwuje się jedynie u pewnego odsetka świń. Jest to związane z oddziaływaniem dodatkowych czynników – zakaźnych i/lub niezakaźnych, które stymulują replikację wirusa. Wzrost poziomu wirēmii powoduje spadek wydolności układu immunologicznego ze względu na immunosupresyjny wpływ zakażenia PCV2.

PCV2-SD stwierdzano sporadycznie w Kanadzie już w 1991 roku (Kekarainen T et al. Immune responses and vaccine-induced immunity against Porcine circovirus type 2. Vet Immunol Immunopathol. 2010 Aug 15; 136(3–4):185–93. doi: 10.1016/j.vetimm.2010.03.025), lecz dopiero od 1996 r. zaobserwowano istotny wzrost liczby przypadków syndromu w Ameryce Północnej i Europie (Allan G et al. Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. J Vet Diagn Invest 1998, 10, 3). Obecnie PCV2-SD i inne choroby związane z PCV2 mają zasięg globalny i występują na wszystkich kontynentach z Oceanią włącznie, stanowiąc istotny problem ekonomiczny w wielu krajach. Szacuje się, że koszty, jakie ponoszą producenci trzody chlewnej w związku z zakażeniami cirkowirusowymi w Europie, wynoszą od 500 do 900 mln euro rocznie. Straty spowodowane są m.in. wzrostem częstości zakażeń wtórnych na fermach dotkniętych PCVD i zwiększonym zużyciem antybiotyków (Pejsak Z et al. Efficacy of different protocols of vaccination against porcine circovirus type 2 (PCV2) in a farm affected by postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2010, 33:e1-5).

PCV2-SD został po raz pierwszy zdiagnozowany w Polsce w 2000 roku przez zespół Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – PIB (PIWet-PIB) (Stadejek T et al. Pierwszy przypadek pooddsadzeniowego wielonarządowego zespołu wyniszczającego świń w Polsce. Medycyna Weterynaryjna 62 (3), 297–301, 2006). Badania przeprowadzone w PIWet-PIB wskazują, że PCV2-SD stanowi istotny problem zdrowotny w znaczącym odsetku stad świń w Polsce. Chorobę potwierdzono metodami laboratoryjnymi w 43,8% ferm, w których obserwowano objawy kliniczne sugerujące występowanie PMWS u prosiąt odsadzonych (Podgórska K et al. Występowanie pooddsadzeniowego wielonarządowego zespołu wyniszczającego w krajowej populacji świń. Medycyna Weterynaryjna 2009, 65 (5); Podgórska K: Opracowanie i zastosowanie metod rozpoznawania zakażeń cirkowirusem świń typu 2 (PCV2), praca doktorska, Puławy, 2008).

Aktualnie, w obrębie PCV2 wyodrębniono 5 różnych genotypów: PCV2a, PCV2b, PCV2b, PCV2c, PCV2d oraz PCV2e. PCV2a jest najstarszym genotypem. PCV2c zidentyfikowano wyłącznie retrospektywnie, w tkankach archiwalnych od świń z Danii (Dupont et al. 2008, Vet Microbiol 128, 56–64) oraz u dzikich świń z Brazylii (Franzo et al. 2015, Vet Microbiol 178, 158–162). Ze względu na ograniczony zasięg, przyjmuje się, że genotyp ten nie ma większego znaczenia (Opriessnig et al. 2017, Vaccine 35, 248–254). Około 2003 roku doszło do zmiany dominującego genotypu PCV2: uprzednio dominujący PCV2a został wyparty przez PCV2b (Dupont et al. 2008, Vet Microbiol 128, 56–64), co spowodowało pojawianie się zakażeń PCV2-SD w stadach świń i zapoczątkowało stosowanie szczepionek przeciwko

PCV2 na masową skalę. Ostatnio przeprowadzone badania w tym zakresie potwierdziły w Polsce przewagę genotypu PCV2b (Podgórska K: Opracowanie i zastosowanie metod rozpoznawania zakażeń cirkowirusem świń typu 2 (PCV2), praca doktorska, Puławy, 2008).

Wykazano, że PCV2 charakteryzuje się szybkim tempem mutacji, zbliżonym do wirusów RNA (Firth et al. J Virol 2009, 83, 12813–12821), co może skutkować szybkim powstawaniem i rozprzestrzenianiem się nowych, unikalnych genotypów wirusa. Ponadto świniom mogą być zakażone kilkoma różnymi szczepami wirusa. W USA odnotowano kolejną zmianę dominującego genotypu, którym stał się PCV2d (Xiao et al. 2016, Vet Microbiol 197, 72–77).

Zalecane środki profilaktyczne do walki z chorobą mają charakter niespecyficzny (Opriessnig T et al. A PCV2 vaccine based on genotype 2b is more effective than a 2a-based vaccine to protect against PCV2b or combined PCV2a/2b viremia in pigs with concurrent PCV2, PRRSV and PPV infection. Vaccine 2013, 31, 487–494), a ich skuteczność jest ograniczona. Znacznie lepsze efekty uzyskuje się stosując odpowiednią, ukierunkowaną immunoprofilaktykę zakażeń PCV2. Badania z wykorzystaniem prototypów różnego rodzaju szczepionek przeciwko zakażeniom cirkowirusowym (inaktywowanych, szczepionek DNA, rekombinowanych) wykazały, że indukują one powstawanie specyficznych przeciwciał i mogą być stosowane do uodporniania świń (Harding JCS, Clark EG: Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). Swine Health Prod 1997, 5, 201–203; Madec F et al. PMWS: on-farm observations and preliminary analytic epidemiology. Proc. ssDNA Viruses of Plants, Birds, Pigs and Primates, Saint-Malo 2001, 86–88).

Wiele badań potwierdziło, że zastosowanie szczepień przeciwko zakażeniom cirkowirusowym prowadzi do ograniczenia ilości wirusa we krwi i tkance limfoidalnej. Immunoprofilaktyka pozwala na zmniejszenie związanego z infekcją spadku masy ciała świń w okresie tuczu, a nawet prowadzi do zwiększenia przyrostów masy ciała (wzrost o niemal 5 kg w okresie tuczu). Dowiedziono, że szczepienia przyczyniają się do istotnego zmniejszenia śmiertelności w stadach trzody chlewnej – według badań przeprowadzonych w Wielkiej Brytanii straty tego typu zredukowano z 14,3% do 4,6%. Wykazano również, że immunoprofilaktyka zakażeń PCV2 znacząco skraca okres wiremii – do 30 dni oraz zapewnia wzrost poziomu przeciwciał specyficznych dla PCV2 w ciągu 4 tygodni po szczepieniu. Opublikowane wyniki badań i obserwacje terenowe wskazują, że stosowanie szczepień ochronnych ma pozytywny wpływ na wskaźniki odchowu w gospodarstwach, gdzie notuje się PMWS we wczesnym okresie życia prosiąt (Pejsak Z et al. Influence of long-term vaccination of a breeding herd of pigs against PCV2 on reproductive parameters. Polish Journal of Veterinary Sciences 2012, 15, 37–42; Pejsak Z et al. Effect of porcine circovirus type 2 vaccination of sows on selected production parameters. Bull Vet Inst Puławy 53, 159–164, 2009; Podgórska K et al. Występowanie poodrodzeniowego wielonarządowego zespołu wyniszczającego w krajowej populacji świń. Medycyna Weterynaryjna 2009, 65 (5)).

Głównym czynnikiem odpowiedzialnym za reakcję immunologiczną na zakażenie PCV2 jest białko kapsydu kodowane przez ORF2 (Fenaux M et al. A chimeric porcine circovirus (PCV) with the immunogenic capsid gene of the pathogenic PCV type 2 (PCV2) cloned into the genomic backbone of the nonpathogenic PCV1 induces protective immunity against PCV2 infection in pigs. J Virol. 2004 Jun; 78(12):6297–303; Fort M et al. One dose of a porcine circovirus 2 (PCV2) sub-unit vaccine administered to 3-week-old conventional piglets elicits cell-mediated immunity and significantly reduces PCV2 viremia in an experimental model. Vaccine. 2009 Jun 19; 27(30):4031–7. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.04.028).

Obecnie na rynku dostępne są 4 szczepionki przeciwko PCV2 o zbliżonym działaniu (Fort M et al. One dose of a porcine circovirus 2 (PCV2) sub-unit vaccine administered to 3-week-old conventional piglets elicits cell-mediated immunity and significantly reduces PCV2 viremia in an experimental model. Vaccine. 2009 Jun 19; 27(30):4031–7. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.04.028):

- Circovac (producent: Merial) – szczepionka inaktywowana zawierająca wirus PCV2 namnożony na hodowli komórkowej PK15;
- Circoflex (producent: Boehringer Ingelheim) – szczepionka inaktywowana, zawierająca białko wirusa PCV2 uzyskane na drodze ekspresji w systemie bakulowirusa;
- Suvaxyn (Zoetis) – podstawą szczepionki jest niepatogenny wirus PCV1 z wbudowywanym fragmentem wirusa PCV2 (chorobotwórczy). Tak zmodyfikowany wirus (chimera) jest namnażany w hodowli komórek i inaktywowany;
- Porcillis PCV (producent: Intervet MSD) – szczepionka podjednostkowa; zawierająca białko wirusa PCV2 uzyskane na drodze ekspresji w systemie bakulowirusa.

Należy jednak podkreślić, że mimo dynamicznie zachodzących zmian dotyczących dominującego na świecie genotypu PCV2, wszystkie dostępne komercyjnie szczepionki oparte są na genotypie PCV2a

wirusa (Beach NM, Meng X-J: Efficacy and future prospects of commercially available and experimental vaccines against porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Res.* 2012 Mar; 164(1-2):33–42. doi: 10.1016/j.virusres.2011.09.041.). Mimo pozytywnych wyników badań dotyczących efektywności tych szczepionek, ich aplikacja nie pozwoliła na całkowitą eliminację cirkowirusy, w związku z czym nawet w stadach świń objętych rygorystyczną immunoprofilaktyką występują przypadki zachorowań.

Aktywnymi składnikami szczepionek mogą być żywe lub inaktywowane patogeny, antygenowe białka podjednostkowe oraz, jako najprostsze elementy, krótkie peptydy zawierające epitop antygenowy.

Zastosowanie peptydów jest szczególnie korzystne w przypadku toksyczności lub trudności z ekspresją i izolacją białka rekombinowanego. Istnieje możliwość łatwej modyfikacji szczepionki w przypadku mutacji patogenu lub użycia konserwatywnych fragmentów nieulegających mutacji. Użycie peptydów jest również ekonomiczne i bezpieczne. Można je syntezować z dużą wydajnością i czystością. Pozbawione są pirogennych bakteryjnych zanieczyszczeń.

Ważną kwestią jest wybór odpowiedniego fragmentu, który by indukował przeciwciała neutralizujące patogen. Z kolei, inny fragment białka może być użyty do testu diagnostycznego, co pozwala na odróżnienie zwierzęcia zaszczepionego od zainfekowanego. Opracowana niedawno technika otrzymywania zwielokrotnionych peptydów MAP (Multiple Antigenic Peptides) pozwala na otrzymanie silnie immunogennych peptydów. Metoda ta eliminuje potrzebę użycia dodatkowego nośnika.

Peptydowe fragmenty są często również używane w testach diagnostycznych do oceny poziomu przeciwciał przeciwko różnym antygenom (Saravana P., Kumar S. Diagnostic and immunoprophylactic applications of synthetic peptides in veterinary microbiology. *Microbiology Research* 2010; 1:e1doi:10.4081/mr.2010.e1; Azizi A, Diaz-Mitoma F. Viral peptide immunogens: current challenges and opportunities. *J Pept Sci* 2007; 13:776–86).

W piśmiennictwie z tego zakresu opisano skuteczne użycie peptydowych szczepionek dla psiego parwowirusa CPV, bydłowego wirusa FMD i innych patogenów (Langeveld JP et al. First peptide vaccine providing protection against viral infection in the target animal: studies of canine parvovirus in dogs. *J Virol* 1994; 68:4506–13; Bittle et al. Protection against foot-and-mouth disease by immunization with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence. *Nature* 1982; 298:30–3).

W przypadku cirkowirusa świń typu 2, białko kapsydowe PCV2 jest prostym łańcuchem polipeptydowym zawierającym 233 aminokwasy. N-końcowy fragment jest silnie zasadowy i odpowiedzialny za utworzenie wirionu, za immunogenność odpowiedzialny jest C-końcowy fragment.

Stwierdzono, że infekcja wirusem PCV2 prowadzi do wytwarzania przeciwciał rozpoznających fragment 169–180. Przeciwciała te jednak nie chronią przed infekcją (Trible BR et al. Antibody recognition of porcine circovirus type 2 capsid protein epitopes after vaccination, infection, and disease. *Clin. Vac. Immunol.* 2011, 18, 749–757).

Zidentyfikowano kilka dłuższych fragmentów, które są immunogenne: 23–43, 47–85, 117–131, 171–202, 200–233 (Mahe' et al. Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circoviruses and identification of immunorelevant epitopes. *J. Gen. Virol.* 2000, 81:1815–1824; Truong, C. et al. Identification of an immunorelevant ORF2 epitope from porcine circovirus type 2 as a serological marker for experimental and natural infection. *Arch. Virol.* 2001, 146:1197–1211). Wyznaczono również kilka epitopów dla przeciwciał monoklonalnych otrzymanych przeciwko białku kapsydowemu: 155–182, 180–212, 216–233 (Shang, S. et al. Fine mapping of antigenic epitopes on capsid proteins of porcine circovirus, and antigenic phenotype of porcine circovirus type 2. *Mol. Immunol.* 2009. 46:327–334).

Na podstawie różnych badań stwierdzono, że wirus PCV wiąże się na powierzchni komórki gospodarza do powierzchniowych heparanów. W białku kapsydowym zidentyfikowano zasadowy fragment 98–103, który może być odpowiedzialny za to wiązanie (Nauwynck HJ et al. Cell tropism and entry of porcine circovirus 2. *Virus Res.* 2012, 164, 43–45). Zablokowanie w cząsteczce wirusa miejsca wiązającego się do komórki może być skuteczną metodą ochrony przed infekcją.

Adiuwanty (nieswoiste modulatory) stosowane w formulacjach szczepionek weterynaryjnych są substancjami pomocniczymi dodawanymi do dawki biopreparatu szczepionki w celu wzmocnienia i przedłużenia działania substancji czynnych szczepionek (patogen żywy, inaktywowany lub atenuowany). Adiuwanty zwiększają zdolność antygeny do wzbudzenia szybkiej, silnej oraz długotrwałej reakcji układu immunologicznego, co jest szczególnie ważne w przypadku szczepień przypominających (rewakcynacja). Korzyści ze stosowania adiuwantów uwiadcniają się poprzez poprawę skuteczności szczepionek (zwłaszcza inaktywowanych) w indukowaniu efektywnej odporności czynnej, biernej oraz

stymulacji długotrwałej pamięci immunologicznej. Wśród adiuwantów stosowanych w praktyce weterynaryjnej należy wymienić związki glinu, adiuwanty olejowe, saponinowe oraz związki polimerowe (karbomery).

Adiuwanty olejowe są rozproszonymi fazami wodno-olejowymi (olej parafinowy, roślinny lub pochodzenia zwierzęcego) w formie stabilnych emulsji z zawieszonymi substancjami czynnymi (antygeny różnego typu). Zawierający olej mineralny i emulgator kompletny adiuwant Freund'a (complete Freund's adjuvant – FCA) wzbogacony inaktywowanymi prątkami pozostaje do dzisiaj najefektywniejszym adiuwantem. Z uwagi jednak na częste powikłania poszczepienne, może być stosowany wyłącznie w pracach eksperymentalnych. W praktyce weterynaryjnej są używane szeroko pozbawione składników bakteryjnych olejowe niekompletne adiuwanty Freund'a (incomplete Freund's adjuvant – IFA). Mimo swoich zalet wzmacniania działania antygenów szczepionek, istotną wadą adiuwantów olejowych jest wywołanie działań ubocznych w postaci ziarniaków, jałowych ropni, schorzeń autoimmunologicznych lub zapaleń stawów. W celu ograniczenia negatywnego oddziaływania składników IFN, opracowano nowe formuły oparte na rafinowanych olejach mineralnych, olejach metabolizowanych (olej arachidowy) lub lipidach (skwalen).

W ostatnich latach, w szczepionkach weterynaryjnych z powodzeniem zastosowano adiuwanty saponinowe oparte o saponiny triterpenowe Quillaja saponaria, oraz ginsenozydy – saponiny korzenia żeń-szenia (*Radix panax ginseg*). Ginsenozydy są stosowane jako składniki adiuwantów w szczepionkach eksperymentalnych (NDV) i komercyjnych inaktywowanych szczepionkach weterynaryjnych: Rhiniseng, Suiseng oraz Parvoseng firmy Laboratories HIPRA. W żywych oraz inaktywowanych szczepionkach weterynaryjnych, używa się także polimery karbomerów (wielkocząsteczkowe polimery kwasu akrylowego usieciowanego polialkenyłowymi eterami cukrów lub polialkoholi), które w procesie polimeryzacji powodują okluzję wprowadzonych do formuły antygenów, co pozwala na wydłużenie uwalniania i działania szczepionki po wstrzyknięciu do organizmu.

Celem wynalazku było opracowanie metod otrzymywania rekombinowanego białka kapsydu PCV2 jako czynnika immunogennego, który mógłby stanowić substancję czynną preparatu uodporniającego dla świń, jak również stworzenie kompatybilnego systemu, umożliwiającego ocenę skuteczności szczepień i rozróżnianie świń szczepionych od nieimmunizowanych. Wynika to z aktualnego zapotrzebowania rynku, związanego z brakiem uniwersalnej szczepionki przeciwko zakażeniom cirkowirusowym, zabezpieczającej przed obydwojema genotypami PCV2 a i b, zwłaszcza PCV2b, jak również z niedostępnością testów zapewniających ocenę skuteczności szczepień.

W związku z potrzebą zastosowania najbardziej optymalnego systemu pozyskania antygeny, celem wynalazku było opracowanie systemu ekspresji rekombinowanego białka kapsydu cirkowirusa świń typu 2, które stanowiłoby zasadniczy składnik preparatu do immunoprofilaktyki zakażeń cirkowirusowych u świń.

Celem wynalazku było także opracowanie metod uzyskiwania fragmentów peptydowych białka kapsydowego PCV2 o właściwościach immunogennych.

Dodatkowo, celem wynalazku było opracowanie testu ELISA pozwalającego na stworzenie kompatybilnego systemu umożliwiającego ocenę skuteczności opracowanego preparatu w warunkach terenowych.

W Unii Europejskiej odsetek prosiąt szczepionych przeciwko PCV2 jest zbliżony do 90%. W związku z powyższym, cena immunizowanej świni oferowanej w obrocie jest o około 5 euro wyższa w porównaniu z osobnikami niezaszczepionymi. Niejednokrotnie jednak, świnię sprowadzaną z Unii Europejskiej do Polski, przez nieuczciwość hodowców oraz handlowców są w rzeczywistości nieuodporniane. Obecnie brak jest stosownych metod laboratoryjnych umożliwiających weryfikację statusu immunologicznego prosiąt w celu udowodnienia opisanych wyżej nieuczciwych praktyk. Test do identyfikacji, oceny efektywności immunizacji i rozróżnienia świń nieobjętych immunoprofilaktyką od szczepionych przeciwko PCV2, pozwoli na kompleksowe rozwiązanie tego problemu i uzupełnienie zaistniałej luki diagnostycznej.

W obrębie zakażeń PCV2 rozróżnia się szczepy określane jako PCV2a i PCV2b. Zauważono, że wariant PCV2b ostatnio przeszedł istotne różnicowanie genetyczne i rozprzestrzeni się na coraz większych obszarach. Dlatego jasne jest, że chociaż PCV2a i 2b mają wspólne pochodzenie, rozwijały się niezależnie i z czasem nowe szczepy PCV2b będą dominować w porównaniu z PCV2a. Należy podkreślić, że badania przeprowadzone przez zespół pod kierunkiem prof. dr hab. Z. Pejśaka wykazały, że w populacji świń w Polsce dominuje genotyp PCV2b (Podgórska K: Opracowanie i zastosowanie metod rozpoznawania zakażeń cirkowirusem świń typu 2 (PCV2), praca doktorska, Puławy, 2008).

Aktualnie żaden z producentów szczepionek nie oferuje preparatu uodporniającego świnię przed zakażeniem genotypem PCV2b. Nowe szczepy PCV2b zdiagnozowano około 20 lat temu, co zbieгло się z pierwszym doniesieniem o przypadku PMWS w Kanadzie w 1991 roku. Przyczyny gwałtownego rozprzestrzenienia się nowego, patogennego szczepu PCV2b nie są znane. Za stan ten może być odpowiedzialne m.in. zwiększenie międzynarodowego obrotu trzodą chlewną.

W takich krajach, jak Niemcy, Holandia czy USA, szczepieniami przeciwko PCV2 obejmuje się ponad 80% pogłowia świń. Polska należy do krajów, w których nie docenia się znaczenia immunoprofilaktyki w ochronie zdrowia świń przed skutkami chorób cirkowirusowych (PCVD). Świadczy o tym niewielki odsetek szczepionych zwierząt, który kształtuje się na poziomie niższym, niż 30%. Tymczasem, powszechność występowania czynnika zakaźnego jest bardzo wysoka – dotyczy blisko 100% populacji.

Wynalazek pozwoli na wdrożenie skutecznej immunoprofilaktyki przeciwko wirusom typu PCV2a i PCV2b. Zmiana klinicznej postaci choroby, ze sporadycznej do epizootycznej była związana z pojawieniem się dominacji występowania genotypu PCV2b, nad genotypem PCV2a. Istnieją wyniki badań wskazujące na większe prawdopodobieństwo wywołania choroby po zakażeniu PCV2b niż PCV2a, tymczasem wszyscy czterej producenci szczepionek oferują szczepionkę tylko i wyłącznie przeciwko wirusowi typu PCV2a.

Niezwykle istotne jest opracowanie technologii wytwarzania szczepionki przeciwko zakażeniom cirkowirusowym, której składnik aktywny oparty jest na dominującym genotypie PCV2b, która zapewni wyższą skuteczność preparatu.

Aktualnie na rynku diagnostyków weterynaryjnych brakuje testu umożliwiającego monitorowanie statusu immunologicznego stad świń, co podnosi ryzyko zakupu prosiąt nieimmunizowanych, deklarowanych jako szczepione przeciwko PCV2. Wiąże się to z wyższym kosztem jednostkowym nabywanych świń i brakiem możliwości weryfikacji ich statusu. System identyfikacji polegałby na zbadaniu w 1 teście surowic pobranych od 90 sztuk zwierząt na obecność przeciwciał anti-PCV. Pozwoli to na uzyskanie zmniejszenia śmiertelności szczepionych osobników oraz istotnej poprawy parametrów produkcyjnych, takich jak wyższych dziennych przyrostów masy ciała trzody chlewnej, zwiększonej mięsności, większej średniej grubości polędwicy itp.

Przedmiotem wynalazku jest immunogeny antygen, przy czym antygen jest peptydem o sekwencji aminokwasowej wybranej spośród: SEQ ID NO: 2, 3 lub 5.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest szczepionka przeciwko zakażeniom cirkowirusowym świń zawierająca antygen będący peptydem o sekwencji aminokwasowej wybranej spośród: SEQ ID NO: 2, 3 lub 5, korzystnie związany z farmaceutycznie dopuszczalnym nośnikiem, oraz adiuwant.

W szczepionce według wynalazku nośnik wybiera się z grupy zawierającej owoalbuminę, albuminę i dendrymery.

Innym przedmiotem wynalazku jest zestaw immunodiagnostyczny do wykrywania przeciwciał przeciwko cirkowirusowi świń, zwłaszcza do monitorowania poziomu przeciwciał anti-PCV2 w surowicach świńskich, zawierający peptyd o sekwencji aminokwasowej wybranej spośród: SEQ ID NO: 2, 3 lub 5, lub białko o sekwencji SEQ ID NO: 9.

Zestaw immunodiagnostyczny zawiera płytkę do mikromiareczkowania ze studzienkami pokrytymi fazą stałą podłoża zawierającego antygen białkowy lub peptydowy. Ponadto, odczynniki testu obejmują kontrole, roztwór koniugatu znakowanych przeciwciał, rozcieńczalnik, roztwory, np. roztwór substratu, roztwór płuczący lub przerywający itp. Odczynniki mogą być dostarczane w zestawach z odpowiednią instrukcją przeprowadzenia testu.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest immunogeny antygen będący peptydem o sekwencji aminokwasowej wybranej spośród: SEQ ID NO: 2, 3 lub 5, do zastosowania w leczeniu lub profilaktyce zakażeń cirkowirusowych świń.

Innym przedmiotem wynalazku jest zastosowanie peptydu o sekwencji aminokwasowej wybranej spośród: SEQ ID NO: 2, 3 lub 5, lub białka o sekwencji SEQ ID NO: 9, w diagnostyce in vitro zakażeń cirkowirusowych świń, zwłaszcza do monitorowania poziomu przeciwciał anti-PCV2 w surowicach świńskich.

W opisie przedstawiono sposób otrzymywania immunogennego białka, który charakteryzuje się tym, że obejmuje:

- a. ekspresję heterologiczną białka rekombinowanego w drożdżach *Pichia pastoris*, poprzez hodowlę komórek drożdży zawierających kasetę ekspresyjną kodującą białko o SEQ ID NO: 1, korzystnie zawierającą sekwencję kodującą o SEQ ID NO: 8,

- b. izolowanie rekombinowanego białka immunogennego o SEQ ID NO: 1 z płynu pochodzącego.

Ujawniono także sposób otrzymywania białka immunogennego, charakteryzujący się tym, że obejmuje

- ekspresję w *E. coli* białka fuzyjnego poprzez uzyskanie komórki *E. coli* transformowanej plazmidem zawierającym sekwencję kodującą białko o SEQ ID NO: 9 albo 10, korzystnie posiadającą sekwencję nukleotydową SEQ ID NO: 11 albo 12, a następnie indukcję ekspresji rekombinowanego białka oraz
- dezintegrację bakterii produkujących rekombinowane białko i
- izolowanie rekombinowanego białka o SEQ ID NO: 9 albo 10, korzystnie techniką chromatografii powinowactwa, zwłaszcza na złożu agarozowo-niklowym.

W powyższym sposobie jako induktor zastosowano korzystnie induktor IPTG, korzystnie w stężeniu końcowym 0,1 mM – 1 mM.

Wynalazek przedstawiono w poniższych przykładach wykonania i na figurach rysunku, które nie powinny być uważane za ograniczające w jakikolwiek sposób. W realizacji niniejszego wynalazku będzie wykorzystywać się, jeśli nie wskazano inaczej, typowe techniki, znane specjalistom w dziedzinie.

Na Figurze 1 przedstawiono rozdział chromatograficzny z wykorzystaniem sita molekularnego. Na wykresie zaznaczono frakcję białkową zawierającą białko wirusa Cap PCV2.

Na Figurze 2 przedstawiono wyniki analizy SDS PAGE (A) oraz Western Blott (B) dla preparatu białkowego zawierającego białko kapsydowe wirusa PCV2 otrzymanego po rozdziale chromatograficznym na sicie molekularnym. Zastosowane oznaczenia: **M** – białka markerowe, **1** – preparat białka kapsydowego wirusa PCV2 poddany działaniu glikozydazy EndoPI, **2** – preparat białka kapsydowego wirusa PCV2.

Na Figurze 3 przedstawiono wyniki analizy dichroizmu kołowego (CD) preparatu białka kapsydowego wirusa PCV2 otrzymanego po rozdziale chromatograficznym na sicie molekularnym.

Na Figurze 4 przedstawiono mapę fizyczną i genetyczną wektora pET32a (+).

Na Figurze 5 przedstawiono mapę fizyczną i genetyczną wektora pETite N-His SUMO Kan.

Na Figurze 6 przedstawiono obraz elektroforetyczny dla otrzymanego białka Trx-CAP. Zastosowane oznaczenia: **M** – marker wielkości Unstained Protein MW Marker (Thermo Fisher Scientific); **R** – frakcja rozpuszczalna; **N** – frakcja nierozpuszczalna; **F** – niezwiązane ze złożem białka; **P** – płukania; **E** – elucja; **Z** – białka pozostałe na złożu; **A** – po ultrafiltracji na kolumnie Amicon.

Na Figurze 7 przedstawiono obraz elektroforetyczny dla otrzymanego białka SUMOCAP. Zastosowane oznaczenia: **M** – marker wielkości Unstained Protein MW Marker (Thermo Fisher Scientific); **L** – lizat komórek przed frakcjonowaniem; **R** – frakcja rozpuszczalna; **N** – frakcja nierozpuszczalna; **F** – niezwiązane ze złożem białka; **P** – płukania; **E** – elucja; **Z** – białka pozostałe na złożu; **A** – po ultrafiltracji na kolumnie Amicon.

Na Figurze 8 przedstawiono wykres obrazujący ocenę poziomu przeciwciał anti-PCV2 po zastosowaniu opracowanego zgodnie z wynalazkiem testu ELISA.

Przykłady

I. Opracowanie składu adiuwantów do szczepionki PCV2

Badanie miało na celu opracowanie adiuwantu dla szczepionki PCV2 silnie stymulującego odpowiedź immunologiczną, bezpiecznego i funkcjonalnego w stosowaniu (stabilność i wstrzykiwalność) opartego na substancjach dopuszczonych do stosowania w farmacji weterynaryjnej (status MRL, monografie farmakopealne).

W doświadczeniu jako adiuwanty dla szczepionek PCV2 wykorzystano trzy typy adiuwantów zawierających substancje dopuszczone do stosowania w farmacji weterynaryjnej:

- olejowe komercyjnie dostępne adiuwanty firmy Seppic zawierające rafinowane oleje mineralne i emulgatory pochodzenia roślinnego: MONTANIDE ISA 61 VG adiuwantu o cechach niekompletnego adiuwantu Freund'a stymulującego silną i długotrwałą odpowiedź immunologiczną oraz adiuwantu MONTANIDE ISA 28RVG wzbudzającego szybką, silną odpowiedź immunologiczną typu humoralnego,
- wodny adiuwant polimerowy (karbomer) zawierający ginsenozydy – saponiny korzenia żeńszenia (*Radix panax ginseng*) wzmagające oddziaływanie antygenów szczepionek na układ immunologiczny.

We wstępnej fazie badań opracowano składy i sposoby formulacji wymienionych adiuwantów dla preparatu zawierającego jako standardowy antygen białkowy – albuminę białka jaja kurzego (owoalbuminę).

1. Adiuwant MONTANIDE ISA 61 VG tworzący emulsję woda w oleju (W/O)

Skład prototypu preparatu i sposób formułacji emulsji opracowano na podstawie wskazówek firmy Seppic.

Skład dawki preparatu przeznaczonego do immunizacji jednej myszy (0,2 ml)

1. PBS + owoalbumina 50 µg – 0,08 ml (Faza wodna)
2. MONTANIDE ISA 61 VG – 0,12 ml (Faza olejowa)
3. Alkohol benzylowy 5% obj./obj.

Sposób formułacji:

Odmierzono oddzielnie objętość odpowiadającą 100 dawkom obu faz adiuwantu. Do fiolki poj. 20,0 ml wprowadzono 12 ml MONTANIDE ISA 61 VG, do którego stale mieszając stopniowo wkraplano 8 ml PBS (zawierającego owoalbuminę oraz alkohol benzylowy jako konserwant). Powstałą mieszaninę homogenizowano metodą ciśnieniową przy pomocy strzykawki przemiennie aspirując i wstrzykując emulsję (10x).

Wynik

Otrzymano jednorodną emulsję barwy białej wykazującą w „teście kropli” cechy typu emulsji W/O. Wstrzykiwanie emulsji przy pomocy igieł przeznaczonych do immunizacji nie napotykało trudności.

2. Adiuwant MONTANIDE ISA 28RVG, tworzący emulsję oleju w wodzie (O/W)

Skład preparatu i sposób formułacji emulsji opracowano w oparciu o zalecenia firmy Seppic.

Skład dawki preparatu przeznaczonego do immunizacji jednej myszy (0,2 ml)

1. PBS + owoalbumina 50 µg – 0,15 ml (Faza wodna)
2. MONTANIDE 28RVG – 0,05 ml (Faza olejowa)
3. Alkohol benzylowy 5% obj./obj.

Sposób formułacji:

Odmierzono oddzielnie objętość odpowiadającą 100 dawkom obu faz adiuwantu. Do fiolki poj. 50,0 ml umieszczonej na mieszadle magnetycznym wprowadzono 15 ml roztworu owoalbuminy w PBS i dodano alkoholu benzylowego jako konserwant. W trakcie mieszania (ok. 500 obr./min) wkraplano w czasie 1 min stopniowo 5 ml MONTANIDE 28RVG. Powstałą mieszaninę następnie homogenizowano przy obrotach ok. 1000 obr./min.

Wynik

Otrzymano preparat w postaci jednorodnej emulsji barwy białej, która w „teście kropli” wykazała cechy typu emulsji typu O/W. Lepkość otrzymanego preparatu okazała się istotnie niższa do preparatu otrzymanego w oparciu o adiuwant MONTANIDE ISA 61 VG. Aspirowanie i ponowne wstrzykiwanie emulsji przy pomocy igieł przeznaczonych do immunizacji nie napotykało trudności.

3. Adiuwant polimerowy z dodatkiem ekstraktu z żeń-szenia (P/EŻ)

Do opracowania adiuwantu (P/EŻ) wykorzystano dane literaturowe oraz dostępne opisy patentowe. W oparciu o ww. dane opracowano sposób sporządzenia adiuwantu o następującym składzie:

Skład dawki preparatu przeznaczonego do immunizacji jednej myszy (0,2 ml)

1. Owoalbumina 50 µg
2. Ekstrakt z żeń-szenia (EŻ) 0,20 mg
3. Polimer (LUBRIZOL 974 P NF – 1%, P) 0,1 ml
4. Wodorotlenek sodu do pH 6,8–7,4 q.s.
5. Alkohol benzylowy wag./obj. 0.5%
6. Płyn fizjologiczny do 0,2 ml

Otrzymanie polimeru:

Przygotowano 1% zawiesinę karbomeru (LUBRIZOL 974 P NF), którą zobojętniano 10% wodorotlenkiem sodu do pH 5,5–6,0. Po ustaleniu pH, zawiesinę autoklawowano w 121°C przez 30 min.

Sposób formułacji:

Odmierzono objętość odpowiadającą 100 dawkom 1% polimeru (LUBRIZOL 974 P NF), 20 mg ekstraktu z żeń-szenia rozpuszczono w 5 ml płynu fizjologicznego, do którego dodano 5000 µg owoalbuminy. Następnie, mieszaninę wkraplano do 10 ml 1% zawiesiny polimeru stale mieszając. Po sprawdzeniu pH (ok. 5,5), mieszaninę zobojętniono 10% NaOH do pH 6,5–7,2. Po ustaleniu pH, dodano alkohol benzylowy jako konserwant i objętość uzupełniono płynem fizjologicznym do objętości 20,0 ml.

Wynik

Otrzymano jednorodną opalizującą zawiesinę w formie płynnego żelu. Wirowanie (30 min/2000 g), nie powodowało zmiany postaci i wyglądu żelu. Płyn bez trudu aspirował się i wstrzykiwał przy pomocy igły przeznaczonej do immunizacji myszy.

4. Badania partii szczepionek na zwierzętach laboratoryjnych (mysz)

Opracowane składy i sposoby formułacji adiuwantów (według opisu I.1, I.2. i I.3.) zostały wykorzystane do sporządzenia partii szczepionek zawierających jako antygeny rekombinowane białka (systemy ekspresyjne *Pichia pastoris* oraz *E. coli*) oraz syntetyczne peptydy PCV2.

Wyniki

Przeprowadzone eksperymenty na myszach z zastosowaniem preparatów/szczepionek wykazały, że preparaty zawierające jako antygen rekombinowane białko PCV2 (system ekspresyjny *Pichia pastoris* lub *E. coli*) lub syntetyczne peptydy podane myszom w dawce 50–100 µg jednokrotnie oraz dwukrotnie generowały porównywalną serokonwersję (test ELISA). Potwierdzono także nieszkodliwość prototypów szczepionek oraz pożądaną wstrzykiwalność.

5. Badania partii szczepionek na zwierzętach docelowych (Świnia)

Na podstawie przeprowadzonych własnych badań na zwierzętach laboratoryjnych oraz przeanalizowaniu danych wytwórcy komercyjnych adiuwantów (Seppic), do dalszych doświadczeń na gatunku docelowym (Świnia), wybrano adiuwant Montanide ISA 28 R VG. Adiuwant ten posiada zdolność generowania szybkiej i silnej reakcji immunologicznej, zwłaszcza typu humoralnego u świń i myszy.

Prototypy szczepionek opartych na adiuwancie Montanide ISA 28 R VG wykonano według opisu przedstawionego pkt I.2.

Skład 1 dawki szczepionki przeznaczonej dla świń (2 ml) zawiera:

1.	Antygen PCV2*	100–500 µg
2.	Adiuwant Montanide ISA 28 R VG	0,5 ml
3.	Alkohol benzylowy	0,5%
4.	PBS	do 2,0 ml

*Peptyd lub rekombinowane białko cirkowirusa (PCV2) (systemy ekspresyjne *Pichia pastoris* oraz *E. coli*).

WYNIKI EKSPERYMENTU

1. Opracowano skład oraz sposób formułacji trzech adiuwantów z antygenem standardowym (albumina).

2. Adiuwanty: komercyjne adiuwanty MONTANIDE ISA 61 VG, Montanide ISA 28 R VG oraz adiuwant polimerowy (P/EŻ) wykazują pożądane cechy technologiczne oraz funkcjonalne (wstrzykiwalność oraz stabilność).

3. Wstępne wyniki badania immunogenności na myszach prototypów szczepionek opartych na komercyjnych adiuwantach MONTANIDE ISA 61 VG, Montanide ISA 28 R VG oraz adiuwancie polimerowym (P/EŻ) i zawierających jako antygen rekombinowane białko (system ekspresyjny *Pichia pastoris* lub *E. coli*) lub syntetyczne peptydy PCV2 w dawce 50–100 µg/dawkę wykazały porównywalną serokonwersję po aplikacji 1 dawki i 2 dawek preparatu.

4. Najkorzystniejszy efekt immunizacji gatunku docelowego świń (serokonwersja) osiągnięto stosując szczepionki zawierające 500 µg rekombinowanego białka PCV2 (system ekspresyjny *Pichia pastoris* lub *E. coli*) lub syntetycznych peptydów opartych na adiuwancie Montanide ISA 28 R VG.

II. Sposób otrzymywania białka kapsydu świń typu (PCV2)**A. Ekspresja w *Pichia pastoris***

Celem przeprowadzonych badań było opracowanie sposobu otrzymania białka kapsydu cirkowirusa świń typu 2 (PCV2), zwanego dalej również białkiem Cap cirkowirusa świń PCV2, z wykorzystaniem systemu eukariotycznego opartego na komórkach drożdżowych *Pichia pastoris*.

Zastosowano specyficzną kasetę genetyczną pozwalającą na wydajną syntezę białka kapsydowego PCV2 oraz formowanie oligomerycznego kompleksu białka kapsydowego PCV2 w pożywce hodowlanej.

Zastosowane sekwencje DNA

Sekwencje DNA, na podstawie których dokonano syntezy konstruktów genetycznych, zostały dostarczone przez PIWet-PIB w Puławach. Do opracowania procesu produkcji białka kapsydowego wirusa PCV2 w komórkach drożdży wybrano sekwencję DNA szczepu z grupy 1A/1B (14-53/14-64):

ATGACGTATCCAAGGAGGCGTTACCGGAGAAGAAGACACCGCCCCCGCAGCCATCTTGGC
 CAGATCCTCCGCCGCCGCCCTGGCTCGTCCACCCCGCCACCGTTACCGCTGGAGAAGG
 AAAAATGGCATCTTCAACACCCGCCTCTCCCGCACCTTCGGATATACTATCAAGCGAACC
 ACAGTCAAAACGCCCTCCTGGGCGGTGGACATGATGAGATTCAATATTAATGACTTTCTT
 CCCCCAGGAGGGGGCTCAAACCCCGCTCTGTGCCCTTTGAATACTACAGAATAAGAAAG
 GTTAAGGTTGAATTCTGGCCCTGCTCCCCGATCACCCAGGGTGACAGGGGAGTGGGCTCC
 AGTGCTGTTATTCTAGATGATAACTTTGTAACAAAGGCCACAGCCCTCACCTATGACCCC
 TATGTAACTACTCCTCCCGCCATACCATAACCCAGCCCTTCTCCTACCACTCCCGCTAC
 TTTACCCCCAAACCTGTCCTAGATTCCACTATTGATTACTTCCAACCAAACAACAAAAGA
 AATCAGCTGTGGCTGAGACTACAACTGCTGGAAATGTAGACCACGTAGGCCTCGGCACT
 GCGTTCGAAAACAGTATATACGACCAGGAATACAATATCCGTGTAACCATGTATGTACAA
 TTCAGAGAATTTAATCTTAAAGACCCCCCACTTAACCCTTAA

Sekwencja DNA została poddana bioinformatycznemu zabiegowi optymalizacji kodonów celem wydajnej ekspresji w eukariotycznym układzie drożdżowym:

ATGACATACCCTAGAAGAAGATACAGAAGAAGAAGACATAGACCTAGATCACACTTGGGA
 CAGATTTTGTAGAAGAAGACCTTGGTTAGTTCATCCAAGACACAGATACAGATGGAGAAGA
 AAGAATGGAATTTTAAACACAAGATTGTCAAGAACATTCGGTTATACCATCAAAAGAACT
 ACAGTTAAGACCCCTTCATGGGCAGTCGATATGATGAGATTCAATATCAACGACTTCTTG
 CCACCTGGTGGAGGTTCCAATCCAAGAAGTGTTCTTTTGAATACTACAGAATTAGAAAG
 GTTAAGGTCGAGTTCTGGCCATGTTCTCCTATCACACAAGGAGATAGAGGAGTTGGTTCT
 TCAGCTGTCATTTTAGATGACAACTTCGTTACAAAGGCTACCGCATTGACTTATGATCCA
 TACGTCAACTATTCCAGTAGACATACCATCACTCAACCTTTTCTTACCACTCAAGATAT
 TTCACTCCAAAACCTGTTTTAGATTCCACAATTGACTACTTTCAGCCAAACAACAAGAGA
 AACCAATTGTGGTTGAGATTGCAGACCGCCGGTAACGTTGATCATGTGCGATTGGGTACT
 GCTTTCGAAAATTCTATCTATGACCAGGAGTATAACATCAGAGTTACTATGTATGTCCAA
 TTCAGAGAGTTCAACTTAAAGACCCCTCCATTAAATCCTTAG

Ekspresja, oczyszczanie i analiza biochemiczna rekombinowanego białka kapsydowego wirusa PCV2.

Ekspresję białka wirusa PCV2, przeprowadzono wykorzystując układ genetyczny pozwalający na heterologiczną ekspresję białka PCV2, z zastosowaniem systemu PichiaPink Yeast Expression System (ThermoFisher) w komórkach drożdży *Pichia pastoris*. Zoptymalizowana sekwencja DNA kodująca kapsydowe białko wirusa PCV2 została wprowadzona do wektora ekspresyjnego pPINK α -HC w fuzji z ramką odczytu dla genu kodującego czynnik α pochodzący z drożdży *Saccharomyces cerevisiae* odpowiedzialny za sekrecję rekombinacyjnego białka do pożywki. Fuzji genów dokonano na końcu 5' fragmentu DNA zawierającego gen dla białka Cap wirusa PCV2. Ekspresję prowadzono w kolbach hodowlanych, wykorzystując pożywkę 'BMGY' (ang. Buffered Glycerol-complex Medium) o składzie: 1% ekstrakt drożdżowy, 2% pepton, 100 mM fosforan potasu pH 6.0, 1.34% YNB, 0,00004% biotyna, 1% glicerol. Początkowo, komórki hodowano przez 3 dni w kolbach stożkowych o pojemności 500 ml, w temperaturze 28°C, zastosowano 300 ml podłoża, z intensywnym napowietrzaniem stosując mieszanie, 250 obrotów na minutę, aż do osiągnięcia OD_{600nm} = 4. Następnie, hodowlę komórkową odwirowano, 1500xg przez 5 minut, w temperaturze pokojowej, otrzymany osad komórkowy zawieszono w 200 ml świeżego podłoża 'BMGY' w kolbie stożkowej o pojemności 1500 ml. Hodowlę prowadzono w 28°C z wytrząsaniem 250 obrotów na minutę, aż hodowla osiągnęła OD_{600nm} = 6. Następnie, komórki drożdż-

dżowe z hodowli ponownie odseparowano na drodze wirowania stosując 1500xg przez 5 minut, w temperaturze pokojowej. Otrzymany osad komórkowy zawieszono w 50 ml podłoża BMMY w kolbie stożkowej żebrowanej, o pojemności 500 ml. Hodowlę prowadzono w temperaturze 28°C z wytrząsaniem 250 obrotów na minutę, z dodatkiem metanolu do końcowego stężenia 1%, czas prowadzenia hodowli wynosił 72 h. Po zakończeniu hodowli, wykorzystując ponownie metodę wirowania wyodrębniono dwie frakcje: komórki drożdży w formie osadu oraz supernatant stanowiący tzw. płyn pohodowlany.

Uzyskany w ten sposób supernatant zawierający frakcję rozpuszczalnych białek sekrecyjnych drożdży, w tym m.in. rekombinowane białko kapsydowe wirusa PCV2, poddano procesowi oczyszczania. W celu izolacji i oczyszczania białka kapsydowego wirusa PCV2, frakcję supernatantu zawierającą ekspresjonowane białko kapsydowe wirusa PCV2 poddano procesowi wirowania celem osadzenia białka, w warunkach: 400 000xg/40min/4°C, białko identyfikowano metodą immunologiczną wykorzystując specyficzne przeciwciała rozpoznające białko Cap wirusa PCV2. Uzyskany po odwirowaniu preparat białkowy poddano dalszemu procesowi oczyszczania techniką chromatograficzną z użyciem sita molekularnego, Superose 6 10/300GL (GE Healthcare Life Sciences). Do rozdzielania chromatograficznego wykorzystano kolumnę chromatograficzną pozwalającą na separację białkowych form oligomerycznych. Wykorzystując sito molekularne wyizolowano frakcję białkową, która charakteryzowała się wysokim stopniem oligomeryzacji, wypływając z kolumny jako jedna z pierwszych frakcji białkowych (Fig. 1). Do analizy zastosowano wyizolowany preparat białkowy na drodze wirowania różnicowego. Na Fig. 1 przedstawiono wynik rozdzielania chromatograficznego z wykorzystaniem sita molekularnego. Na wykresie chromatograficznym zaznaczono frakcję białkową zawierającą białko wirusa (Cap PCV2).

Uzyskany po rozdzielaniu chromatograficznym preparat białkowy scharakteryzowano techniką SDS-PAGE (Fig. 2A). Analiza SDS-PAGE pokazała, że wyizolowane białko wykazuje charakter heterogenny, co wskazuje na fakt rozbudowanego układu post-translacyjnych modyfikacji. W celu weryfikacji post-translacyjnych modyfikacji białka rekombinowanego, preparat białkowy poddano działaniu glikozydazy EndoH, a następnie tak uzyskany materiał analizowano metodą Western Blott z użyciem specyficznych przeciwciał rozpoznających białko Cap PCV2 (Fig. 2B).

Preparat białka kapsydowego wirusa PCV2 otrzymanego po rozdzielaniu chromatograficznym na sicie molekularnym poddano również analizie dichroizmu kołowego (Fig. 3), potwierdzając poprawność fałdowania uzyskanego białka rekombinacyjnego.

W celu weryfikacji sekwencji aminokwasowej otrzymanego białka rekombinacyjnego, preparat białkowy został poddany analizie metodą spektrometrii mas, co potwierdziło, że sekwencja aminokwasowa otrzymanego białka kapsydowego wirusa PCV2 w pełni odpowiada sekwencji kodowanej przez gen dla tego białka.

Wykonane prace pozwoliły na otrzymanie białka kapsydowego, jego identyfikację i charakterystykę. Otrzymane białko rekombinowane występuje w formie rozpuszczalnej i ma charakter oligomeru, który jest stabilny w temperaturze pokojowej. Wydajność ekspresji w warunkach laboratoryjnych wynosi około 6 mg preparatu rekombinowanego białka kapsydowego wirusa PCV2 z 1 L zagęszczonej hodowli komórkowej drożdży *Pichia pastoris*.

B. Ekspresja w *E. coli*

Sekwencje białek wchodzących w skład szczepionki

a) użyty gen: nazwa, pochodzenie, sposób izolacji, sekwencja, pochodzenie: (wg nomenklatury dostarczonej przez PIWET-PIB), próbka nr 14-53 z kolekcji PIWET-PIB, wirus o genotypie PCV2b, grupa 1A/1b, wyizolowany z płuc,

nazwa genu: cap_14-53 (synonim: orf2 14_53), długość 702 pz

Nr próbki	PCV2-SD (PMWS)	Rok pobrania	Tkanka	Izolacja w hodowli kom.	Real-time PCR (Ct)	Genotyp	Grupa	Długość ORF2	
								nt	aa
14-53	Potwierdzone metodą ISH	2014	płuca	PK15	12,38	PCV2b	1A/1B	702	234

Sekwencja DNA orf2 wirusa PCV2b 14-53 (cap_14-53):

```
ATGACGTATCCAAGGAGGCGTTACCGGAGAAGAAGACACCGCCCCCGCAGCCATCTTGGC
CAGATCCTCCGCCGCCGCCCTGGCTCGTCCACCCCGCCACCGTTACCGCTGGAGAAGG
AAAAATGGCATCTTCAACACCCGCCTCTCCCGCACCTTCGGATATACTATCAAGCGAACAC
AGTCAAAACGCCCTCCTGGGCGGTGGACATGATGAGATTCAATATTAATGACTTTCTTCCCC
CAGGAGGGGGCTCAAACCCCGCTCTGTGCCCTTTGAATACTACAGAATAAGAAAGGTTAA
GGTTGAATTCTGGCCCTGCTCCCGATCACCCAGGGTGACAGGGGAGTGGGCTCCAGTGC
TGTTATTCTAGATGATAACTTTGTAAACAAAGGCCACAGCCCTCACCTATGACCCCTATGTAA
CTACTCCTCCCGCCATACCATAACCCAGCCCTTCTCCTACCACTCCCGCTACTTTACCCCA
AACCTGTCTAGATTCCACTATTGATTACTTCCAACCAACAAACAAAGAAATCAGCTGTGGC
TGAGACTACAACTGCTGGAAATGTAGACCACGTAGGCCTCGGCACTGCGTTGAAAACAG
TATATACGACCAGGAATACAATATCCGTGTAACCATGTATGTACAATTCAGAGAATTTAATCTT
AAAGACCCCCCACTTAACCCCTAA
```

Sekwencja białka CAP wirusa PCV2b 14-53 (CAP_14-53):

```
MTYPRRRFRRRRHRPRSHLGQILRRRPWLHPRHRYRWRRKNGIFNTRLSRTIGYTVKKTTVRT
PSWNVDMMRFNINDFLPPGGGSNPLTVPFYRIRKVKVEFWPCSPITQGDGRGVGSTAVILDDN
FVTKANALTYDPYVNYSSRHTITQPFYSYHSRYFTP KPVLDRTIDYFQPNKRNQLWLRQLQTGNV
DHVGLGTAFENSIYDQDYNIRITMYVQFREFNLKDPPLNP
```

Komputerowa analiza powyższej sekwencji aminokwasowej białka CAP_14-53 wykazała znaczną zawartość rzadkich dla komórek *E. coli* kodonów, a indeks adaptacji kodonów CAI (ang. Codon Adaptation Index) dla genu cap_14-53 wynosił 0,59 (wartość 1,0 oznacza idealne dopasowanie częstości używania kodonów dla danego gospodarza, a wartości CAI >0,8 uważa się za minimalne dla zapewnienia wydajnej ekspresji białka w układzie heterologicznym). Wykorzystując program komputerowy OptimumGene przeprowadzono optymalizację częstości używania kodonów w sekwencji nukleotydowej genu cap_14-53, w celu zapewnienia wydajnej heterologicznej ekspresji białka w systemach gospodarzy bakteryjnych. W wyniku optymalizacji wyeliminowano z sekwencji genu CAP większość rzadkich kodonów i uzyskano wartość CAI = 0,89, która zwiększa prawdopodobieństwo uzyskania wydajnej nadprodukcji białka CAP w *E. coli*. Zoptymalizowana sekwencja DNA posłużyła do uzyskania syntetycznego genu cap_14-53, który został sklonowany w miejsce Sma1 komercyjnego wektora pUC19.

```
ATGACCTACCCGCGTCGCCGTTATCGCCGTCGTCGCCATCGTCCGCGTTTCGCATCTGGGCC
AAATCCTGCGTCGCCGTCGCTGGTTCATCCGCGTCACCGCTACCGTTGGCGTCGCAA
AAACGGTATTTTTAATACGCGCCTGAGTCGTACGTTCCGGCTATACCATCAAACGCACCACGG
TGAAAACCCCGTCCTGGGCGGTTGATATGATGCGTTTTAACATCAATGACTTCCTGCCGCCG
GGTGGTGGCAGCAACCCGCGCTCTGTCCCGTTTGAATATTACCGCATTTCGTAAAGTGAAAGT
TGAATTCTGGCCGTGCAGCCCGATCACCCAGGGTGATCGTGGTGTGGCAGCTCTGCAGTC
ATTCTGGATGACAACCTTTGTACCAAAGCGACGGCCCTGACCTATGATCCGTACGTGAATTA
TAGTTCCCGCCATACCATCACGCAGCCGTTTTTCATACCACTCGCGTTATTTACGCCGAAAC
CGGTGCTGGATAGCACCATTGACTATTTTCAACCGAACAATAAACGCAACCAGCTGTGGCTG
CGTCTGCAAACGGCAGGCAATGTGCGATCATGTGGGTCTGGGCACCGCTTTGAAAACCTCTA
TCTACGACCAAGAATACAACATCCGCGTGACGATGTATGTCCAGTTCCGTGAATTTAATCTG
AAAGACCCGCGCTGAATCCGTGA
```

Zoptymalizowana (m.in. pod kątem częstości używanych kodonów przez gospodarza bakteryjnego *E. coli* oraz stabilności mRNA) sekwencja syntetycznego genu cap_14-53 stanowi oryginalny i unikalny element szczepionki warunkujący wydajną nadprodukcję w systemie gospodarzy bakteryjnych *E. coli*, rekombinowanego białka CAP_14-53 będącego składnikiem antygenowym szczepionki.

Porównanie sekwencji wyjściowej i zoptymalizowanej cap_14-53 (pogrubioną czcionką zaznaczono zmienione nukleotydy).

Optymalizacja sekwencji DNA nie zmienia właściwości kodujących dla białka CAP_14-53

Zoptymalizowana 1

ATGACCTACCCGCGTCGCCGTTATCGCCGTCGTGCCATCGTCCGCGTTCGCATCTGGGC

Oryginalna 1

ATGACGTATCCAAGGAGGCGTTACCGGAGAAGAAGACACCGCCCCCGCAGCCATCTTGGC

Zoptymalizowana 61

CAAATCCTGCGTCGCCGTCGGTGGCTGGTTCATCCGCGTCACCGCTACCGTTGGCGTCGC

Oryginalna 61

CAGATCCTCCGCCGCCGCCCTGGCTCGTCCACCCCCGCCACCGTTACCGCTGGAGAAGG

Zoptymalizowana 121

AAAAACGGTATTTTTAATACGCGCCTGAGTCGTACGTTCCGGCTATACCATCAAACGCACC

Oryginalna 121

AAAAATGGCATCTTCAACACCCGCCTCTCCCGCACCTTCGGATATACTATCAAGCGAACC

Zoptymalizowana 181

ACGGTGAAAACCCCGTCCTGGGCGGTTGATATGATGCGTTTTAACATCAATGACTTCCTG

Oryginalna 181

ACAGTCAAACGCCCTCCTGGGCGGTGGACATGATGAGATTCAATATTAATGACTTTCTT

Zoptymalizowana 241

CCGCCGGGTGGTGGCAGCAACCCGCGCTCTGTCCCGTTTGAATATTACCGCATTGTA

Oryginalna 241

CCCCCAGGAGGGGGCTCAAACCCCGCTCTGTGCCCTTTGAATACTACAGAATAAGAAAG

Zoptymalizowana 301

GTGAAAGTTGAATTCTGGCCGTGCAGCCCGATCACCCAGGGTGATCGTGGTGTGGCAGC

Oryginalna 301

GTTAAGGTTGAATTCTGGCCCTGCTCCCGATCACCCAGGGTGACAGGGGAGTGGGCTCC

Zoptymalizowana 361

TCTGCAGTCATTCTGGATGACAACTTTGTCACCAAAGCGACGGCCCTGACCTATGATCCG

Oryginalna 361

AGTGCTGTTATTCTAGATGATAACTTTGTAACAAAGGCCACAGCCCTCACCTATGACCCC

Zoptymalizowana 421

TACGTGAATTATAGTTCCCGCCATACCATCACGCAGCCGTTTTTCATACCACTCGCGTTAT

Oryginalna 421

TATGTAACTACTCCTCCCGCCATACCATAACCCAGCCCTTCTCCTACCACTCCCGCTAC

Zoptymalizowana 481

TTCACGCCGAAACCGGTGCTGGATAGCACCATTGACTATTTTCAACCGAACAATAAACGC

Oryginalna 481

TTTACCCCAAACCTGTCCTAGATTCCACTATTGATTACTTCCAACCAAACAACAAAAGA

Zoptymalizowana 541

AACCAGCTGTGGCTGCGTCTGCAAACGGCAGGCAATGTCGATCATGTGGGTCTGGGCACC

Oryginalna 541

AATCAGCTGTGGCTGAGACTACAACTGCTGGAAATGTAGACCACGTAGGCCTCGGCACT

Zoptymalizowana 601

GCTTTGAAACTCTATCTACGACCAAGAATACAACATCCGCGTGACGATGTATGTCCAG

Oryginalna 601

GCGTTCGAAACAGTATATACGACCAGGAATACAATATCCGTGTAACCATGTATGTACAA

Zoptymalizowana 661 TTCCGTGAATTTAATCTGAAAGACCCGCCGCTGAATCCGTGA

Oryginalna 661 TTCAGAGAATTTAATCTTAAAGACCCCCACTTAACCCCTTAA

b) Użyte wektory ekspresyjne

1. pET-32a, Trx-Tag, His-Tag, S-Tag, Amp, komercyjny wektor ekspresyjny (Novagen)

Wektor posiada promotor faga T7, dwie sekwencje His6-tag, terminator z faga T7. Wektor zawiera gen kodujący β -laktamazę (oporność na ampicylinę) jako marker selekcyjny oraz lacI kodujący represor operonu laktozowego, miejsce startu replikacji replikacji (ori) pBBR322 oraz faga f1. Umożliwia heterologiczną ekspresję rekombinowanego białka w formie peptydu fuzyjnego z tioredoksyną (Trx, 109aa), wyposażonego w etykietkę His6-tag na N- lub C-końcu. Wielkość 5900 pz. Obecność partnera Trx poprawia wydajność ekspresji i fałdowanie rekombinowanego białka fuzyjnego. Mapę fizyczną i genetyczną wektora pET32a (+) przedstawiono na Figurze 4.

2. pETite N-His SUMO Kan, komercyjny wektor ekspresyjny (Lucigen)

Wektor posiada promotor T7-lac, syntetyczne miejsce wiązania rybosomu (RBS), miejsce startu translacji (ATG) oraz kodon stop, 4 terminatory T7, sekwencję His6-tag oraz SUMOtag, miejsce startu replikacji typu ColE1. Wektor zawiera gen kodujący oporność na kanamycynę jako marker selekcyjny. Umożliwia heterologiczną ekspresję rekombinowanego białka w formie peptydu fuzyjnego z małym białkiem podobnym do ubikwityny (SUMO), które podobnie jak Trx wpływa pozytywnie na wydajność ekspresji i fałdowanie rekombinowanego białka fuzyjnego wyposażonego w etykietkę His6-tag na N-końcu. Wielkość 2500 pz. Mapę fizyczną i genetyczną wektora pETite N-His SUMO Kan przedstawiono na Figurze 5.

c) Klonowanie, fuzja genetyczna i sekwencja aminokwasowa rekombinowanych białek CAP₁₄₋₅₃

Na podstawie zoptymalizowanej sekwencji DNA cap₁₄₋₅₃ zaprojektowano zestawy starterów do reakcji PCR, które wyposażono albo w miejsca rozpoznawane przez enzymy restrykcyjne umożliwiające klonowanie powielonych fragmentów DNA w wektorze pET32a, albo w nadmierności komplementarne do sekwencji wektora pETite N-His SUMO umożliwiające sklonowanie fragmentu DNA niezależne od ligacji). Startery zaprojektowano w taki sposób aby fragment DNA mógł zostać sklonowany w odpowiednim wektorze w zgodnej fazie odczytu kodonów z elementami genetycznymi wektora niezbędnymi do prawidłowej translacji rekombinowanego białka.

Sekwencje DNA starterów: pET32a

CAP₁₄₋₅₃_pET_Nco_Fw: AA**ACC**ATGGCCTACCCGCGTCGCCGTT

CAP₁₄₋₅₃_pET_Hind_Rw: AAA**AAG**CTTTCACGGATTCAGCGGCGGG

Miejsca rozpoznawane przez enzymy restrykcyjne pogrubiono i podkreślono.

Sekwencje DNA starterów: pETite N-His SUMO

CAP₁₄₋₅₃_SUMO_Fw: **CGCGA**ACAGATTGGAGGTACCTACCCGCGTCGCCGTTAT

CAP₁₄₋₅₃_SUMO_Rw: **GTGGCGG**CGCTCTATTACGGATTCAGCGGCGGGTCTTT

Nadmierności komplementarne do sekwencji wektora pogrubiono i podkreślono.

Odcinki DNA obejmujące odpowiednie fragmenty syntetycznego cap₁₄₋₅₃ powielono w reakcji PCR z użyciem w/w starterów, a poprawność sekwencji DNA w uzyskanych amplikonach sprawdzono poprzez sekwencjonowanie. Powielone fragmenty klonowano do w/w wektorów ekspresyjnych uzyskując dwa różne konstrukty plazmidowe:

1. pET-CAP: wektor pET-32a z fragmentem (długości 699 pz) syntetycznego genu orf2_{14_53} pozbawionym własnego kodonu ATG, sklonowanym w miejsca NcoI i HindIII. Rekombinowane białko CAP₁₄₋₅₃ nadprodukowane z tego konstrukt posiada etykietkę His6 na N-końcu). Uzyskany plazmidowy konstrukt genetyczny umożliwia heterologiczną ekspresję białka CAP w formie peptydu fuzyjnego z tioredoksyną (Trx) – Trx-CAP.

Sekwencja aminokwasowa rekombinowanego fuzyjnego białka Trx-CAP. Podkreślono fragment stanowiący część białka fuzyjnego odpowiadającą sekwencji CAP₁₄₋₅₃. Pogrubioną czcionką oznaczono etykietkę His6-Tag umożliwiającą oczyszczanie rekombinowanego białka Trx-CAP na drodze chromatografii powinowactwa. Rekombinowane białko fuzyjne Trx-CAP obejmuje 392 aminokwasy,

jego masa cząsteczkowa i punkt izoelektryczny (obydwie wartości obliczone na podstawie sekwencji aminokwasowej) wynoszą odpowiednio 44,95 kDa oraz 9,694.

MSDKIIHLTDDSFDTDLKADGAILVDFWAEWCGPCKMIAPILDEIADEYQGKLTVAKLNIDQNP
TAPKYGIRGIPTLLLFKNGEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLAGSGSGHMHSSGLVPRG
SGMKETAAAKFERQHMDSPDLGTDDDDKAMAYPRRRYRRRRHRPRSHLGQILRRRPWLHPR
HRYRWRKNGIFENTRLSRTEGYTIKRTTVKTPSWAVDMMRFNINDELPPGGGSNPRSVPFYYR
IRKVKVEFWPCSPITQGDGVRGSSAVILDDNFVTKATALTYDPYVNYSSRHTITQPFYSYHSRYET
PKPVLDSIDYFQPNKRNQLWLRQLTAGNVHDVGLGTAFENSIYDQEYNIRVTMYVQFREFNL
KDPPLNP

2. pS-CAP: wektor pETite N-His SUMO z fragmentem (długości 696 pz) syntetycznego genu orf2 14_53, pozbawionym własnych kodonów ATG i STOP, rekombinacja do wektora niezależna od ligacji). Rekombinowane białko CAP_14-53 nadprodukowane z tego konstrukt posiada etykietkę His6 na N-końcu). Uzyskany plazmidowy konstrukt genetyczny umożliwia heterologiczną ekspresję białka CAP w formie peptydu fuzyjnego z małym białkiem podobnym do ubikwityny (SUMO) – SUMO-CAP.

Sekwencja aminokwasowa rekombinowanego fuzyjnego białka SUMO-CAP. Podkreślono fragment stanowiący część białka fuzyjnego odpowiadającą sekwencji CAP_14-53. Pogrubioną czcionką oznaczono etykietkę His6-Tag umożliwiającą oczyszczanie rekombinowanego białka SUMO-CAP na drodze chromatografii powinowactwa. Rekombinowane białko fuzyjne SUMO-CAP obejmuje 339 aminokwasów, jego masa cząsteczkowa i punkt izoelektryczny (obydwie wartości obliczone na podstawie sekwencji aminokwasowej) wynoszą odpowiednio 40 kDa oraz 9,831.

MHHHHHGSGLQDSEVNQEAKPEVKPEVKPETHINLKVSDGSSEIFFKIKKTTPLRRLMEAFARQ
GKEMDSLTFLYDGIQADQTPEDLDMEDNDIIEAHREQIGGTYPRRRYRRRRHRPRSHLGQILR
RRPWLHPRHRYRWRKNGIFENTRLSRTEGYTIKRTTVKTPSWAVDMMRFNINDELPPGGGSN
PRSVPFYYRIRKVKVEFWPCSPITQGDGVRGSSAVILDDNFVTKATALTYDPYVNYSSRHTITQ
PFYSYHSRYETPKPVLDSIDYFQPNKRNQLWLRQLTAGNVHDVGLGTAFENSIYDQEYNIRVT
MYVQFREFNLKDPPLNP

Uzyskane rekombinowane plazmidy ekspresyjne zawierające miejsce startu replikacji (ori) odpowiednio typu pBBR322 (pMB1) oraz ColE1, występują w komórkach E. coli jako elementy pozachromosomalne w podobnej ilości kopii, która dla obydwu typów ori wynosi od ~15–20 w przeliczeniu na ekwiwalent chromosomu. W każdym z uzyskanych rekombinowanych plazmidów poprawność sklonowania fragmentu genu orf2 14-53 sprawdzono poprzez sekwencjonowanie, zwracając szczególną uwagę na zgodność faz odczytu kodonów wstawianego odcinka DNA i sekwencji wektora. Wszystkie uzyskane konstrukty plazmidowe są stabilne genetycznie i segregacyjnie.

3. Opis części doświadczalnej

Konstrukty plazmidowe pET-CAP i pS-CAP wprowadzono poprzez transformację z użyciem znanej w dziedzinie metody chemicznej do kilku komercyjnych szczepów E. coli (Tabela 1), które umożliwiają precyzyjną kontrolę nadprodukcji białek rekombinowanych (ekspresja rekombinowanych białek CAP w E. coli jest indukowana i kontrolowana za pomocą induktora IPTG-izopropyl- β -D-tiogalaktozyd) i/lub poprawiają wydajność ekspresji dostarczając np. dodatkowe geny kodujące tRNA rzadkie dla gospodarza bakteryjnego.

T a b e l a 1. Charakterystyka użytych szczepów gospodarzy E. coli

Nazwa szczepu	Charakterystyka	Pochodzenie
BL21(DE3)	F- ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B - m _B -) λ (DE3)	Novagen
BL21(DE3)pLysS	F- ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B - m _B -) λ (DE3) pLysS (Cam ^R)	Novagen
Rosetta™	F- ompT hsdS _B (r _B - m _B -) gal dcm λ (DE3)	Novagen
2(DE3)pLysS	pLysSRARE (Cam ^R)	

Plazmidami pET-CAP transformowano szczepy E. coli BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS oraz Rosetta™ 2(DE3)pLysS.

Plazmidami pS-CAP transformowano szczepy *E. coli* BL21(DE3) oraz Rosetta™ 2(DE3)pLysS.

W wyniku przeprowadzonej optymalizacji nadprodukcji i oczyszczania rekombinowanych białek fuzyjnych CAP, do produkcji w skali semipraparatywnej białka będącego składnikiem antygenowym szczepionki wybrano dwa układy „konstrukt plazmidowy – szczep *E. coli*” zapewniające największą wydajność nadekspresji odpowiednich białek:

1. Fuzyjne białko Trx-CAP z plazmidu pET-CAP w szczepie *E. coli* Rosetta™ 2(DE3)pLysS
2. Fuzyjne białko SUMO-CAP z plazmidu pS-CAP w szczepie *E. coli* Rosetta™ 2(DE3)pLysS

Opracowane parametry hodowli i warunki oczyszczania obydwu rekombinowanych białek obejmują:

- Dla białka Trx-CAP:

Hodowlę bakterii *E. coli* Rosetta™ 2(DE3)pLysS przenoszących plazmid pET-CAP, w płynnym podłożu LB (Sambrook et al. 1989) uzupełnionym antybiotykami: ampicyliną (stężenie końcowe 100 µg/ml) oraz chloramfenikolem (stężenie końcowe 34 µg/ml), inkubowano w temp. 37°C, przy 200 RPM przez 14–18 h, następnie rozcieńczano 40-krotnie w świeżym płynnym podłożu LB (uzupełnionym w/w antybiotykami w takim samym stężeniu) i inkubowano w temp. 37°C, przy 200 RPM do momentu osiągnięcia przez hodowlę gęstości optycznej $OD_{600} = 0,6$. Do hodowli w tej fazie wzrostu dodawano induktora IPTG (ThermoFisher) (końcowe stężenie induktora 0,1 mM), a następnie hodowlę inkubowano przez 4 h w temp. 28°C, przy 200 RPM. Po tym czasie, całą hodowlę poddawano wirowaniu przy 5000 x g przez 20 minut w temp. 4°C. Osad bakterii zawieszano w buforze do lizy o składzie: 50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, pH=8,0, po czym dodawano lizozym (Sigma Aldrich) (stężenie końcowe 1 mg/ml) oraz koktajl inhibitorów proteaz (Sigma Aldrich) (AEBSF, Aptonina, Bestatyna, E64, Leupeptyna, Pepstatyna A). Tak przygotowaną zawiesinę komórek inkubowano w lodzie przez 40 minut lekko mieszając (kołyska laboratoryjna przy 18 RPM). Po tym czasie, zawiesinę komórek poddawano dezintegracji stosując prasę French'a (16000 psi) a otrzymany lizat bakterii wirowano przez 20 minut, 10000 x g, w temp. 4°C. Z powstałego po wirowaniu supernatantu, zawierającego frakcję białek rozpuszczalnych, oczyszczano rekombinowane białko Trx-CAP w formie natywnej stosując chromatografię powinowactwa na złożu agarozowo-niklowym (cOMplete His-Tag Purification Resin, Roche). Zastosowano następujące, ustalone empirycznie parametry: inkubacja uzyskanego w poprzednim etapie supernatantu ze złożem przez 4 h, z lekkim mieszaniem (kołyska laboratoryjna przy 15 RPM), w temp. 4°C, po której następowało oczyszczanie na kolumnie poprzez serię płukań złoża ze związanymi białkami za pomocą buforów o składzie: 50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, pH = 8,0 oraz zwiększającym się stężeniem imidazolu (Sigma Aldrich) (odpowiednio: 10 mM, 20 mM, 50 mM i 100 mM), oraz końcową elucję białka Trx-CAP ze złoża za pomocą buforu o składzie: 50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 250 mM imidazolu, pH=8,0. Uzyskany preparat poddawano ultrafiltracji na kolumnie Amicon Ultra 10 (Merck Millipore), a końcowe stężenie białka w preparacie mierzono metodą Bradforda i z wykorzystaniem pomiaru fluorymetrycznego (Qubit Protein Assay, ThermoFisher).

Modyfikacja metody nadprodukcji w *E. coli* i oczyszczania nowego rekombinowanego białka fuzyjnego Trx-CAP, którego biosynteza w komórce jest oparta na oryginalnie zmodyfikowanej sekwencji DNA genu *cap_14-53*, z której wynikają korzyści w stosunku do wcześniej stosowanych metod otrzymywania tego typu białek polega na zastosowaniu unikalnej kombinacji parametrów:

- temperatury i czasu hodowli wyselekcjonowanego empirycznie szczepu gospodarza bakteryjnego przenoszącego rekombinowany plazmid pET-CAP przed indukcją ekspresji białka,
- stężenia induktora IPTG zastosowanego do indukcji ekspresji białka Trx-CAP oraz optymalnego czasu i temperatury indukcji ekspresji rekombinowanego białka w komórkach *E. coli*,
- użytego sposobu dezintegracji bakterii nadprodukujących rekombinowane białko Trx-CAP,
- zastosowanego sposobu oczyszczania rekombinowanego białka Trx-CAP na złożu agarozowo-niklowym, który obejmuje optymalną ilość płukań złoża oraz stężenie czynnika eluującego (imidazolu).

Jedynie po zastosowaniu takiej kombinacji parametrów rekombinowane białko fuzyjne Trx-CAP może być nadprodukowane i oczyszczane z wysoką wydajnością. Otrzymany preparat stanowiący składnik antygenowy szczepionki to roztwór oczyszczonego białka o średnim stężeniu 0,5 mg/ml. Na Figurze 6 przedstawiono zdjęcie żelu (SDS-Page) dla otrzymanego białka Trx-CAP. Wydajność produkcji białka Trx-CAP według opisanych powyżej parametrów wynosi 20 mg białka z 1 L hodowli bakteryjnej.

- Dla białka SUMO-CAP:

Hodowlę bakterii *E. coli* Rosetta™ 2(DE3)pLysS przenoszących plazmid pS-CAP, w płynnym podłożu LB (Sambrook et al. 1989) uzupełnionym antybiotykami: kanamycyną (stężenie końcowe

40 µg/ml) oraz chloramfenikolem (stężenie końcowe 34 µg/ml), inkubowano w temp. 37°C, przy 200 RPM przez 14–18 h, następnie rozcieńczano 40-krotnie w świeżym płynnym podłożu LB (uzupełnionym w/w antybiotykami w takim samym stężeniu) i inkubowano w temp. 37°C, przy 200 RPM do momentu osiągnięcia przez hodowlę gęstości optycznej $OD_{600} = 0,6$. Do hodowli w tej fazie wzrostu dodawano induktora IPTG (ThermoFisher) (końcowe stężenie induktora 1 mM), a następnie hodowlę inkubowano przez 4 h w temp. 37°C, przy 200 RPM. Po tym czasie, całą hodowlę poddawano wirowaniu przy 5000 x g przez 20 minut w temp. 4°C. Osad bakterii zawieszano w buforze do lizy o składzie: 50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, pH = 8,0, po czym dodawano lizozym (Sigma Aldrich) (stężenie końcowe 1 mg/ml) oraz koktajl inhibitorów proteaz (Sigma Aldrich) (AEBSF, Aprotinina, Bestatyna, E64, Leupeptyna, Pepstatyna A). Tak przygotowaną zawiesinę komórek inkubowano w lodzie przez 40 minut lekko mieszając (kołyska laboratoryjna przy 18 RPM). Po tym czasie, zawiesinę komórek poddawano dezintegracji stosując prasę French'a (16000 psi), a otrzymany lizat bakterii wirowano przez 20 minut, 10000 x g, w temp. 4°C. Z powstałego po wirowaniu supernatantu, zawierającego frakcję białek rozpuszczalnych, oczyszczano rekombinowane białko SUMO-CAP w formie natywnej stosując chromatografię powinowactwa na złożu agarozowo-niklowym (cComplete His-Tag Purification Resin, Roche). Zastosowano następujące ustalone empirycznie parametry: inkubacja uzyskanego w poprzednim etapie supernatantu ze złożem przez 4 h, z lekkim mieszaniem (kołyska laboratoryjna przy 15 RPM), w temp. 4°C, po której następowało oczyszczanie na kolumnie poprzez serię płukań złoża ze związanymi białkami za pomocą buforów o składzie: 50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, pH = 8,0 oraz zwiększającym się stężeniem imidazolu (Sigma Aldrich) (odpowiednio: 10 mM, 20 mM, 50 mM i 100 mM), oraz końcowe wymywanie białka SUMO-CAP ze złoża z użyciem buforu o składzie: 50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 250 mM imidazolu, pH = 8,0. Uzyskany preparat poddawano ultrafiltracji na kolumnie Amicon Ultra 10 (Merck Millipore), a końcowe stężenie białka w preparacie mierzono metodą Bradforda i z wykorzystaniem pomiaru fluorymetrycznego (Qubit Protein Assay, ThermoFisher).

Modyfikacja metody nadprodukcji w *E. coli* i oczyszczania nowego rekombinowanego białka fuzyjnego SUMO-CAP, którego biosynteza w komórce jest oparta na oryginalnie zmodyfikowanej sekwencji DNA genu *cap_14-53*, z której wynikają korzyści w stosunku do wcześniej stosowanych metod otrzymywania tego typu białek polega na zastosowaniu unikalnej kombinacji parametrów:

- temperatury i czasu hodowli wyselekcjonowanego empirycznie szczepu gospodarza bakteriynego przenoszącego rekombinowany plazmid pS-CAP przed indukcją ekspresji białka,
- stężenia induktora IPTG zastosowanego do indukcji ekspresji białka SUMO-CAP oraz optymalnego czasu i temperatury indukcji ekspresji rekombinowanego białka w komórkach *E. coli*,
- użytego sposobu dezintegracji bakterii nadprodukujących rekombinowane białko SUMO-CAP,
- zastosowanego sposobu oczyszczania rekombinowanego białka SUMO-CAP na złożu agarozowo-niklowym, który obejmuje optymalną ilość płukań złoża oraz stężenie czynnika eluującego (imidazolu).

Jedynie po zastosowaniu takiej kombinacji parametrów rekombinowane białko fuzyjne SUMO-CAP może być nadprodukowane i oczyszczane z wysoką wydajnością. Otrzymany preparat stanowiący składnik antygenowy szczepionki to roztwór oczyszczonego białka o średnim stężeniu 0,6 mg/ml. Na Figurze 7 przedstawiono zdjęcie żelu (SDS-Page) dla otrzymanego białka SUMO-CAP. Wydajność produkcji białka SUMO-CAP według opisanych powyżej parametrów wynosi 24 mg białka z 1 L hodowli bakteriynnej.

III. Peptydy

Do przygotowania szczepionki przeciwko cirkowirusowi świń mogą być wykorzystane peptydowe fragmenty białka kapsydowego PVC2 przedstawione w tabeli 2.

Tabela 2

CAP41	SRTIGYTVKKTTVRTPSWNVDM
CAP67	SNPLTVPFYYRIRKVKVE
CAP91	STAVILDDNFVTKANALTY
CAP121	KPVLDRITIDYFQPNNKR
CAP141	SIYDQDYNIRITMYVQFRE
CAP15	QFREFNLKDPPLNPK

IV. Zestaw diagnostyczny do oceny immunogenności antygenów PCV2

W przykładowej realizacji, zestaw immunodiagnostyczny według wynalazku zawiera następujące składniki:

1. Płytki polistyrenowe Maxisorp pokryte antygenem białkowym lub peptydowym
2. Ujemna surowica kontrolna PCV, rozcieńczona 100-krotnie
3. Dodatnia surowica kontrolna PCV, rozcieńczona 100-krotnie
4. Roztwór koniugatu przeciwciał anti-IgG i IgM świni znakowanych peroksydazą
5. Rozcieńczalnik do próbek i koniugatu (roztwór kazeiny o stężeniu 0,2–2% w 50 mM buforze Tris-HCl, pH 7,5–8,0 z dodatkiem chlorku sodowego o stężeniu 0,15–0,5 mol/l oraz detergentu Tween 20 o stężeniu 0,05–0,2%)
6. Roztwór płuczący (roztwór chlorku sodowego w zakresie 0,2–0,5 mol/l w 20 mM buforze Tris-HCl, pH 7,5–8,0 z dodatkiem detergentu Tween 20 o stężeniu 0,05–0,2%)
7. Roztwór substratu zawierający tetrametylobenzydynamę stężeniu 0,1–1 mg/ml z dodatkiem nadtlenu wodoru o stężeniu 0,01–0,1% w 20 mM buforze cytrynianowym o pH 4,0–5,0
8. Roztwór hamujący zawierający 1N kwas siarkowy.

Test według wynalazku w jednej z realizacji można wykonać w następujący sposób:

1. Surowice należy rozcieńczyć 100-krotnie w rozcieńczalniku do próbek
2. Do studzienek dodać po 100 µl samego rozcieńczalnika (próba zerowa), ujemną surowicę kontrolną, pozytywną surowicę kontrolną, oraz próbki
3. Płytkę inkubować przez 1 godz. w temp. 37°C
4. Płytkę przemyć 3-krotnie roztworem płuczącym (300 µl/studzienkę)
5. Do studzienek dodać po 100 µl rozcieńczonego koniugatu i inkubować przez 1 godz. w temp. 37°C
6. Płytkę przemyć 4-krotnie roztworem płuczącym (300 µl/studzienkę)
7. Do studzienek dodać po 100 µl roztworu substratu i inkubować przez 30 min w temp. pokojowej, co 10 min wstrząsając delikatnie płytką
8. Reakcję enzymatyczną przerwać poprzez dodanie do studzienek po 100 µl roztworu hamującego
9. Po 5 min odczytać absorbancję przy 450 nm

a. Otrzymanie koniugatów peptydów z nośnikiem

Do 1 mg peptydu rozpuszczonego w 0,5 ml 50 mM buforu boranowego pH 8,0 dodano 50 µl 2,5% aldehydu glutarowego i inkubowano 30 min w temp. pokojowej, po czym dodano 2 mg owoalbuminy w 0,5 ml 50 mM buforu boranowego pH 8,0 i inkubowano 1 godz. w temp. pokojowej. Następnie dializowano do 1 l PBS w temp. 4°C. Koniugat przechowywano w -20°C.

b. Test ELISA do oznaczania poziomu przeciwciał przeciwko białku PCV2

Płytki polistyrenowe do ELISA opłascza się antygenem TrxCAP o stężeniu 2 µg/ml lub peptydami CAP41, CAP67 lub CAP121 o stężeniu 10 µg/ml w PBS przez 16 godz. w temp. 4°C. Następnie, studzienki blokuje się roztworem 1% kazeiny w TBS przez 1 godz. w temp. pokojowej, po czym do studzienek płytki dodaje się 100 µl próbki surowicy rozcieńczonej od 10 do 1000 razy roztworem 1% kazeiny i inkubuje się przez 60 min w temp. 37°C. Następnie, płytkę przepłukuje się 3-krotnie roztworem TBS z dodatkiem 0,05% Tween 20. Do studzienek dodaje się 100 µl koniugatu przeciwciała przeciwko immunoglobulinom klasy IgG oraz IgM świni, znakowanego peroksydazą chrzanową, rozcieńczonego roztworem 1% kazeiny w TBS i inkubuje się przez 60 min w temp. 37°C. Po 3-krotnym przepłukaniu płytki, do studzienek dodaje się 100 µl roztworu 1 mM tetrametylobenzydynamy z 0,03% nadtlakiem wodoru w 50 mM buforze cytrynianowym pH 4,5 i inkubuje przez 10–30 min w temp. pokojowej. Reakcję enzymatyczną przerywa się poprzez dodanie 100 µl 2N kwasu siarkowego i odczytuje absorbancję przy 450 nm.

V. Opracowanie i ocena właściwości biologicznych antygenów cirkowirusa świń typu 2 (PCV2) do produkcji szczepionki i zestawu diagnostycznego

Przeprowadzono następujące czynności i analizy:

1. Określono maksymalną wydajność procesów otrzymywania antygenów PCV2, stanowiących substancje czynne szczepionek doświadczalnych do uodporniania świń.

Po szczegółowej analizie stwierdzono, że możliwe jest uzyskanie antygenów w ilości pozwalającej na zaszczepienie świń dawką 5-krotnie wyższą, niż dotychczas stosowane (500 µg/zwierzę zamiast 100 µg/zwierzę). Opracowano skład kolejnych szczepionek, obejmujący: zwiększoną dawkę antygeny,

komercyjnie dostępny adiuwant typu olej w wodzie (Montanide ISA 28R VG, Seppic, Francja), alkohol benzylowy i PBS.

2. Przygotowano wniosek do Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach i po uzyskaniu akceptacji zgody rozpoczęto realizację doświadczenia na świnich.

3. Przeprowadzono doświadczenia na świnich, obejmujące zastosowanie wyższej dawki substancji czynnej (500 µg) oraz dwukrotną immunizację.

W dniu rozpoczęcia doświadczenia świnie zostały zważone i podzielone na grupy doświadczalne po 5–6 osobników. Świnie zostały zaszczepione preparatami zawierającymi następujące substancje czynne:

grupa 1 (5 świń) – antygen (białko o SEQ ID NO: 1) uzyskany w systemie *Pichia pastoris*,

grupa 2 (6 świń) – antygen peptydowy CAP OVA (zawierający peptydy o sekwencjach SEQ ID NO: 2, 3 i 5),

grupa 3 (6 świń) – antygen SCap (białko o SEQ ID NO: 9) uzyskany w systemie *Escherichia coli*.

grupa 4 (5 świń) otrzymała komercyjnie dostępną szczepionkę. W trakcie trwania doświadczenia od zwierząt pobierano krew oraz wymazy z nosa i odbytu. Ponadto, świnie były poddane codziennej obserwacji klinicznej.

Świnie zaszczepiono dwukrotnie: w dniu 0 oraz około miesiąc później. Cztery tygodnie po drugiej immunizacji zwierzęta zostały zakażone donosowo.

Po około 82–88 dniach od rozpoczęcia doświadczenia, świnie zważono i poddano eutanazji polegającej na podaniu letalnych dawek pentobarbitalu sodu. Przeprowadzono badanie sekcyjne i pobrano wycinki tkanek do dalszych analiz.

4. Określono poziom przeciwciał anti-PCV2 przy użyciu opracowanego testu ELISA.

Wyniki uzyskane w tym teście zostały przedstawione na Fig. 8.

Uzyskane poziomy przeciwciał dla rekombinowanych białek PCV2 wskazują, że już po jednokrotnym szczepieniu opracowanymi szczepionkami dochodzi do wzrostu mian przeciwciał klasy IgM i IgG. Poziom immunizacji uzyskany dzięki szczepionce według wynalazku był nieoczekiwanie znacznie wyższy niż osiągnięty za pomocą komercyjnie dostępnej szczepionki (preparat Porcilis).

5. Określono występowanie materiału genetycznego PCV2 w surowicy krwi świń

Do identyfikacji DNA PCV2 w próbkach surowicy świń wykorzystano PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR; według Opriessnig et al., *Vet Pathol* 2003, 40, 521–529). Przez cały okres trwania doświadczenia nie stwierdzono wyników sugerujących występowanie bardzo dużej liczby kopii PCV2 w badanych próbkach. Ponadto, nie zaobserwowano objawów klinicznych zakażenia PCV2 ani typowych dla niego zmian sekcyjnych. Powyższe wyniki wskazują, że świnie z wszystkich grup doświadczalnych nie były wrażliwe na zakażenie dużą dawką szczepu PCV2, w związku z czym nie doszło do wiremii.

Wykaz sekwencji**SEQ ID NO: 1**

Sekwencja aminokwasowa białka CAP wirusa PCV2b 14-53 (CAP_14-53):

MTYPRRRYRRRRHRPRSHLGQILRRRPWLVHPRHRYRWRRKNGIFNTRLSTRTFGYTIKRTTV
KTPSWAVDMMRFNINDFLPPGGGSNPRSVPFEEYRIRKVKVEFWPCSPITQGDRGVGSSAVI
LDDNFVTKATALTYDPYVNYSSRHTITQPFYSYHSRYFTPKPVLDTIDYFQPNNKRNQLWLR
LQTAGNVDPVGLGTAFENSIYDQEYNIRVTMYVQFRE FNLKDPPLNP

SEQ ID NO: 2

Sekwencja aminokwasowa peptydu CAP41:

SRTIGYTVKKTTVRTPSWNVDM

SEQ ID NO: 3

Sekwencja aminokwasowa peptydu CAP67:

SNPLTVPFEEYRIRKVKVE

SEQ ID NO: 4

Sekwencja aminokwasowa peptydu CAP91:

STAVILDDNFVTKANALTY

SEQ ID NO: 5

Sekwencja aminokwasowa peptydu CAP121:

KPVLDRITIDYFQPNNKR

SEQ ID NO: 6

Sekwencja aminokwasowa peptydu CAP141:

SIYDQDYNIRITMYVQFRE

SEQ ID NO: 7

Sekwencja aminokwasowa peptydu CAP15:

QFRE FNLKDPPLNPK

SEQ ID NO: 8

Sekwencja nukleotydowa dla *Pichia pastoris*:

ATGACATACCCTAGAAGAAGATACAGAAGAAGAAGACATAGACCTAGATCACACTTGGA
CAGATTTTGAGAAGAAGACCTTGGTTAGTTCATCCAAGACACAGATACAGATGGAGAAGA

AAGAATGGAATTTTTAACACAAGATTGTCAAGAACATTTCGGTTATACCATCAAAAGAACT
ACAGTTAAGACCCCTTCATGGGCAGTCGATATGATGAGATTCAATATCAACGACTTCTTG
CCACCTGGTGGAGGTTCCAATCCAAGAAGTGTTCCCTTTCGAATACTACAGAATTAGAAAG
GTTAAGGTCGAGTTCTGGCCATGTTCTCCTATCACACAAGGAGATAGAGGAGTTGGTTCT
TCAGCTGTCATTTTAGATGACAACTTCGTTACAAAGGCTACCGCATTGACTTATGATCCA
TACGTCAACTATTCCAGTAGACATACCATCACTCAACCTTTTTCTTACCACTCAAGATAT
TTCACTCCAAAACCTGTTTTAGATTCCACAATTGACTACTTTCAGCCAAACAACAAGAGA
AACCAATTGTGGTTGAGATTGCAGACCGCCGGTAACGTTGATCATGTCGGATTGGGTACT
GCTTTCGAAAATTCTATCTATGACCAGGAGTATAACATCAGAGTTACTATGTATGTCCAA
TTCAGAGAGTTCAACTTAAAAGACCCTCCATTAAATCCTTAG

SEQ ID NO: 9

Sekwencja aminokwasowa białka TRX-CAP:

MSDKI IHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAEWCGPCKMIAPILDEIADEYQGKLTVAKLNID
QNPGTAPKYGIRGIPTLLLFKNGEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLAGSGSGHMHMHHS
GLVPRSGMKETAATAKFERQHMDSPDLGTDKKAMAYPRRRYRRRRHRPRSHLGQILRRRP
WLHPRHRYRWRRKNGIFNTRLSTFGYTIKRTTVKTPSWAVDMMRFNINDFLPPGGGSNPR
SVPFEYYRIRKVKVEFWPCSPITQGDRGVGSSAVILDDNFVTKATALTYDPYVNYSSRHTIT
QPFYSYHSRYFTPKPVLDSIDYFQPNKNRNLWLRLQTAGNVDPVGLGTAFENSIYDQEYNI
RVTMYVQFREFNLKDPPLNP

SEQ ID NO: 10

Sekwencja aminokwasowa białka SUMO-CAP:

MHHHHHHSGLQDSEVNQEAKEPEVKPEVKPETHINLKVSDGSSEIFFKIKKTTPLRRLMEAFA
KRQKGEMDSLTFLYDIEIQADQTPEDLDMEDNDIIIEAHREQIGGTYPRRRYRRRRHRPRSH
LGQILRRRPWLHPRHRYRWRRKNGIFNTRLSTFGYTIKRTTVKTPSWAVDMMRFNINDFL
PPGGGSNPRSVFPFEYYRIRKVKVEFWPCSPITQGDRGVGSSAVILDDNFVTKATALTYDPYV
NYSSRHTITQPFYSYHSRYFTPKPVLDSIDYFQPNKNRNLWLRLQTAGNVDPVGLGTAFEN
SIYDQEYNIRVTMYVQFREFNLKDPPLNP

SEQ ID NO: 11

Sekwencja nukleotydowa białka TRX-CAP:

ATGAGCGATAAAATTATTCACCTGACTGACGACAGTTTTGACACGGATGTACTCAAAGCGGA
CGGGGCGATCCTCGTCGATTTCTGGGCAGAGTGGTGCGGTCCGTGCAAAATGATCGCCCCGA
TTCTGGATGAAATCGCTGACGAATATCAGGGCAAACCTGACCGTTGCAAACTGAACATCGAT
CAAAACCCCTGGCACTGCGCCGAAATATGGCATCCGTGGTATCCCGACTCTGCTGCTGTTCAA
AAACGGTGAAGTGGCGGCAACCAAAGTGGGTGCACTGTCTAAAGGTCAGTTGAAAGAGTTCC
TCGACGCTAACCTGGCCGTTCTGGTTCTGGCCATATGCACCATCATCATCATCATCTTCTCT
GGTCTGGTGCCACGCGTTCTGGTATGAAAGAAACCGCTGCTGCTAAATTGAAACGCCAGCA
CATGGACAGCCCAGATCTGGGTACCGACGACGACGACAAGGCCATGGCCTACCCGCGTCGCC
GTTATCGCCGTCGTCGCCATCGTCCGCGTTCGCATCTGGGCCAAATCCTGCGTCGCCGTCGG
TGGCTGGTTCATCCGCGTCACCGCTACCGTTGGCGTCGCAAAAACGGTATTTTAAATACGCG
CCTGAGTCGTACGTTTCGGCTATACCATCAAACGCACCACGGTGAAAACCCGTCCTGGGCGG
TTGATATGATGCGTTTTAACATCAATGACTTCCTGCCGCCGGGTGGTGGCAGCAACCCGCGC
TCTGTCCCGTTTGAATATTACCGCATTCGTAAAGTGAAAGTTGAATTCTGGCCGTGCAGCCC
GATACCCAGGGTGATCGTGGTGTGGCAGCTCTGCAGTCATTCTGGATGACAACTTTGTCA
CCAAAGCGACGGCCCTGACCTATGATCCGTACGTGAATTATAGTTCCCGCCATACCATCACG
CAGCCGTTTTCATACCACTCGCGTTATTTACGCCGAAACCGGTGCTGGATAGCACCATTGA

CTATTTTCAACCGAACAATAAACGCAACCAGCTGTGGCTGCGTCTGCAAACGGCAGGCAATG
TCGATCATGTGGGTCTGGGCACCGCTTTTCGAAAACCTCTATCTACGACCAAGAATACAACATC
CGCGTGACGATGTATGTCCAGTTCCGTGAATTTAATCTGAAAGACCCGCCGCTGAATCCGTG
A

SEQ ID NO: 12

Sekwencja nukleotydowa białka SUMO-CAP

ATGCATCATCACCACCATCACGGGTCCCTGCAGGACTCAGAAGTCAATCAAGAAGCTAAGCC
AGAGGTCAAGCCAGAAGTCAAGCCTGAGACTCACATCAATTTAAAGGTGTCCGATGGATCTT
CAGAGATCTTCTTCAAGATCAAAAAGACCACTCCTTTAAGAAGGCTGATGGAAGCGTTCGCT
AAAAGACAGGGTAAGGAAATGGACTCCTTAACGTTCTTGTACGACGGTATTGAAATTCAAGC
TGATCAGACCCCTGAAGATTTGGACATGGAGGATAACGATATTATTGAGGCTCACCGCGAAC
AGATTGGAGGTACCTACCCGCGTCGCCGTTATCGCCGTCGTCGCCATCGTCCGCGTTTCGCAT
CTGGGCCAAATCCTGCGTCGCCGTCGCTGGCTGGTTCATCCGCGTCACCGCTACCGTTGGCG
TCGCAAAAACGGTATTTTTAATACGCGCCTGAGTCGTACGTTTCGGCTATACCATCAAACGCA
CCACGGTGAAAACCCCGTCCTGGGCGGTTGATATGATGCGTTTTAACATCAATGACTTCCTG
CCGCCGGGTGGTGGCAGCAACCCGCGCTCTGTCCCGTTTGAATATTACCGCATTCGTAAAGT
GAAAGTTGAATTCTGGCCGTGCAGCCCGATCACCCAGGGTGATCGTGGTGTGGCAGCTCTG
CAGTCATTCTGGATGACAACCTTTGTACCAAAGCGACGGCCCTGACCTATGATCCGTACGTG
AATTATAGTTCCCGCCATACCATCACGCAGCCGTTTTTCATACCACTCGCGTTATTTACGCC
GAAACCGGTGCTGGATAGCACCATTGACTATTTTCAACCGAACAATAAACGCAACCAGCTGT
GGCTGCGTCTGCAAACGGCAGGCAATGTCGATCATGTGGGTCTGGGCACCGCTTTTCGAAAAC
TCTATCTACGACCAAGAATACAACATCCGCGTGACGATGTATGTCCAGTTCCGTGAATTTAA
TCTGAAAGACCCGCCGCTGAATCCGTAA

Zastrzeżenia patentowe

1. Immunogeny antygen będący peptydem o sekwencji aminokwasowej wybranej spośród: SEQ ID NO: 2, 3 lub 5.
2. Szczepionka przeciwko zakażeniom cirkowirusowym świń zawierająca antygen będący peptydem o sekwencji aminokwasowej wybranej spośród: SEQ ID NO: 2, 3 lub 5, korzystnie związany z farmaceutycznie dopuszczalnym nośnikiem, oraz adiuwant.
3. Szczepionka według zastrz. 2, **znamienna tym**, że nośnik wybiera się z grupy zawierającej owoalbuminę, albuminę i dendrymery.
4. Zestaw immunodiagnostyczny do wykrywania przeciwciał przeciwko cirkowirusowi świń, zwłaszcza do monitorowania poziomu przeciwciał anty-PCV2 w surowicach świńskich, zawierający peptyd o sekwencji aminokwasowej wybranej spośród: SEQ ID NO: 2, 3 lub 5, lub białko o sekwencji SEQ ID NO: 9.
5. Immunogeny antygen będący peptydem o sekwencji aminokwasowej wybranej spośród: SEQ ID NO: 2, 3 lub 5, do zastosowania w leczeniu lub profilaktyce zakażeń cirkowirusowych świń.
6. Zastosowanie peptydu o sekwencji aminokwasowej wybranej spośród: SEQ ID NO: 2, 3 lub 5, lub białka o sekwencji SEQ ID NO: 9, w diagnostyce in vitro zakażeń cirkowirusowych świń, zwłaszcza do monitorowania poziomu przeciwciał anty-PCV2 w surowicach świńskich.

Rysunki

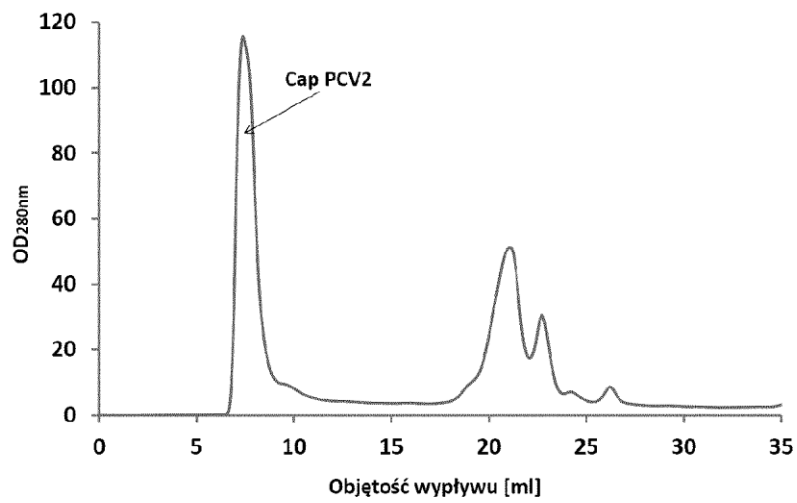
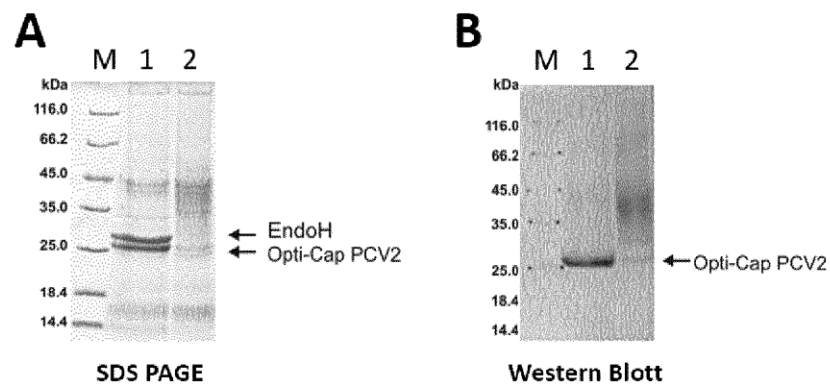


Figura 1



M - białka markerowe

1 - preparat białka kapsydowego wirusa PCV2 poddany działaniu glikozydazy EndoH

2 - preparat białka kapsydowego wirusa PCV2

Figura 2

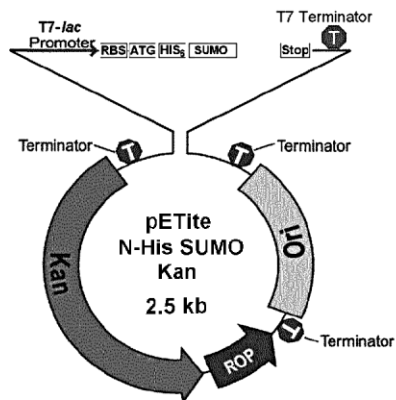
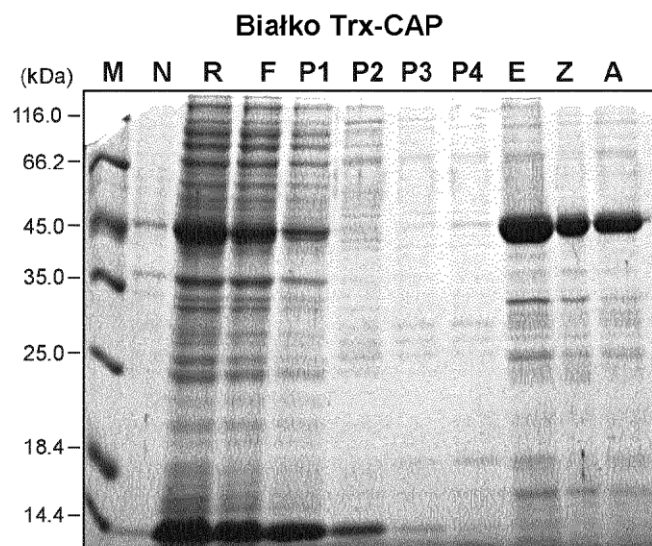
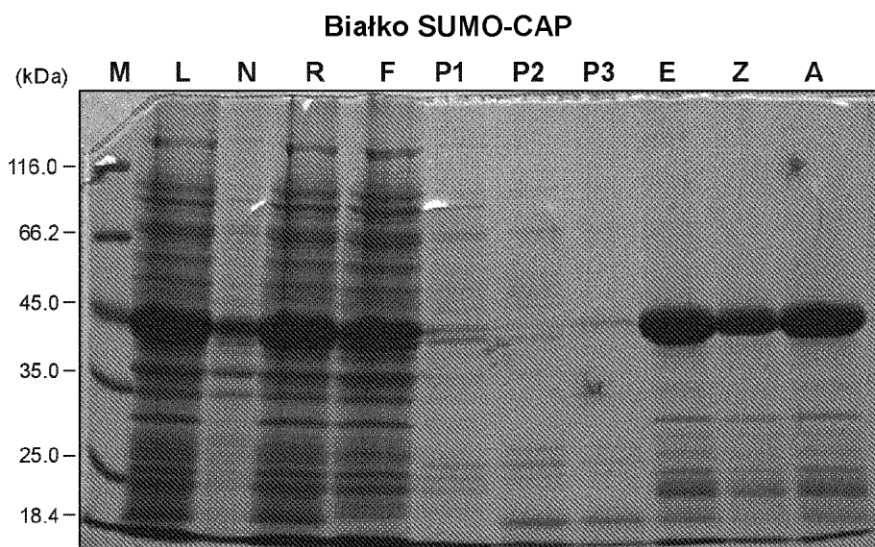


Figura 5



M - marker wielkości Unstained Protein MW Marker (Thermo Fisher Scientific)
R - frakcja rozpuszczalna
N - frakcja nierozpuszczalna
F - niezwiązane ze złożem białka
P - płukania
E - elucja
Z - białka pozostałe na złożu
A - po ultrafiltracji na kolumnie Amicon

Figura 6



M - marker wielkości Unstained Protein MW Marker (Thermo Fisher Scientific)
L - lizat komórek przed frakcjonowaniem
R - frakcja rozpuszczalna
N - frakcja nierozpuszczalna
F - niezwiązane ze złożem białka
P - płukania
E - elucja
Z - białka pozostałe na złożu
A - po ultrafiltracji na kolumnie Amicon

Figura 7

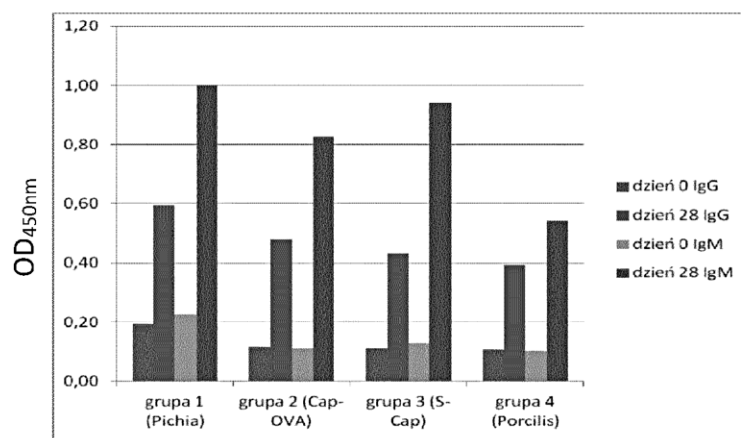


Figura 8