



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0029576

(51)⁷ C12N 1/00; A61K 38/00

(13) B

(21) 1-2016-03426

(22) 27/02/2015

(86) PCT/EP2015/054131 27/02/2015

(87) WO2015/128461 03/09/2015

(30) 61/946,372 28/02/2014 US

(45) 25/09/2021 402

(43) 25/01/2017 346A

(73) BAYER ANIMAL HEALTH GMBH (DE)

Kaiser-Wilhelm-Allee 10, 51373 Leverkusen, Germany

(72) EICKER, Andrea (DE); WEHLMANN, Hermann (DE); MUNNES, Marc (DE);

SCHAUER, Romina (AR); ABRAHAM, Albert (US); WEISS, Christian (DE);

FELDHUES, Elisabeth (DE).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) PHÂN TỬ AXIT NUCLEIC KÍCH THÍCH MIỄN DỊCH VÀ CHẾ PHẨM KÍCH THÍCH MIỄN DỊCH CHỨA PHÂN TỬ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến các chế phẩm ADN kích thích miễn dịch và chế phẩm điều hòa miễn dịch chứa trình tự ADN kích thích miễn dịch. Các chế phẩm theo sáng chế chứa các plasmit kích thích miễn dịch hoặc các hình tự ADN kích thích miễn dịch, có khả năng gây ra đáp ứng miễn dịch ở đối tượng sử dụng. Ngoài ra, các plasmit kích thích miễn dịch, hoặc trình tự ADN kích thích miễn dịch này không chứa trình tự mã hóa kháng chất kháng sinh để giúp giảm khả năng truyền ngang tính kháng chất kháng sinh trong cộng đồng.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Nói chung, sáng chế đề cập đến các plasmid kích thích miễn dịch. Các plasmid này không chứa gen kháng chất kháng sinh. Các plasmid này có thể chứa gen đánh dấu có thể chọn lọc hoặc có thể sàng lọc mà không phải là gen kháng chất kháng sinh (ví dụ, gen LacZ). Cách khác, các plasmid này có thể không chứa các gen đánh dấu có thể chọn lọc hoặc có thể sàng lọc bất kỳ.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các cấu hình CpG không được metyl hóa thường được thấy ở ADN vi khuẩn nhiều hơn rất nhiều so với ADN loài có xương sống. Các cấu hình này hoạt hóa các cơ chế phòng vệ của vật chủ và dẫn đến các đáp ứng miễn dịch bẩm sinh hoặc đáp ứng miễn dịch đạt được. Các cấu hình CpG và các tác dụng kích thích miễn dịch của chúng được tổng hợp trong bài báo của Krieg, *Ann. Rev. Immunol.* 20:709–760 (2002).

Plasmid kích thích miễn dịch chứa một số kiểu hình CpG đã được phát triển và đã được chứng minh là hữu hiệu để gây ra các đáp ứng miễn dịch khi được dùng cho các loài lông vũ và bò, trong chế phẩm điều hòa miễn dịch chứa plasmid và tá dược dẫn phân phát liposom có tính cation. Xem US 2012/0064151 A1 (các loài lông vũ) và US 2013/0295167 A1 (các loài bò), nội dung của các công bố đơn này được đính kèm theo đây hoàn toàn bằng cách viện dẫn. Plasmid này, pMB75.6, có độ dài 4242 bp (base pair: cặp bazơ) và chứa 288 dinucleotit CpG. Bản đồ của pMB75.6 được thể hiện trên FIG. 1 và trình tự nucleotit của pMB75.6 được cung cấp là SEQ ID NO: 2. Như được mô tả trong US 2012/0064151, chế phẩm điều hòa miễn dịch chứa pMB75.6 đã gây ra đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu với kháng nguyên bảo vệ gà con tránh bị bệnh truyền nhiễm khi được dùng trong trứng. Đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu với kháng nguyên này còn được tăng cường bằng cách dùng ít nhất một tác nhân sinh học, như vaccin. Ngoài ra, chế phẩm điều hòa miễn dịch chứa plasmid pMB75.6 đã được phát hiện là có tác dụng hỗ trợ và làm tăng hiệu lực của vaccin. Tương tự, như được mô tả trong US 2013/0295167, chế phẩm điều hòa miễn dịch chứa pMB75.6 đã gây ra đáp

ứng miễn dịch không đặc hiệu với kháng nguyên ở gia súc bảo vệ gia súc tránh bị bệnh truyền nhiễm.

Tuy nhiên, như được thể hiện trên FIG. 1, plasmid pMB75.6 chứa gen kháng kanamycin (Kan^R). Các hệ thống chọn lọc và sản xuất dựa trên chất kháng sinh đang ngày càng trở nên không được tán thành do các vấn đề về việc truyền ngang gen kháng chất kháng sinh vào vi khuẩn trong môi trường. Việc truyền ngang khả dĩ của các gen kháng chất kháng sinh đang đặc biệt là mối quan tâm đối với các vector mà được trực tiếp dùng cho đối tượng (ví dụ, các plasmid kích thích miễn dịch như pMB75.6 hoặc các vector được sử dụng cho liệu pháp gen hoặc cho việc chủng ngừa ADN). Do đó, trong lĩnh vực này, cần có các plasmid kích thích miễn dịch mà có thể gây ra đáp ứng miễn dịch ở đối tượng và đồng thời không chứa các gen kháng chất kháng sinh.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến các plasmid kích thích miễn dịch. Plasmid kích thích miễn dịch này có thể chứa trình tự axit nucleic có mức độ tương đồng về trình tự ít nhất là 89% so với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, hoặc kết hợp của chúng. Theo một số khía cạnh, plasmid kích thích miễn dịch này có thể chứa phân tử axit nucleic có mức độ tương đồng về trình tự ít nhất là 84% so với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 4. Theo một số khía cạnh, plasmid kích thích miễn dịch này có thể chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1. Theo một số khía cạnh, plasmid kích thích miễn dịch này có thể chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 4.

Theo các khía cạnh khác, plasmid kích thích miễn dịch có thể bao gồm trình tự axit nucleic có mức độ tương đồng về trình tự ít nhất là 89% so với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, hoặc kết hợp của chúng. Theo một số khía cạnh, plasmid kích thích miễn dịch này có thể chứa phân tử axit nucleic có mức độ tương đồng về trình tự ít nhất là 84% so với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 4. Theo một số khía cạnh, plasmid kích thích miễn dịch này có thể chứa trình tự SEQ ID NO: 1. Theo một số khía cạnh, plasmid kích thích miễn dịch này có thể chứa trình tự SEQ ID NO: 4.

Theo một số khía cạnh, tốt hơn là plasmid kích thích miễn dịch này không chứa trình tự axit nucleic mã hóa gen đánh dấu có thể chọn lọc hoặc có thể sàng lọc chức năng hoặc có chiều dài đầy đủ. Theo các khía cạnh khác, plasmid kích thích miễn dịch

này chứa trình tự axit nucleic mã hóa gen đánh dấu có thể chọn lọc hoặc có thể sàng lọc mà không phải là gen kháng chất kháng sinh.

Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến các các được phẩm chứa bất kỳ trong số các plasmit kích thích miễn dịch, hoặc các trình tự ADN kích thích miễn dịch, được mô tả theo sáng chế và chất mang được dụng.

Sáng chế cũng đề cập đến các chế phẩm điều hòa miễn dịch chứa tá được dẫn phân phát liposom có tính cation và bất kỳ trong số các plasmit kích thích miễn dịch, hoặc các trình tự ADN kích thích miễn dịch, được mô tả theo sáng chế.

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề cập đến các phương pháp sử dụng các plasmit kích thích miễn dịch, hoặc các trình tự ADN kích thích miễn dịch, được mô tả theo sáng chế. Các phương pháp sử dụng thích hợp bao gồm việc dùng để điều trị bệnh cho đối tượng. Việc dùng để điều trị này bao gồm điều trị chẩn đoán, điều trị chống nhiễm trùng, và điều trị sau nhiễm trùng cho một hoặc nhiều đối tượng.

Sáng chế đề cập đến các phương pháp kích thích hoặc gây ra đáp ứng miễn dịch ở đối tượng. Theo một số khía cạnh, các phương pháp này bao gồm việc kích thích đáp ứng miễn dịch ở đối tượng bằng cách cho đối tượng dùng chế phẩm điều hòa miễn dịch được mô tả theo sáng chế. Theo một số khía cạnh, các phương pháp này bao gồm việc kích thích đáp ứng miễn dịch ở đối tượng bằng cách cho đối tượng dùng plasmit kích thích miễn dịch, hoặc trình tự ADN kích thích miễn dịch được mô tả theo sáng chế.

Các đối tượng và các dấu hiệu khác sẽ phần nào được thể hiện rõ ràng và phần nào được chỉ ra dưới đây.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các hình vẽ dưới đây là một phần của bản mô tả sáng chế và được đưa vào nhằm minh họa thêm về các khía cạnh nhất định của sáng chế. Sáng chế có thể được hiểu rõ hơn bằng cách viện dẫn đến một hoặc nhiều hình vẽ này kết hợp với phần mô tả chi tiết các phương án cụ thể được thể hiện ở đây.

Fig. 1 thể hiện bản đồ của plasmit pMB75.6;

Fig. 2 thể hiện bản đồ của plasmit pGCMB75.6;

Fig. 3 thể hiện bản đồ của plasmid pLacZ75.6; và,

Fig. 4 minh họa bằng đồ thị rằng các chế phẩm điều hòa miễn dịch được mô tả theo sáng chế làm gia tăng khả năng sống sót của các đối tượng sử dụng được thử nghiệm bằng virus gây bệnh (FIG. 4A, và FIG. 4B).

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo sáng chế, chế phẩm mà có khả năng gây ra đáp ứng miễn dịch ở đối tượng sử dụng, cũng như các phương pháp sử dụng, đã được phát hiện. Cụ thể là, sáng chế đề cập đến các chế phẩm axit nucleic mới, hoặc các chế phẩm điều hòa miễn dịch, và các ứng dụng của chúng. Đã phát hiện ra rằng các chế phẩm điều hòa miễn dịch này có thể chứa các trình tự ADN được mô tả theo sáng chế với hàm lượng GC, các cấu hình CpG được tăng cường, và được nhân truyền mà không chứa trình tự mã hóa hoặc các gen kháng chất kháng sinh. Các trình tự axit nucleic theo sáng chế có thể được sử dụng để kích thích hoặc tăng cường đáp ứng miễn dịch ở đối tượng để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh truyền nhiễm với độ an toàn được gia tăng đáng kể so với các phương pháp ngăn ngừa và điều trị bệnh khác đã biết trong lĩnh vực này. Sáng chế là đặc biệt hữu dụng trong việc điều trị và ngăn ngừa các bệnh nhiễm gây ra bởi các vi sinh vật, như, nhưng không chỉ giới hạn ở, virus, vi khuẩn, nấm mốc, nấm, nấm men, các ký sinh trùng và các loài vi sinh vật khác đã biết trong lĩnh vực này. Các chế phẩm và các phương pháp sử dụng các chế phẩm điều hòa miễn dịch được bản luận chi tiết hơn như dưới đây.

Các chế phẩm

Các chế phẩm hữu dụng theo sáng chế, như các chế phẩm được mô tả theo sáng chế, thường có thể được sử dụng làm liệu pháp chẩn đoán, liệu pháp điều trị chống nhiễm trùng, hoặc liệu pháp điều trị đối với các bệnh truyền nhiễm. Các chế phẩm được đề cập ở đây là các chế phẩm điều hòa miễn dịch. Các chế phẩm điều hòa miễn dịch này chứa ít nhất một plasmid kích thích miễn dịch hoặc trình tự ADN kích thích miễn dịch, có khả năng gây ra đáp ứng miễn dịch ở đối tượng sử dụng. Theo một số khía cạnh, các chế phẩm điều hòa miễn dịch có thể còn chứa tá dược dẫn phân phát liposom.

Các axit nucleic

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề cập đến các phân tử axit nucleic hữu dụng để điều trị hoặc ngăn ngừa các tác nhân gây ra bệnh truyền nhiễm. Các phân tử axit nucleic được mô tả theo sáng chế có thể được chứa trong một plasmit kích thích miễn dịch, như ADN chuỗi đơn hoặc chuỗi kép tuyến tính, trình tự axit amin, axit ribonucleic (ARN), hoặc các kết hợp của chúng. Theo một số khía cạnh, sáng chế đề cập đến các phân tử axit nucleic, các vectơ, và các tế bào chủ (*in vitro*, *in vivo*, hoặc *ex vivo*) chứa plasmit kích thích miễn dịch hoặc trình tự ADN kích thích miễn dịch.

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề cập đến các plasmit kích thích miễn dịch, hoặc các trình tự ADN kích thích miễn dịch, mà không chứa gen kháng chất kháng sinh. Các plasmit này có thể không chứa các gen đánh dấu có thể chọn lọc hoặc có thể sàng lọc bất kỳ. Ví dụ, plasmit pGCMB75.6 được mô tả theo sáng chế không chứa các gen đánh dấu có thể chọn lọc hoặc có thể sàng lọc chức năng hoặc có chiều dài đầy đủ bất kỳ. Trình tự của pGCMB75.6 được cung cấp trên SEQ ID NO: 1.

Theo một số khía cạnh, tốt hơn là các plasmit kích thích miễn dịch được mô tả theo sáng chế không chứa trình tự axit nucleic mã hóa gen đánh dấu có thể chọn lọc hoặc có thể sàng lọc chức năng hoặc có chiều dài đầy đủ. Theo một số khía cạnh, các plasmit kích thích miễn dịch này không chứa gen kháng chất kháng sinh. Ví dụ, các plasmit này không chứa gen kháng kanamycin. Theo một số khía cạnh, tốt hơn là các plasmit được mô tả theo sáng chế không mã hóa chất sinh miễn dịch.

Theo một số khía cạnh, các plasmit kích thích miễn dịch này có thể chứa trình tự axit nucleic mã hóa gen đánh dấu có thể chọn lọc hoặc có thể sàng lọc mà không phải là gen kháng chất kháng sinh. Ví dụ, plasmit pLacZMB75.6 được mô tả theo sáng chế chứa gen LacZ là gen đánh dấu có thể sàng lọc. Bản đồ của pLacZMB75.6 được cung cấp trên FIG. 3 và trình tự nucleotit của pLacZMB75.6 được cung cấp dưới dạng SEQ ID NO: 4. Như được thể hiện trên Fig. 3, pLacZMB75.6 là tương tự như pGCMB75.6, nhưng chứa gen đánh dấu có thể sàng lọc LacZ.

Có thể hiểu rằng các trình tự nucleotit của plasmit pGCMB75.6 hoặc plasmit pLacZMB75.6 có thể được thay đổi đến mức độ nhất định mà không có tác động bất lợi đáng kể đến các đặc tính kích thích miễn dịch của chúng. Theo một số khía cạnh,

sáng chế đề cập đến plasmit kích thích miễn dịch chứa trình tự axit nucleic có mức độ tương đồng về trình tự ít nhất là 89% so với trình tự của pGCMB75.6 (SEQ ID NO: 1). Tốt hơn là, plasmit kích thích miễn dịch chứa trình tự axit nucleic có mức độ tương đồng về trình tự ít nhất là 90%, ít nhất là 91%, ít nhất là 92%, ít nhất là 93%, ít nhất là 94%, ít nhất là 95%, ít nhất là 96%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98%, hoặc ít nhất là 99% so với trình tự của pGCMB75.6 (SEQ ID NO: 1). Theo một số khía cạnh, tốt hơn nữa là plasmit kích thích miễn dịch chứa trình tự của pGCMB75.6 (SEQ ID NO: 1).

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề cập đến plasmit kích thích miễn dịch chứa trình tự axit nucleic có mức độ tương đồng về trình tự ít nhất là 84% so với trình tự của pLacZMB75.6 (SEQ ID NO: 4). Tốt hơn là, plasmit kích thích miễn dịch chứa trình tự axit nucleic có mức độ tương đồng về trình tự ít nhất là 85%, ít nhất là 86%, ít nhất là 87%, ít nhất là 88%, ít nhất là 89%, ít nhất là 90%, ít nhất là 91%, ít nhất là 92%, ít nhất là 93%, ít nhất là 94%, ít nhất là 95%, ít nhất là 96%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98%, hoặc ít nhất là 99% so với trình tự của pLacZMB75.6 (SEQ ID NO: 4). Theo một số khía cạnh, tốt hơn nữa là plasmit kích thích miễn dịch chứa trình tự của pLacZMB75.6 (SEQ ID NO: 4).

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề cập đến plasmit kích thích miễn dịch chứa trình tự axit nucleic có mức độ tương đồng về trình tự ít nhất là 89% so với trình tự của pGCMB75.6 (SEQ ID NO: 1). Tốt hơn là, plasmit kích thích miễn dịch chứa trình tự axit nucleic có mức độ tương đồng về trình tự ít nhất là 90%, ít nhất là 91%, ít nhất là 92%, ít nhất là 93%, ít nhất là 94%, ít nhất là 95%, ít nhất là 96%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98%, hoặc ít nhất là 99% so với trình tự của pGCMB75.6 (SEQ ID NO: 1). Theo một số khía cạnh, tốt hơn nữa là plasmit kích thích miễn dịch chứa trình tự của pGCMB75.6 (SEQ ID NO: 1).

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề cập đến plasmit kích thích miễn dịch chứa trình tự axit nucleic có mức độ tương đồng về trình tự ít nhất là 84% so với trình tự của pLacZMB75.6 (SEQ ID NO: 4). Tốt hơn là, plasmit kích thích miễn dịch chứa trình tự axit nucleic có mức độ tương đồng về trình tự ít nhất là 85%, ít nhất là 86%, ít nhất là 87%, ít nhất là 88%, ít nhất là 89%, ít nhất là 90%, ít nhất là 91%, ít nhất là 92%, ít nhất là 93%, ít nhất là 94%, ít nhất là 95%, ít nhất là 96%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98%, hoặc ít nhất là 99% so với trình tự của pLacZMB75.6 (SEQ ID NO: 4).

Theo một số khía cạnh, tốt hơn nữa là plasmit kích thích miễn dịch chứa trình tự của pLacZMB75.6 (SEQ ID NO: 4).

Khía cạnh quan trọng khác của sáng chế đề xuất các trình tự ADN kích thích miễn dịch hoặc các plasmit kích thích miễn dịch có khả năng kích thích đáp ứng miễn dịch chứa các trình tự axit nucleic mà lai trong các điều kiện nghiêm ngặt với SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 4. Các trình tự axit nucleic thích hợp bao gồm các trình tự mà tương đồng, về cơ bản là tương tự, hoặc giống với các axit nucleic theo sáng chế. Theo một số khía cạnh, các trình tự axit nucleic giống nhau sẽ có mức độ tương đồng về mặt trình tự ít nhất là khoảng 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% so với SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung tương ứng. Theo các khía cạnh khác, các trình tự axit nucleic giống nhau sẽ có mức độ tương đồng về mặt trình tự ít nhất là khoảng 84%, 85%, 86%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% so với SEQ ID NO: 4 hoặc trình tự bổ sung tương ứng. Mức độ tương đồng về mặt trình tự có thể được tính bằng cách sử dụng một số thuật toán đã biết trong lĩnh vực này, như BLAST, được mô tả trong bài báo của Altschul, S. F., et al., J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990. Các axit nucleic có thể khác nhau về trình tự so với các axit nucleic nêu trên do sự thoái hóa của mã di truyền. Nói chung, trình tự tham chiếu sẽ là 18 nucleotit, thông thường hơn là 30 nucleotit hoặc hơn thế, và có thể chứa toàn bộ trình tự axit nucleic của chế phẩm nhằm mục đích so sánh.

Các trình tự nucleotit mà có thể lai với SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 4 được dự tính ở đây. Các điều kiện lai nghiêm ngặt bao gồm các điều kiện như lai ở 50°C hoặc cao hơn và SSC 0,1X (dung dịch natri clorua 15mM/dung dịch natri xitrat 1,5mM). Ví dụ khác là ủ qua đêm ở 42°C trong dung dịch formamit 50%, SSC 5X (dung dịch NaCl 150mM, dung dịch trinatri xitrat 15mM), dung dịch natri phosphat 50mM (pH 7,6), dung dịch Denhardt 5X, dung dịch dextran sulfat 10%, và dung dịch ADN tinh trùng cá hồi đã được cắt, làm biến tính 20µg/ml, sau đó rửa trong dung dịch SSC 0,1X ở khoảng 65°C. Các điều kiện lai nghiêm ngặt được lấy làm ví dụ minh họa là các điều kiện lai mà có độ nghiêm ngặt ít nhất là khoảng 80%, 85%, 90%, hoặc 95% so với các điều kiện cụ thể nêu trên. Các điều kiện lai nghiêm ngặt khác là đã biết trong lĩnh vực này và cũng có thể được áp dụng để đồng nhất hóa các phản tương đồng

của các axit nucleic theo sáng chế (Current Protocols in Molecular Biology, Unit 6, pub. John Wiley & Sons, N.Y. 1989).

Các nucleotit đột biến của các phân tử ADN được mô tả theo sáng chế có thể được sử dụng với điều kiện là các thể đột biến chứa các trình tự axit nucleic vẫn có khả năng kích thích đáp ứng miễn dịch như được mô tả theo sáng chế. Trình tự ADN của thể đột biến như vậy thường sẽ khác ở một hoặc nhiều nucleotit hoặc axit amin. Các cải biến về trình tự có thể là sự thay thế, sự xen đoạn, sự xóa bỏ, hoặc kết hợp của chúng. Các kỹ thuật về đột biến gen được tách dòng là đã được biết đến trong lĩnh vực này. Các phương pháp đột biến điểm đặc hiệu có thể được thấy trong các bài báo của Gustin et al., *Biotechniques* 14:22, 1993; Barany, *Gene* 37:111-23, 1985; Colicelli et al., *Mol. Gen. Genet.* 199:537-9, 1985; và Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, CSH Press 1989, pp. 15,3-15,108 và tất cả các bài báo này được đính kèm theo đây bằng cách viện dẫn. Tóm lại, sáng chế đề cập đến các trình tự axit nucleic có khả năng kích thích đáp ứng miễn dịch ở đối tượng và các biến thể hoặc các thể đột biến của chúng. Ngoài ra, sáng chế còn bao gồm các ARN trung gian được mã hóa bởi các trình tự axit nucleic đã được mô tả, cũng như các trình tự axit amin thu được bất kỳ được mã hóa.

Nếu trình tự nucleotit của plasmit kích thích miễn dịch biến đổi từ các trình tự được cung cấp trên các SEQ ID NO. 1 và 4 thì tốt hơn là các dinucleotit CpG trong plasmit được để nguyên vẹn. Cách khác, nếu trình tự nucleotit của plasmit được biến đổi khiến cho dinucleotit CpG bị loại bỏ thì trình tự của plasmit có thể được biến đổi ở vị trí khác sao cho tổng số dinucleotit CpG trong plasmit vẫn là như cũ. Các dinucleotit CpG khác ngoài các dinucleotit đã có sẵn trong các trình tự nucleotit của pGCMB75.6 hoặc pLacZMB75.6 cũng có thể được đưa vào plasmit. Do đó, ví dụ, tốt hơn là các plasmit kích thích miễn dịch được mô tả theo sáng chế chứa ít nhất là khoảng 200, ít nhất là khoảng 220, ít nhất là khoảng 240, ít nhất là khoảng 260, ít nhất là khoảng 270, ít nhất là khoảng 275, ít nhất là khoảng 280, ít nhất là khoảng 283, ít nhất là khoảng 285, hoặc ít nhất là khoảng 288 dinucleotit CpG. Ví dụ, plasmit kích thích miễn dịch có thể chứa 283 dinucleotit CpG.

Đặc biệt là, sáng chế đề cập đến các các dược phẩm chứa bất kỳ trong số các plasmit kích thích miễn dịch, hoặc các trình tự ADN kích thích miễn dịch, được mô tả theo sáng chế và chất mang dược dụng.

B. Chất điều hòa miễn dịch

Các chế phẩm điều hòa miễn dịch thích hợp để sử dụng với các plasmit kích thích miễn dịch được mô tả theo sáng chế được mô tả trong US 2012/0064151 A1 (các loài lông vũ) và US 2013/0295167 A1 (các loài bò), nội dung của các công bố đơn này được đính kèm theo đây hoàn toàn bằng cách viện dẫn.

Chế phẩm điều hòa miễn dịch chứa tá dược dẫn phân phát liposom có tính cation và ít nhất một trong số các plasmit kích thích miễn dịch, hoặc các trình tự ADN kích thích miễn dịch, được mô tả theo sáng chế.

Tá dược dẫn phân phát liposom thích hợp bao gồm chế phẩm lipit mà có khả năng phân phát các phân tử axit nucleic đến các mô của đối tượng được điều trị. Tốt hơn là, tá dược dẫn phân phát liposom có khả năng vẫn ổn định trong đối tượng với thời gian đủ để phân phát phân tử axit nucleic và/hoặc chất sinh học. Ví dụ, tá dược dẫn phân phát liposom là ổn định trong đối tượng sử dụng trong thời gian ít nhất là khoảng năm phút, trong ít nhất là khoảng 1 giờ, hoặc trong ít nhất là khoảng 24 giờ.

Tá dược dẫn phân phát liposom theo sáng chế bao gồm chế phẩm lipit mà có khả năng dung hợp với màng huyết tương của tế bào để phân phát phân tử axit nucleic vào trong tế bào. Nếu phân tử axit nucleic mã hóa một hoặc nhiều protein thì tốt hơn là phức hợp axit nucleic:liposom có hiệu suất chuyển nạp ít nhất là khoảng 1 picogram (pg) protein được biểu hiện trên miligram (mg) protein toàn bộ mô trên microgram (μ g) axit nucleic được phân phát. Ví dụ, hiệu suất chuyển nạp của phức hợp axit nucleic: liposom có thể ít nhất là khoảng 10pg protein được biểu thị trên mg protein toàn bộ mô trên μ g axit nucleic được phân phát; hoặc ít nhất là khoảng 50pg protein được biểu hiện trên mg protein toàn bộ mô trên μ g axit nucleic được phân phát. Hiệu suất chuyển nạp của phức hợp có thể thấp đến mức 1 femtogram (fg) protein được biểu hiện trên mg protein toàn bộ mô trên μ g axit nucleic được phân phát, trong đó các lượng nêu trên được ưu tiên hơn.

Tá được dẫn phân phát liposom được ưu tiên theo sáng chế có đường kính nằm trong khoảng từ 100 đến 500 nanomet (nm). Ví dụ, tá được dẫn phân phát liposom có thể có đường kính nằm trong khoảng từ 150 đến 450nm hoặc nằm trong khoảng từ 200 đến 400nm.

Các liposom thích hợp bao gồm liposom bất kỳ, như các liposom thường được dùng trong, ví dụ, các phương pháp phân phát gen đã được chuyên gia có trình độ trung bình trong lĩnh vực này biết đến. Các tá được dẫn phân phát liposom được ưu tiên bao gồm các lipit dạng túi nhiều lớp (multilamellar vesicle: MLV) và các lipit được ép đùn. Các phương pháp sản xuất MLV là đã được biết rõ trong lĩnh vực này. Các tá được dẫn phân phát liposom được ưu tiên hơn bao gồm các liposom có thành phần lipit đa cation (tức là, các liposom có tính cation) và/hoặc các liposom có khung cholesterol liên hợp với polyetylen glycol. Các chế phẩm liposom cation được lấy làm ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimetylmoni clorua (DOTMA) và cholesterol, N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimetylmoni clorua (DOTAP) và cholesterol, 1-[2-(oleoyloxy)etyl]-2-oleyl-3-(2-hydroxyetyl)-imidazolini clorua (DOTIM) và cholesterol, dimetyldioctadexylamoni bromua (DDAB) và cholesterol, và các kết hợp của chúng. Chế phẩm liposom được ưu tiên nhất để sử dụng làm tá được dẫn phân phát bao gồm DOTIM và cholesterol.

Phân tử axit nucleic thích hợp bao gồm bất kỳ trong số các plasmit kích thích miễn dịch được mô tả theo sáng chế. Trình tự axit nucleic mã hóa mã hóa ít nhất là một phần của protein hoặc peptit, trong khi đó trình tự không mã hóa không mã hóa phần bất kỳ của protein hoặc peptit. Theo sáng chế, các axit nucleic "không mã hóa" có thể bao gồm các vùng điều hòa của đơn vị phiên mã, như vùng khởi đầu. Thuật ngữ, "vector trống" có thể được sử dụng thay thế cho thuật ngữ "không mã hóa", và cụ thể là để chỉ trình tự axit nucleic không chứa phần mã hóa protein, như vector plasmit không có đoạn đích gen. Sự biểu hiện của protein được mã hóa bằng các plasmit được mô tả theo sáng chế không là bắt buộc để gây ra đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu với kháng nguyên; do đó, các plasmit không cần chứa các trình tự mã hóa bất kỳ mà có liên kết về mặt hoạt động với trình tự kiểm soát phiên mã. Tuy nhiên, có thể đạt được các ưu điểm nữa (tức là, độ miễn dịch được tăng cường và đặc hiệu với kháng nguyên) bằng cách cho chế phẩm chứa trình tự axit nucleic (ADN hoặc ARN) mã hóa chất sinh

miễn dịch và/ hoặc xytokin. Trình tự axit nucleic mã hóa chất sinh miễn dịch và/hoặc xytokin này có thể được chứa trong các plasmit kích thích miễn dịch được mô tả theo sáng chế, hoặc có thể được chứa trong axit nucleic riêng biệt (ví dụ, plasmit riêng biệt) trong chế phẩm.

Có thể đạt được sự tạo phức hợp liposom với các plasmit kích thích miễn dịch được mô tả theo sáng chế bằng cách sử dụng các phương pháp chuẩn trong lĩnh vực này hoặc như được mô tả trong US 6,693,086, toàn bộ nội dung của patent này được đính kèm theo đây bằng cách viện dẫn. Nồng độ thích hợp của plasmit để bổ sung vào liposom bao gồm nồng độ hữu hiệu để phân phát lượng plasmit đủ cho đối tượng sao cho gây ra được đáp ứng miễn dịch toàn thân. Ví dụ, plasmit với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 μ g đến 10 μ g có thể được kết hợp với liposom với lượng khoảng 8nmol, plasmit với lượng nằm trong khoảng từ 0,5 μ g đến 5 μ g có thể được kết hợp với liposom với lượng khoảng 8nmol, hoặc plasmit với lượng khoảng 1,0 μ g có thể được kết hợp với liposom với lượng khoảng 8nmol. Tỷ lệ plasmit/lipit (μ g plasmit:nmol lipit) trong chế phẩm có thể ít nhất là khoảng 1:1 plasmit:lipit theo trọng lượng (ví dụ, 1 μ g plasmit:1nmol lipit). Ví dụ, tỷ lệ plasmit/lipit có thể ít nhất là khoảng 1:5, ít nhất là khoảng 1:10, hoặc ít nhất là khoảng 1:20. Các tỷ lệ được biểu thị ở đây được tính theo lượng lipid cation trong chế phẩm, và không tính theo tổng lượng lipid trong chế phẩm. Tỷ lệ plasmit/lipit trong chế phẩm theo sáng chế thích hợp là nằm trong khoảng từ 1:1 đến khoảng 1:80 plasmit:lipit theo trọng lượng; nằm trong khoảng từ 1:2 đến khoảng 1:40 plasmit:lipit theo trọng lượng; nằm trong khoảng từ 1:3 đến khoảng 1:30 plasmit:lipit theo trọng lượng; hoặc nằm trong khoảng từ 1:6 đến khoảng 1:15 plasmit:lipit theo trọng lượng.

C. Tác nhân sinh học

Chế phẩm bất kỳ trong số các chế phẩm điều hòa miễn dịch được mô tả theo sáng chế có thể còn chứa ít nhất là một tác nhân sinh học, ngoài tá dược dẫn phân phát liposom và ít nhất là một trong số các plasmit được mô tả theo sáng chế.

Các tác nhân sinh học thích hợp là các tác nhân mà hữu hiệu trong việc ngăn ngừa hoặc điều trị các bệnh ở loài lông vũ hoặc bò. Các tác nhân sinh học này bao gồm các protein tăng cường miễn dịch, các chất sinh miễn dịch, các vacxin, các chất kháng vi sinh vật hoặc kết hợp bất kỳ của chúng. Các protein tăng cường miễn dịch thích hợp

là các protein mà đã được biết để tăng cường khả năng miễn dịch. Bằng cách ví dụ không giới hạn, xytokin, mà bao gồm họ các protein, là họ protein tăng cường khả năng miễn dịch đã biết. Các chất sinh miễn dịch thích hợp là các protein mà gây ra đáp ứng miễn dịch thể dịch và/hoặc đáp ứng miễn dịch tế bào sao cho việc dùng chất sinh miễn dịch cho đối tượng tạo đáp ứng miễn dịch đặc hiệu với chất sinh miễn dịch kháng lại các protein giống hoặc tương tự mà được bắt gặp trong mô của đối tượng. Chất sinh miễn dịch có thể bao gồm kháng nguyên gây bệnh được biểu hiện bởi vi khuẩn, virus, ký sinh trùng hoặc nấm. Các kháng nguyên được ưu tiên bao gồm các kháng nguyên có nguồn gốc từ các vi sinh vật mà gây bệnh truyền nhiễm ở đối tượng. Theo sáng chế, chất sinh miễn dịch có thể là phần bất kỳ của protein, vốn có hoặc có nguồn gốc tổng hợp, mà gây ra đáp ứng miễn dịch thể dịch và/hoặc đáp ứng miễn dịch tế bào. Như vậy, kích cỡ kháng nguyên hoặc chất sinh miễn dịch có thể nhỏ như khoảng 5–12 axit amin và lớn như protein có chiều dài đầy đủ, bao gồm các kích cỡ bất kỳ trong khoảng này. Kháng nguyên có thể là multime protein hoặc protein dung hợp. Kháng nguyên có thể là kháng nguyên được tinh chế. Cách khác, protein tăng cường miễn dịch hoặc chất sinh miễn dịch có thể được mã hóa bằng plasmit kích thích miễn dịch hoặc bằng axit nucleic khác có trong chế phẩm điều hòa miễn dịch. Nếu protein tăng cường miễn dịch hoặc chất sinh miễn dịch được mã hóa bằng phân tử axit nucleic trong chế phẩm điều hòa miễn dịch thì trình tự axit nucleic mã hóa protein tăng cường miễn dịch hoặc chất sinh miễn dịch có liên kết về mặt hoạt động với trình tự kiểm soát phiên mã, do vậy chất sinh miễn dịch được biểu hiện ở mô của đối tượng, nhờ đó gây ra đáp ứng miễn dịch đặc hiệu với chất sinh miễn dịch ở đối tượng, ngoài đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu. Các kỹ thuật sàng lọc yếu tố gây miễn dịch, như yếu tố gây miễn dịch kháng nguyên gây bệnh hoặc hoạt tính xytokin đã được chuyên gia trong lĩnh vực này biết đến và bao gồm nhiều loại thử nghiệm *in vitro* và *in vivo*.

Nếu tác nhân sinh học là vaccin thì vaccin có thể bao gồm vaccin virus, vi khuẩn hoặc ký sinh trùng sống, gây nhiễm, vaccin virus, vi khuẩn, hoặc ký sinh trùng chết, được vô hoạt. Một hoặc nhiều vaccin, các vaccin virus sống hoặc chết, có thể được sử dụng kết hợp với chế phẩm điều hòa miễn dịch theo sáng chế. Các vaccin thích hợp bao gồm các vaccin đã được biết đến trong lĩnh vực này dùng cho các loài lông vũ hoặc bò.

Các vaccin được lấy làm ví dụ cho các loài lông vũ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các vaccin được dùng trong lĩnh vực để bảo vệ kháng lại virus gây bệnh Marek (MDV-Marek's disease virus), virus gây bệnh New Castle (NDV-New Castle disease virus), virus gây bệnh thiếu máu ở gà (CAV-chick anemia virus), virus gây bệnh Gumboro ở gà (IBDV-infectious bursal disease virus), virus gây bệnh viêm phế quản truyền nhiễm (IBV-infectious bronchitis virus), virus herpes ở gà tây (HVT-turkey herpesvirus), virus gây bệnh viêm thanh khí quản truyền nhiễm (ILTV-infectious laryngotracheitis virus), virus gây bệnh viêm não tủy ở loài lông vũ (AEV-avian encephalomyelitis virus), virus gây bệnh đậu gà (FPV-fowlpox virus), virus gây bệnh cúm và tụ huyết trùng ở loài lông vũ (AIV-fowl cholera, avian influenza virus), nhóm các virus nhỏ, virus gây cúm gia cầm (ALV-avian leucosis virus), virus gây bệnh lưới nội mô (REV-reticuloendotheliosis virus), adenovirus trên loài lông vũ và virus gây bệnh viêm ruột xuất huyết (HEV-hemorrhagic enteritis virus), cầu trùng, và các bệnh khác đã biết trong lĩnh vực này. Theo ví dụ khác, vaccin có thể là vaccin như được mô tả trong US 5,427,791, US 6,048,535 và US 6,406,702. Ví dụ, vaccin để bảo vệ chống lại bệnh Marek có thể được sử dụng kết hợp với chế phẩm điều hòa miễn dịch theo sáng chế.

Vaccin được lấy làm ví dụ đối với các loài bò bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các vaccin được sử dụng trong lĩnh vực này để bảo vệ chống lại bệnh viêm mũi do virus truyền nhiễm ở bò (IBR-infectious bovine rhinotracheitis) (virus herpes bò typ 1 (BHV1-Type 1 bovine herpes virus)), virus á cúm typ 3 (PI3-parainfluenza virus type 3), virus hợp bào hô hấp ở bò (BRV-bovine respiratory syncytial virus), virus gây bệnh tiêu chảy ở bò (BVDV-bovine viral diarrhea virus, Typ 1 và 2), *Histophilus somni*, *Mycoplasma bovis*, và các bệnh khác đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, vaccin để bảo vệ chống lại *Mannheimia haemolytica* có thể được sử dụng kết hợp với chế phẩm điều hòa miễn dịch theo sáng chế.

Tác nhân sinh học có thể là chất kháng vi sinh vật. Các chất kháng vi sinh vật thích hợp bao gồm: các quinolon, tốt hơn là các floquinolon, β -lactam, và các chất kháng sinh macrolit-lincosamit-streptogramin (MLS).

Các quinolon thích hợp bao gồm benofloxacin, binfloxacin, cinoxacin, ciprofloxacin, clinafloxacin, danofloxacin, difloxacin, enoxacin, enrofloxacin,

fleroxacin, gemifloxacin, ibafloxacin, levofloxacin, lomefloxacin, marbofloxacin, moxifloxacin, norfloxacin, ofloxacin, orbifloxacin, pazufloxacin, pradofloxacin, perfloxacin, sarafloxacin, sparfloxacin, temafloxacin, và tosufloxacin. Các floquinolon được ưu tiên bao gồm ciprofloxacin, danofloxacin, enrofloxacin, moxifloxacin, và pradofloxacin. Các naphthyridon thích hợp bao gồm axit nalidixic.

Các β -lactam thích hợp bao gồm các penixilin (ví dụ, amoxixilin, ampicilin, azloxilin, benzathin penixilin, benzylpenixilin, carbenixilin, cloxaxilin, co-amoxiclav [tức là amoxixilin/axit clavulanic], dicloxaxilin, flucloxaxilin, methixilin, mezloxilin, nafxilin, oxaxilin, phenoxymetylpenixilin, piperaxilin, procain penixilin, temoxilin, và ticarxilin); các cephalosporin (ví dụ, cefaclor, cefalonium, cefamandol, cefapririn, cefazolin, cefepim, cefixim, cefotaxim, cefoxitin, cefpirom, cefpodoxim, cefquinom, ceftazidim, ceftiofur, ceftriaxon, cefuroxim, cephalixin, cephalothin, và defotetan); các carbapenem và các penem (ví dụ, doripenem, ertapenem, faropenem, imipenem, và meropenem); các monobactam ví dụ aztreonam, nocardicin A, tabtoxinin- β -lactam, và tigemonam); và các chất ức chế β -lactamaza ví dụ axit clavulanic, sulbactam, và tazobactam). Các β -lactam được ưu tiên bao gồm các cephalosporin, đặc biệt là, cefazolin.

Các chất kháng sinh MLS thích hợp bao gồm clindamycin, lincomycin, pirlimycin, và các chất kháng sinh macrolit bất kỳ. Chất kháng sinh lincosamit được ưu tiên là pirlimycin.

Các chất kháng vi sinh vật khác bao gồm các aminoglycosit, clopidol, dimetridazol, erythromycin, framycetin, furazolidon, halofuginon, 2-pyridon, robenidin, sulfonamit, tetracyclin, trimethoprim, các pleuromutilin khác nhau ví dụ tiamulin và valnemulin), và streptomycin khác nhau ví dụ monensin, narasin, và salinomycin).

Các phương pháp

Mục đích của sáng chế là đề xuất các chế phẩm điều hòa miễn dịch, các plasmit (hoặc trình tự ADN) kích thích miễn dịch, và các phương pháp mà gây ra khả năng miễn dịch bảo vệ cho đối tượng chưa bị nhiễm, khả năng miễn dịch bảo vệ cho đối tượng bị nhiễm, khả năng miễn dịch tăng cường cho đối tượng chưa bị nhiễm, khả

năng miễn dịch tăng cường cho đối tượng đã bị nhiễm, khả năng miễn dịch điều trị cho đối tượng bị nhiễm, hoặc các kết hợp của chúng. Do vậy, các chế phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng để gây miễn dịch phòng bệnh cho đối tượng hoặc được sử dụng để điều trị bệnh ở đối tượng. Các phương pháp được mô tả theo sáng chế bao gồm việc cho đối tượng dùng plasmit kích thích miễn dịch, hoặc trình tự ADN kích thích miễn dịch được mô tả theo sáng chế.

A. Các phương pháp kích thích miễn dịch

Sáng chế đề cập đến các phương pháp gây ra đáp ứng miễn dịch ở đối tượng sử dụng. Các phương pháp này bao gồm việc cho đối tượng dùng lượng hữu hiệu của chế phẩm điều hòa miễn dịch để gây ra đáp ứng miễn dịch. Theo một số khía cạnh, chế phẩm điều hòa miễn dịch gây ra đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu với kháng nguyên mà chỉ hữu hiệu. Theo một số khía cạnh, chế phẩm điều hòa miễn dịch làm tăng cường mức độ hoạt động của ít nhất là một tác nhân sinh học như vaccin, khi được dùng trước vaccin này, được dùng đồng thời với vaccin, được dùng sau khi chủng ngừa, hoặc được trộn với vaccin. Theo một số khía cạnh, các phương pháp này đề xuất chiến lược điều trị bệnh mới để bảo vệ đối tượng sử dụng tránh bị các bệnh truyền nhiễm và điều trị bệnh ở cộng đồng bị bệnh truyền nhiễm. Theo một số khía cạnh, các phương pháp này đề xuất phương pháp bảo vệ nhanh hơn, dài hơn và tốt hơn chống lại bệnh khi chất điều hòa miễn dịch được sử dụng kết hợp với vaccin, so với việc sử dụng vaccin mà không kèm với chế phẩm điều hòa miễn dịch.

Đáp ứng miễn dịch có thể được gây ra ở đối tượng sử dụng bằng cách dùng lượng hữu hiệu của chế phẩm điều hòa miễn dịch, chế phẩm này chứa bất kỳ trong số các tá dược dẫn phân phát liposom được mô tả theo sáng chế, bất kỳ trong số các plasmit kích thích miễn dịch (hoặc các trình tự ADN kích thích miễn dịch) được mô tả theo sáng chế, và bất kỳ trong số các tác nhân sinh học được mô tả theo sáng chế. Dự tính là tác nhân sinh học có thể được trộn với hoặc được dùng đồng thời với chất điều hòa miễn dịch hoặc độc lập với chất điều hòa miễn dịch. Việc dùng độc lập có thể trước hoặc sau khi dùng chất điều hòa miễn dịch. Cũng dự tính là việc dùng nhiều hơn một lần chất điều hòa miễn dịch hoặc tác nhân sinh học có thể được áp dụng để mở rộng khả năng miễn dịch được tăng cường. Hơn nữa, nhiều hơn một tác nhân sinh học có thể được dùng đồng thời với chất điều hòa miễn dịch, dùng trước khi dùng chất

điều hòa miễn dịch, dùng sau khi dùng chất điều hòa miễn dịch, hoặc dùng cùng lúc với chất điều hòa miễn dịch.

Lượng hữu hiệu của bất kỳ trong số các chế phẩm điều hòa miễn dịch được mô tả theo sáng chế có thể được dùng cho đối tượng. Lượng hữu hiệu là đủ để gây ra đáp ứng miễn dịch ở đối tượng sử dụng. Lượng hữu hiệu này là lượng bất kỳ mà gây ra đáp ứng miễn dịch ở đối tượng sử dụng. Các phương pháp xác định đáp ứng miễn dịch là đã được biết rõ trong lĩnh vực này. Ngoài ra, chuyên gia trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng lượng hữu hiệu sẽ tùy thuộc vào tuổi tác, thể trọng, giai đoạn nhiễm bệnh, cũng như các yếu tố khác đã biết trong lĩnh vực này. Các lượng hữu hiệu thích hợp có thể nằm trong khoảng từ 0,1 μ g đến 1000 μ g trên mỗi đối tượng. Theo một số khía cạnh, lượng hữu hiệu có thể nằm trong khoảng từ 0,1 μ g đến khoảng 10 μ g, từ khoảng 0,1 μ g đến khoảng 5 μ g, từ khoảng 0,5 μ g đến khoảng 5 μ g, từ khoảng 0,25 μ g đến khoảng 5 μ g, từ khoảng 0,05 μ g đến khoảng 10 μ g, từ khoảng 5 μ g đến khoảng 15 μ g, từ khoảng 10 μ g đến khoảng 15 μ g, từ khoảng 10 μ g đến khoảng 20 μ g, từ khoảng 20 μ g đến khoảng 30 μ g, từ khoảng 30 μ g đến khoảng 40 μ g, từ khoảng 40 μ g đến khoảng 50 μ g, từ khoảng 50 μ g đến khoảng 70 μ g, từ khoảng 70 μ g đến khoảng 90 μ g, từ khoảng 50 μ g đến khoảng 100 μ g, từ khoảng 100 μ g đến khoảng 150 μ g, từ khoảng 150 μ g đến khoảng 200 μ g, từ khoảng 200 μ g đến khoảng 250 μ g, từ khoảng 250 μ g đến khoảng 300 μ g, từ khoảng 300 μ g đến khoảng 350 μ g, từ khoảng 350 μ g đến khoảng 400 μ g, từ khoảng 400 μ g đến khoảng 450 μ g, từ khoảng 450 μ g, đến khoảng 500 μ g, từ khoảng 500 μ g đến khoảng 550 μ g, từ khoảng 550 μ g đến khoảng 600 μ g, từ khoảng 600 μ g đến khoảng 650 μ g, từ khoảng 650 μ g đến khoảng 700 μ g, từ khoảng 700 μ g đến khoảng 750 μ g, từ khoảng 750 μ g đến khoảng 800 μ g, từ khoảng 800 μ g đến khoảng 850 μ g, từ khoảng 850 μ g đến khoảng 900 μ g, từ khoảng 900 μ g đến khoảng 950 μ g, từ khoảng 950 μ g đến khoảng 1000 μ g. Tốt hơn là, theo một số khía cạnh, lượng hữu hiệu nằm trong khoảng từ 0,5 μ g đến khoảng 10 μ g. Hơn nữa, theo các khía cạnh khác, tốt hơn là lượng hữu hiệu nằm trong khoảng từ 50 μ g đến khoảng 100 μ g. Và, theo các khía cạnh khác, tốt hơn là lượng hữu hiệu nằm trong khoảng từ 40 μ g đến khoảng 70 μ g.

Theo một số khía cạnh, đáp ứng miễn dịch có thể được gây ra ở một loài trong một số loài lông vũ bằng cách dùng lượng hữu hiệu của chế phẩm bất kỳ trong số các chế phẩm điều hòa miễn dịch được mô tả theo sáng chế cho loài này trong số các loài

lông vũ. Lượng hữu hiệu là đủ để gây ra đáp ứng miễn dịch ở một loài trong số các loài lông vũ. Ví dụ, lượng hữu hiệu của điều hòa miễn dịch đối với các loài lông vũ có thể nằm trong khoảng từ 0,05 μ g đến khoảng 10 μ g, từ khoảng 0,1 μ g đến khoảng 5 μ g, từ khoảng 0,5 μ g đến khoảng 1,5 μ g, hoặc từ khoảng 1,0 μ g đến khoảng 10 μ g. Bằng cách ví dụ, các lượng hữu hiệu thích hợp cho đối tượng là các loài lông vũ có thể là khoảng 0,1 μ g, 0,2 μ g, 0,3 μ g, 0,4 μ g, 0,5 μ g, 0,6 μ g, 0,7 μ g, 0,8 μ g, 0,9 μ g, 1,0 μ g, 1,2 μ g, 1,4 μ g, 1,6 μ g, 1,8 μ g, 2,0 μ g, 2,5 μ g, 3,0 μ g, 3,5 μ g, 4,0 μ g, 4,5 μ g, 5,0 μ g, 5,5 μ g, 6,0 μ g, 6,5 μ g, 7,0 μ g, 7,5 μ g, 8,0 μ g, 8,5 μ g, 9,0 μ g, 9,5 μ g, 10,0 μ g, 9,5 μ g, 10,0 μ g, 10,5 μ g, 11,0 μ g, 12 μ g, 13 μ g, 14 μ g, hoặc 15 μ g.

Theo một số khía cạnh, đáp ứng miễn dịch có thể được gây ra ở một loài trong số các loài bò bằng cách cho loài này dùng lượng hữu hiệu của chế phẩm bất kỳ trong số các chế phẩm điều hòa miễn dịch được mô tả theo sáng chế. Lượng hữu hiệu là đủ để gây ra đáp ứng miễn dịch ở một loài trong số các loài bò. Ví dụ, lượng hữu hiệu của chất điều hòa miễn dịch đối với các loài bò có thể nằm trong khoảng từ khoảng 1 μ g đến khoảng 1000 μ g trên mỗi con, từ khoảng 5 μ g đến khoảng 500 μ g trên mỗi con, từ khoảng 10 μ g đến khoảng 100 μ g trên mỗi con, từ khoảng 10 μ g đến khoảng 50 μ g trên mỗi con, hoặc từ khoảng 40 μ g đến khoảng 60 μ g trên mỗi con. Ví dụ là, các lượng hữu hiệu thích hợp cho đối tượng mà thuộc loài bò có thể là khoảng 30 μ g, 35 μ g, 40 μ g, 45 μ g, 50 μ g, 55 μ g, 60 μ g, 65 μ g, 70 μ g, 75 μ g, 80 μ g, 85 μ g, 90 μ g, 95 μ g, 100 μ g, 110 μ g, 120 μ g, 130 μ g, 140 μ g, 150 μ g, 160 μ g, 170 μ g, 180 μ g, 190 μ g, 200 μ g hoặc đến tối đa 500 μ g, hoặc tối đa đến 1000 μ g.

B. Các điều kiện sử dụng

Các phương pháp theo sáng chế gây ra đáp ứng miễn dịch ở đối tượng từ đó đối tượng này được bảo vệ tránh bị bệnh mà mắc phải mới gây ra đáp ứng miễn dịch. Như được sử dụng ở đây, cụm từ “được bảo vệ tránh bị bệnh” chỉ việc làm giảm các triệu chứng của bệnh; làm giảm sự xảy ra bệnh; làm giảm độ nặng trên lâm sàng hoặc trên bệnh lý của bệnh; hoặc làm giảm sự nhiễm phải tác nhân gây bệnh. Việc bảo vệ đối tượng có thể chỉ khả năng của chế phẩm điều trị theo sáng chế, khi được dùng cho đối tượng, trong việc ngăn ngừa việc bị bệnh, chữa bệnh, và/hoặc làm thuyên giảm hoặc làm giảm các triệu chứng của bệnh, các dấu hiệu lâm sàng, bệnh lý, hoặc nguyên nhân gây bệnh. Ví dụ, không giới hạn, các dấu hiệu lâm sàng của bệnh ở đường hô hấp của

bò (BRD-Bovine Respiratory Disease) bao gồm các tổn thương ở phổi, nhiệt độ tăng, suy nhược (ví dụ chán ăn, giảm đáp ứng với các kích thích bên ngoài, tai rũ), chảy nước mũi, và đặc trưng hô hấp (ví dụ tần số hô hấp, nỗ lực hô hấp). Các chế phẩm điều hòa miễn dịch được mô tả theo sáng chế có thể được dùng cho gia súc mà được nghi ngờ là có phơi nhiễm với BRD để ngăn ngừa hoặc làm giảm độ nặng của các dấu hiệu lâm sàng nêu trên của BRD. Bằng cách ví dụ thêm nữa, không giới hạn, các dấu hiệu lâm sàng của bệnh Marek ở các đối tượng loài lông vũ bao gồm sự giảm khả năng nở trứng và giảm khả năng sống sót của chim. Các chế phẩm điều hòa miễn dịch được mô tả theo sáng chế có thể được dùng cho các đối tượng loài lông vũ mà được nghi ngờ là có phơi nhiễm với virus gây bệnh Marek để ngăn ngừa hoặc làm giảm độ nặng của các dấu hiệu lâm sàng nêu trên của bệnh Marek.

Do đó, việc bảo vệ đối tượng để tránh bị bệnh bao gồm cả việc ngăn ngừa xảy ra bệnh (phòng bệnh) và điều trị đối tượng mà đã có bệnh (chữa bệnh). Cụ thể, việc bảo vệ đối tượng để tránh bị bệnh được hoàn thiện bằng việc gây ra đáp ứng miễn dịch ở đối tượng bằng cách tạo ra đáp ứng miễn dịch có lợi hoặc đáp ứng miễn dịch bảo vệ mà có thể, trong một số trường hợp, góp phần ngăn chặn, giảm, ức chế, hoặc phong bế đáp ứng miễn dịch có hại hoặc đáp ứng miễn dịch quá hoạt. Thuật ngữ "bệnh" chỉ tình trạng sai lệch bất kỳ khỏi tình trạng sức khỏe thông thường ở đối tượng và bao gồm tình trạng trong đó có mặt các triệu chứng bệnh, cũng như các tình trạng bệnh trong đó sự sai lệch, ví dụ, sự nhiễm, sự đột biến gen, khuyết tật di truyền, v.v.) đã xảy ra, nhưng các triệu chứng này chưa được biểu hiện.

Các phương pháp theo sáng chế có thể được sử dụng để ngăn ngừa bệnh, kích thích khả năng miễn dịch tế bào tác động kháng lại bệnh, giảm trừ bệnh, làm thuyên giảm bệnh, và ngăn ngừa bệnh thứ phát do sự xuất hiện của bệnh nguyên phát.

Theo một số khía cạnh, các phương pháp được mô tả theo sáng chế có thể được sử dụng để cải thiện đáp ứng miễn dịch đạt được ở đối tượng khi dùng đồng thời với vaccin so với việc chỉ dùng mỗi vaccin. Nói chung, vaccin khi được dùng không lập tức bảo vệ đối tượng vì nó cần thời gian để kích thích miễn dịch đạt được. Thuật ngữ "cải thiện" trong sáng chế được dùng để chỉ sự gây ra đáp ứng miễn dịch bẩm sinh ở đối tượng cho đến khi vaccin bắt đầu bảo vệ đối tượng và/hoặc kéo dài thời gian bảo vệ, qua khả năng miễn dịch đạt được, có được bởi vaccin.

Theo một số khía cạnh, các phương pháp theo sáng chế bao gồm việc dùng chế phẩm để bảo vệ chống lại sự nhiễm đối với rất nhiều tác nhân gây bệnh. Chế phẩm được dùng có thể có hoặc có thể không chứa kháng nguyên đặc hiệu để gây ra đáp ứng miễn dịch đặc hiệu. Dự tính là các phương pháp theo sáng chế sẽ bảo vệ đối tượng sử dụng tránh bị bệnh do các tác nhân vi sinh vật truyền nhiễm gây ra bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các virus, vi khuẩn, nấm, và ký sinh trùng. Chuyên gia trong lĩnh vực này sẽ nhận thức được và hiểu rõ rằng chế phẩm điều hòa miễn dịch, như được mô tả theo sáng chế, là hữu hiệu đối với nhiều tác nhân truyền nhiễm, số lượng các tác nhân này là nhiều đến mức không thể liệt kê. Các tác nhân truyền nhiễm được đề xuất ở đây được đề xuất nhằm mục đích lấy làm ví dụ và được đề xuất mà không làm hạn chế phạm vi sử dụng.

Các bệnh nhiễm virus được lấy làm ví dụ ở các loài lông vũ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các bệnh do sự nhiễm virus gây bệnh thiếu máu truyền nhiễm ở gà (CIAV-chicken infectious anemia virus), virus gây bệnh Marek (MDV-Marek's disease virus), virus herpes ở gà (HCV-herpesvirus chicken), virus gây bệnh herpes ở gà tây (HTV-herpesvirus turkey), virus gây bệnh Gumboro ở gà (IBDV-infectious bursal disease virus), virus gây bệnh New Castle (NDV-New Castle disease virus), virus gây bệnh viêm phế quản truyền nhiễm (IBV-infectious bronchitis virus), virus gây bệnh viêm thanh khí quản truyền nhiễm (ILTV-infectious laryngotracheitis virus), virus gây bệnh viêm não tủy ở loài lông vũ (AEV-avian encephalomyelitis virus), virus gây bệnh đậu gà (FPV-fowlpox virus), virus gây bệnh cúm và tụ huyết trùng ở loài lông vũ (AIV-fowl cholera, avian influenza virus), nhóm các virus nhỏ, virus gây cúm gia cầm (ALV-avian leucosis virus), virus gây bệnh lưới nội mô (REV-reticuloendotheliosis virus), adenovirus trên loài lông vũ và virus gây bệnh viêm ruột xuất huyết (HEV-hemorrhagic enteritis virus), pneumovirus, virus gây bệnh đậu trên chim bồ câu (pigeon pox virus), các thể tái tổ hợp của chúng, và các loại virus khác đã biết trong lĩnh vực này gây ra.

Các bệnh nhiễm vi khuẩn được lấy làm ví dụ ở loài lông vũ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các bệnh do sự nhiễm vi khuẩn gram dương, vi khuẩn gram âm, hoặc nấm như *Bordetella spp.*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium colinum*, *Clostridium perfringens*, *Erysipelothrix insidiosa*, *Escherichia*

coli, *Hemophilus gallinarum*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma meleagridis*, *Mycoplasma synoviae*, *Pasteurella multocida*, *Riemerella anatipestifer*, *Salmonella* spp., *Salmonella enteritidis*, *Salmonella gallinarum*, *Salmonella pullorum*, và các vi khuẩn khác đã biết trong lĩnh vực này gây ra.

Các bệnh nhiễm nấm hoặc nấm mốc được lấy làm ví dụ ở loài lông vũ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các bệnh do sự nhiễm *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigates*, *Candida albicans*, và các loài nấm hoặc nấm mốc truyền nhiễm khác đã biết trong lĩnh vực này gây ra. Các tình trạng bệnh lý được lấy làm ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các tình trạng bệnh lý do các độc tố từ vi khuẩn gram dương, vi khuẩn gram âm, hoặc nấm như độc tố từ *Clostridium botulinum*, độc tố từ *Clostridium perfringens*, độc tố ruột từ *Escherichia coli*, các độc tố nấm từ *Fusarium*, độc tố bạch cầu từ *Pasteurella*, các độc tố *Staphylococcus*, và các độc tố khác đã biết trong lĩnh vực này gây ra.

Các ký sinh trùng được lấy làm ví dụ ở các loài lông vũ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, *Ascaridia galli*, *Capillaria annulata*, *Capillaria contorta*, *Capillaria obsignata*, *coccidia* spp., *Eimeria meleagridis*, *Heterakis gallinae*, *Syngamus trachea*, và các loài ký sinh trùng khác đã biết trong lĩnh vực này.

Các bệnh nhiễm virus được lấy làm ví dụ ở các loài bò bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các bệnh do sự nhiễm virus gây bệnh lưỡi xanh, adenovirus bò, calicivirus bò, coronavirus bò (BCV-bovine coronavirus), enterovirus bò, virus herpes bò typ 1 (BHV1-Type 1 bovine herpes virus), virus herpes bò typ 4 (BHV4-Type 4 bovine herpes virus), virus gây bệnh bạch cầu ở bò, parvovirus bò, reovirus bò, virus hợp bào hô hấp ở bò (BRSV-bovine respiratory syncytial virus), rhinovirus bò, virus gây bệnh tiêu chảy ở bò typ 1 (BVDV1-bovine viral diarrhea virus Type 1), virus gây bệnh tiêu chảy ở bò typ2 (BVDV2-bovine viral diarrhea virus Type 2), viêm mũi do virus truyền nhiễm ở bò (IBR-infectious bovine rhinotracheitis), virus gây sốt cấp tính (malignant catarrhal fever virus), virus á cúm typ 3 (PIV3-parainfluenza virus type 3), virus đại, virus gây bệnh viêm miệng mụn nước (VSV-vesicular stomatitis virus), các dạng tái tổ hợp của chúng, và các loại virus khác đã biết trong lĩnh vực này gây ra.

Các bệnh nhiễm vi khuẩn được lấy làm ví dụ ở các loài bò bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các bệnh do sự nhiễm vi khuẩn gram dương, vi khuẩn gram âm,

hoặc vi khuẩn mycobacteria như *Arcanobacterium pyogenes*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus anthrax*, *Brucella abortus*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium chauveoi*, *Clostridium colinum*, *Clostridium hemolyticum*, *Clostridium novyi*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium septicum*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium*, *Escherichia coli*, *Fusobacterium necrophorum*, *Fusobacterium spp.*, *Histophilus somni*, *Histophilus spp.*, *Leptospira spp.*, *Mannheimia haemolytica*, *Moraxella spp.*, *Muellerius spp.*, *Mycobacterium paratuberculosis*, *Mycobacterium spp.*, *Mycoplasma bovirhinis*, *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma dispar*, *Mycoplasma spp.*, *Pasteurella multocida*, *Salmonella spp.*, *Treponema spp.*, *Ureaplasma diversum*, và các loại vi khuẩn khác đã biết trong lĩnh vực này gây ra.

Các bệnh nhiễm nấm hoặc nấm mốc lấy làm ví dụ ở các loài bò bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các bệnh do sự nhiễm *Actinobacterim spp.*, *Aspergillus spp.*, và *Histomonas spp.*, và các loại nấm hoặc nấm mốc truyền nhiễm khác đã biết trong lĩnh vực này gây ra.

Các ký sinh trùng được lấy làm ví dụ ở các loài bò bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, *Anaplasma spp.*, *Anaplasma marginale*, *Babesia spp.*, *Chorioptes spp.*, *Cooperia*, *Cysticercus spp.*, *Damalinia bovis*, *Dermatophilus spp.*, *Dictylocaulus spp.*, *Eimeria spp.*, *Eperythrozoon spp.*, *Fascioloides spp.*, *Haemonchus spp.*, *Melophagus spp.*, *Muellerius spp.*, *Nematodirus spp.*, *Neospora spp.*, *Oestrus spp.*, *Ostertagia spp.*, *Psoroptes spp.*, *Sarcoptes spp.*, *Serpens spp.*, *Strongyloides spp.*, *Toxoplasma spp.*, *Trichophyton spp.*, *Trichostrongylus*, *Trichuris spp.*, và *Tritrichomonas spp.*, và các loại ký sinh trùng khác đã biết trong lĩnh vực này.

Các tác nhân gây bệnh nhiễm được lấy làm ví dụ ở các loài bò còn bao gồm các tác nhân gây bệnh viêm vú, viêm tử cung, bệnh crypto (cryptosporidiosis), và các bệnh nhiễm bất kỳ khác mà các loài bò dễ bị mắc phải.

C. Sử dụng

Có thể sử dụng bằng nhiều cách khác nhau. Tất nhiên là, cách thức cụ thể được chọn sẽ tùy thuộc vào các tác nhân sinh học cụ thể được chọn, tuổi tác và tình trạng sức khỏe nói chung của đối tượng, tình trạng bệnh lý cụ thể được điều trị và liều lượng

cần thiết để có hiệu lực điều trị. Các phương pháp theo sáng chế có thể được thực hành bằng cách sử dụng cách thức sử dụng bất kỳ mà tạo ra mức đáp ứng miễn dịch hữu hiệu mà không gây ra các tác dụng phụ không thể chấp nhận về mặt lâm sàng. Các chế phẩm có thể được trình bày một cách thuận tiện dưới dạng liều đơn vị và có thể được bào chế bằng phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp đã được biết rất rõ trong lĩnh vực này.

Chế phẩm điều hòa miễn dịch có thể được dùng trong tĩnh mạch, trong cơ, trong chân bì, trong phúc mạc, dưới da, bằng cách phun, trong trứng bằng phương pháp nang lông, qua đường miệng, trong mắt, trong khí quản, trong mũi, hoặc bằng các phương pháp khác đã biết trong lĩnh vực này. Theo một khía cạnh, chất điều hòa miễn dịch được dùng dưới da. Theo khía cạnh khác, chất điều hòa miễn dịch có thể được dùng trong cơ. Theo khía cạnh khác, chất điều hòa miễn dịch được dùng dưới dạng thuốc phun. Theo khía cạnh khác, chất điều hòa miễn dịch có thể được dùng qua đường miệng.

Theo một khía cạnh, bản thân chất điều hòa miễn dịch có thể được dùng cho đối tượng trước khi thử (hoặc gây nhiễm). Theo khía cạnh khác, bản thân chất điều hòa miễn dịch có thể được dùng cho đối tượng sau khi thử (hoặc gây nhiễm). Theo khía cạnh khác, bản thân chất điều hòa miễn dịch có thể được dùng cho đối tượng đồng thời với khi thử (hoặc gây nhiễm).

Theo một số khía cạnh, chế phẩm điều hòa miễn dịch có thể được dùng đồng thời với việc chủng ngừa trước khi thử. Theo một số khía cạnh, chế phẩm điều hòa miễn dịch có thể được dùng đồng thời với việc chủng ngừa đồng thời với khi thử. Theo một số khía cạnh, việc dùng đồng thời có thể bao gồm việc dùng vacxin và chất điều hòa miễn dịch ở khu vực tổng quát như nhau trên đối tượng ở hai điểm khác nhau cạnh nhau (tức là, các vị trí tiêm ở gần nhau trên cổ của đối tượng), ở các phía đối diện của đối tượng trên khu vực tổng quát như nhau (tức là, trên mỗi phía của cổ), hoặc trên các khu vực khác nhau của cùng đối tượng. Theo một số khía cạnh, chế phẩm điều hòa miễn dịch có thể được dùng trước khi chủng ngừa và thử. Theo một số khía cạnh, chế phẩm điều hòa miễn dịch có thể được dùng sau khi chủng ngừa nhưng trước khi thử. Chế phẩm điều hòa miễn dịch có thể được dùng cho đối tượng sau khi thử, đối tượng này đã được chủng ngừa trước khi thử (hoặc gây nhiễm).

Chuyên gia trong lĩnh vực này sẽ hiểu rõ rằng cách dùng có thể thay đổi tùy thuộc vào đối tượng và sức khỏe hoặc tình trạng của đối tượng. Cách dùng được đề xuất đối với các loài lông vũ và các loài bò là nhằm mục đích lấy làm ví dụ và được đề xuất không hạn chế.

Việc chủng ngừa các loài lông vũ có thể được thực hiện ở độ tuổi bất kỳ. Việc chủng ngừa có thể được thực hiện đối với các phôi 18 ngày tuổi (trong trứng) và cao hơn thế đối với vi sinh vật sống và 3 tuần và lâu hơn đối với vi sinh vật đã vô hoạt hoặc typ vacxin khác. Đối với việc chủng ngừa trong trứng, việc chủng ngừa có thể được thực hiện ở tuần trắng cuối của sự phát triển. Vacxin có thể được dùng dưới da, bằng phương pháp nang lông, bằng cách phun, qua đường miệng, trong mắt, trong khí quản, trong mũi, trong trứng, hoặc bằng các phương pháp khác đã biết trong lĩnh vực này. Các vacxin dùng qua đường miệng có thể được dùng trong nước uống. Hơn nữa, dự tính rằng các phương pháp theo sáng chế có thể được sử dụng dựa trên lịch trình chủng ngừa thông thường.

Chế phẩm điều hòa miễn dịch cũng có thể được dùng dưới da, bằng phương pháp nang lông, bằng cách phun, trong mắt, trong khí quản, trong mũi, trong trứng, hoặc bằng các phương pháp khác đã biết trong lĩnh vực này cho loài lông vũ. Ví dụ, chế phẩm điều hòa miễn dịch có thể được dùng trong trứng. Cách khác, chế phẩm điều hòa miễn dịch có thể được dùng dưới dạng chế phẩm phun.

Chế phẩm điều hòa miễn dịch có thể được dùng trong trứng cho phôi loài lông vũ ở tuần trắng cuối của sự phát triển của nó. Ví dụ, chế phẩm điều hòa miễn dịch có thể được dùng trong trứng cho phôi 18 ngày tuổi hoặc 19 ngày tuổi. Việc dùng cho trứng có thể trước khi thử (hoặc gây nhiễm) hoặc sau khi thử.

Chất điều hòa miễn dịch có thể được dùng cho động vật thuộc loài lông vũ hoặc loài bò từ khoảng 1 đến khoảng 14 ngày trước khi thử hoặc từ khoảng 1 đến khoảng 14 ngày sau khi thử. Ví dụ, chất điều hòa miễn dịch có thể được dùng từ khoảng 1 đến khoảng 7 ngày trước khi thử hoặc từ khoảng 1 đến khoảng 7 ngày sau khi thử. Thích hợp là, chất điều hòa miễn dịch được dùng 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ngày trước khi thử hoặc 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ngày sau khi thử.

Việc chủng ngừa các loài bò có thể được thực hiện ở độ tuổi bất kỳ. Vacxin có thể được dùng trong tĩnh mạch, trong cơ, trong chân bì, trong phúc mạc, dưới da, bằng cách phun, qua đường miệng, trong mắt, trong khí quản, trong mũi, hoặc bằng các phương pháp khác đã biết trong lĩnh vực này. Hơn nữa, dự tính rằng các phương pháp theo sáng chế có thể được sử dụng dựa trên lịch trình chủng ngừa thông thường.

Các hệ phân phát khác có thể bao gồm các hệ phân phát giải phóng theo thời gian, hệ phân phát giải phóng kéo dài, hoặc hệ phân phát giải phóng chậm. Các hệ này có thể tránh được việc dùng lặp lại các chế phẩm do đó gia tăng tính thuận tiện. Nhiều loại hệ giải phóng là đã có và đã biết đối với chuyên gia có trình độ trung bình trong lĩnh vực này. Các hệ này bao gồm các hệ trên cơ sở polyme như poly(lactit-glycolit), các copolyoxalat, polycaprolacton, polyesteramit, polyorthoeste, axit polyhydroxybutyric, và polyanhydrit. Các vi nang từ các polyme nêu trên chứa được chất được mô tả trong, ví dụ, US 5,075,109.

Các hệ phân phát còn bao gồm các hệ không phải polyme đó là các lipit chứa các sterol như cholesterol, các este cholesterol, và axit béo hoặc chất béo trung tính như mono-, di-, và tri-glyxerit; các hệ giải phóng hydrogel; các hệ silastic; các hệ trên cơ sở peptit; các chất phủ sáp; các viên nén sử dụng các chất kết dính và tá dược thông thường; các viên cấy được dung hợp một phần; và các hệ tương tự. Các ví dụ cụ thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các hệ ăn mòn trong đó tác nhân theo sáng chế được chứa dưới dạng trong chất nền như các hệ được mô tả trong US 4,452,775, US 4,675,189 và US 5,736,152, và các hệ khuếch tán trong đó thành phần hoạt tính thâm ở tốc độ được kiểm soát qua polyme như được mô tả trong US 3, 854,480, US 5,133,974 và US 5,407,686. Ngoài ra, các hệ phân phát cứng trên cơ sở bom có thể được sử dụng, một số hệ này được làm thích ứng với việc cấy.

Các thay đổi khác có thể được thực hiện trong chế phẩm, các sản phẩm và các phương pháp nêu trên mà không trệch khỏi phạm vi của sáng chế, dự tính rằng tất cả các vấn đề chứa trong phần mô tả nêu trên và trong các ví dụ được nêu dưới đây sẽ được hiểu là chỉ nhằm minh họa và không có nghĩa làm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Định nghĩa

Thuật ngữ “lượng hữu hiệu” chỉ lượng cần thiết hoặc đủ để nhận được tác dụng sinh học mong muốn. Ví dụ, lượng hữu hiệu của chất điều hòa miễn dịch để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh truyền nhiễm là lượng cần thiết để gây ra sự phát triển của đáp ứng miễn dịch khi phơi nhiễm với vi sinh vật, nhờ đó gây ra sự giảm lượng vi sinh vật trong đối tượng và tốt hơn là gây ra sự tiết trừ vi sinh vật. Lượng hữu hiệu đối với ứng dụng cụ thể bất kỳ có thể thay đổi tùy thuộc vào các yếu tố như bệnh hoặc tình trạng bệnh lý được điều trị, kích cỡ của đối tượng, hoặc độ nặng của bệnh hoặc tình trạng bệnh lý. Chuyên gia có trình độ trung bình trong lĩnh vực này có thể xác định bằng kinh nghiệm lượng hữu hiệu của chất điều hòa miễn dịch mà không cần thử nghiệm quá mức.

Thuật ngữ “xytokin” chỉ họ protein tăng cường miễn dịch. Họ xytokin bao gồm yếu tố phát triển chất sinh huyết, các interleukin, các interferon, các phân tử liên họ globulin miễn dịch, các phân tử họ yếu tố hoại tử khối u và các chemokin (tức là các protein mà điều hòa sự di trú và sự hoạt hóa của các tế bào, đặc biệt là các tế bào thực bào). Các xytokin được lấy làm ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, interleukin-2 (IL-2), interleukin-12 (IL-12), interleukin-15 (IL-15), interleukin-18 (IL-18), interferon- α (IFN α), và interferon- γ (IFN γ).

Thuật ngữ “gây ra” có thể được sử dụng thay thế cho các thuật ngữ hoạt hóa, kích thích, sinh ra hoặc tăng cường điều hòa.

Thuật ngữ “gây ra đáp ứng miễn dịch” ở đối tượng chỉ việc kiểm soát hoặc tác động một cách cụ thể đến hoạt tính của đáp ứng miễn dịch, và có thể bao gồm sự hoạt hóa đáp ứng miễn dịch, tăng cường điều hòa đáp ứng miễn dịch, tăng cường đáp ứng miễn dịch và/hoặc thay đổi đáp ứng miễn dịch (như bằng cách gây ra kiểu đáp ứng miễn dịch mà đến lượt nó lại làm thay đổi kiểu đáp ứng miễn dịch phổ biến ở đối tượng từ đáp ứng miễn dịch mà gây hại hoặc không hiệu quả đối với thành đáp ứng miễn dịch mà có lợi hoặc có tính chất bảo vệ).

Thuật ngữ “liên kết về mặt hoạt động” chỉ sự liên kết của phân tử axit nucleic với trình tự kiểm soát phiên mã theo cách mà phân tử này có thể được biểu hiện khi được chuyển nhiễm (tức là, được biến nạp, tải nạp hoặc chuyển nhiễm) vào tế bào chủ. Các

trình tự đối chứng phiên mã là các trình tự mà kiểm soát sự bắt đầu, kéo dài, và kết thúc của quá trình phiên mã. Các trình tự kiểm soát phiên mã đặc biệt quan trọng là các trình tự mà kiểm soát sự bắt đầu phiên mã, như các trình tự hoạt hóa, tăng cường, thực hiện và kìm hãm. Nhiều loại trình tự kiểm soát phiên mã này đã được chuyên gia trong lĩnh vực này biết đến. Các trình tự kiểm soát phiên mã được ưu tiên bao gồm các trình tự mà có tác dụng ở các tế bào loài lông vũ, cá, động vật có vú, vi khuẩn, virus, thực vật, và côn trùng. Mặc dù các trình tự kiểm soát phiên mã bất kỳ có thể được sử dụng theo sáng chế, nhưng các trình tự nay có thể bao gồm các trình tự kiểm soát phiên mã có trong tự nhiên được kết hợp về mặt tự nhiên với trình tự mã hóa chất sinh miễn dịch hoặc protein kích thích miễn dịch.

Các thuật ngữ “phân tử axit nucleic” và “trình tự axit nucleic” có thể được sử dụng thay thế nhau và bao gồm ADN, ARN, hoặc các dẫn xuất của ADN hoặc ARN. Các thuật ngữ còn bao gồm các oligonucleotit và các trình tự lớn hơn như các plasmid, như các plasmid kích thích miễn dịch được mô tả theo sáng chế, và chứa cả hai phân tử axit nucleic mà mã hóa protein hoặc mảnh của nó, và các phân tử axit nucleic mà chứa các vùng điều hòa, các intron, hoặc ADN hoặc ARN không mã hóa khác. Thông thường là, oligonucleotit có trình tự axit nucleic từ khoảng 1 đến khoảng 500 nucleotit, và thông thường hơn nữa là có ít nhất là khoảng 5 nucleotit trên chiều dài của nó. Phân tử axit nucleic có thể thu được từ nguồn bất kỳ, bao gồm các nguồn động vật có vú, cá, vi khuẩn, côn trùng, virus, thực vật, tổng hợp hoặc kết hợp các nguồn này. Phân tử axit nucleic có thể được tạo ra bằng các phương pháp thường đã được biết đến trong lĩnh vực này như kỹ thuật ADN tái tổ hợp (ví dụ, phản ứng chuỗi polymeraza (polymerase chain reaction: PCR), khuếch đại, tách dòng) hoặc tổng hợp hóa học. Các phân tử axit nucleic bao gồm các phân tử axit nucleic tự nhiên và các chất đồng dạng với chúng, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các biến thể alen tự nhiên và các phân tử axit nucleic được cải biến trong đó các nucleotit đã được xen vào, cắt bỏ, thay thế, hoặc nghịch đảo theo cách sao cho các cải biến này hầu như không can thiệp vào khả năng của phân tử axit nucleic để gây ra đáp ứng miễn dịch hữu dụng trong các phương pháp theo sáng chế. Các chất tương đồng axit nucleic có thể được tạo ra bằng cách sử dụng một số phương pháp đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực này (xem, ví dụ,

Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Labs Press, 1989), ấn phẩm này được đính kèm theo đây bằng cách viện dẫn.

Các thuật ngữ “chất đánh dấu có thể chọn lọc” và “gen đánh dấu có thể chọn lọc” chỉ gen mà mã hóa sản phẩm mà bảo vệ sinh vật trong đó gen này được biểu hiện tránh khỏi tác nhân chọn lọc (ví dụ, chất kháng sinh) hoặc tránh khỏi tình trạng mà thường sẽ tiêu diệt sinh vật hoặc ức chế sự phát triển của nó. Các gen đánh dấu có thể chọn lọc là các gen kháng chất kháng sinh thông thường nhất, ví dụ, các gen kháng kanamycin, các gen kháng ampicilin, các gen kháng chloramphenicol, các gen kháng tetracyclin, v.v.). Do đó, ví dụ, nếu các tế bào *E. coli* được đem thực hiện biến nạp để đưa plasmid mã hóa gen kháng kanamycin vào và sau đó phát triển trên hoặc trong môi trường chứa kanamycin, thì chỉ các tế bào *E. coli* mà đã được đưa plasmid vào thành công và biểu hiện gen kháng kanamycin sẽ sống sót. Các thuật ngữ “chất đánh dấu có thể chọn lọc” và “gen đánh dấu có thể chọn lọc” còn bao gồm các gen mà mã hóa cho các enzym có liên quan đến sự tổng hợp hợp chất mà là thiết yếu cho sự phát triển của sinh vật. Khi được đưa vào trong vi sinh vật di dưỡng thụ động mà không thể tổng hợp hợp chất thiết yếu, các gen này cho phép sinh vật phát triển trong môi trường mà đã được bổ sung hợp chất thiết yếu. Ví dụ, các tế bào vi khuẩn mà là dinh dưỡng thụ động đối với axit amin lysin do sự đột biến trong hoặc sự không có mặt của enzym có liên quan đến quy trình sinh tổng hợp lysin thường là không thể phát triển được trên môi trường mà chưa được bổ sung lysin. Nếu vi khuẩn này được đem thực hiện biến nạp để đưa vào plasmid mã hóa enzym có liên quan đến quy trình sinh tổng hợp lysin thì vi khuẩn mà đã đưa plasmid vào thành công và biểu hiện enzym này sẽ sống sót khi được phát triển trên môi trường mà chưa được bổ sung lysin. Các thuật ngữ “chất đánh dấu có thể chọn lọc” và “gen đánh dấu có thể chọn lọc” còn bao gồm các gen mà cho phép chọn lọc gây độc/giải độc. Ví dụ, gen *ccdB* mã hóa protein mà liên kết với ADN gyraza, enzym thiết yếu cho sự phân chia tế bào. Khi liên kết với ADN gyraza, sản phẩm gen *ccdB* làm suy yếu sự sao chép gen và gây ra sự chết tế bào. Do đó, vi khuẩn biểu hiện sản phẩm gen *ccdB* không thể sống sót. Gen *ccdA* mã hóa protein (“chất giải độc”) mà tác dụng như là chất ức chế tự nhiên của sản phẩm gen *ccdB*. Do đó, nếu vi khuẩn có gen *ccdB* trong hệ gen của chúng được đem thực hiện biến nạp để đưa plasmid mã hóa

sản phẩm gen *ccdA* vào thì chỉ các tế bào mà đã đưa plasmit vào thành công và biểu hiện gen *ccdA* sẽ sống sót.

Các thuật ngữ “chất đánh dấu có thể sàng lọc” và “gen đánh dấu có thể sàng lọc” chỉ gen mà mã hóa sản phẩm mà cho phép người quan sát phân biệt được các tế bào biểu hiện gen đánh dấu có thể sàng lọc và các tế bào không biểu hiện gen đánh dấu có thể sàng lọc. Các hệ gen đánh dấu có thể sàng lọc cũng được biết rõ trong lĩnh vực này và bao gồm, ví dụ, các gen *lacZ* và các gen mã hóa các huỳnh quang như protein huỳnh quang xanh lá cây (GFP-green fluorescent protein), protein huỳnh quang vàng (YFP-yellow fluorescent protein), protein huỳnh quang đỏ (RFP-red fluorescent protein), protein huỳnh quang xanh da trời (BFP-blue fluorescent protein), hoặc protein huỳnh quang xanh lục (CFP-cyan fluorescent protein).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "đối tượng" chỉ sinh vật sống có hệ thần kinh trung ương. Cụ thể là, đối tượng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, người hoặc bệnh nhân và các động vật bầu bạn. Các động vật bầu bạn có thể bao gồm các động vật có vú nuôi trong nhà, ví dụ, chó, mèo, ngựa), các động vật có vú có giá trị thương mại đáng kể, ví dụ, các loài lông vũ, các loài bò, bò sữa, bò thịt, các động vật thể thao), các động vật có vú có giá trị khoa học đáng kể (ví dụ, các chủng nuôi nhốt hoặc tự do của các loài gây nguy hiểm), hoặc các động vật có vú có giá trị khác. Các đối tượng thích hợp còn bao gồm: chuột nhắt, chuột cống, chó, mèo, các loài móng guốc như gia súc, lợn, cừu, ngựa, và dê, các loài gặm nhấm như thỏ và thỏ rừng, các loài gặm nhấm khác, và loài linh trưởng như khỉ, tinh tinh, và khỉ hình người. Các đối tượng có thể là loài bất kỳ trong số các loài lông vũ, nuôi trong nhà hoặc hoang dã, và có thể được nuôi nhằm mục đích thương mại để gây giống, lấy thịt hoặc lấy trứng. Các loài lông vũ được lấy làm ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, gà, gà tây, ngỗng, vịt, gà lôi, chim cút, bồ câu, đà điểu, chim nhốt trong lồng, chim trong vườn thú và các loài tương tự. Các đối tượng có thể là loài bất kỳ trong số các loài bò, nuôi trong nhà hoặc hoang dã, và có thể được nuôi nhằm mục đích thương mại để gây giống, lấy thịt hoặc lấy sữa. Các loài bò được lấy làm ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, loài linh dương, trâu, bò Tây Tạng, gia súc, bò rừng bizon, và các loài tương tự. Các loài gia súc bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bò sữa, bò đực, bê đực, bê cái, bò đực thiến, gia súc lấy thịt, gia súc lấy sữa, và các loài tương tự. Các đối tượng có thể là loài bất kỳ trong

số các loài thủy sản, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các loài cá, loài giáp xác, loài nhuyễn thể bất kỳ sống trong môi trường nước ngọt hoặc nước mặn. Theo một số khía cạnh, các đối tượng có thể được chẩn đoán bị bệnh truyền nhiễm, có thể có nguy cơ mắc bệnh truyền nhiễm, hoặc có thể đang bị bệnh truyền nhiễm. Các đối tượng có thể có độ tuổi bất kỳ bao gồm thời kỳ trong tử cung, thời kỳ sơ sinh, thời kỳ thanh niên, thời kỳ trưởng thành, thời kỳ trung tuổi, hoặc thời kỳ già.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ không giới hạn dưới đây được đề xuất để minh họa thêm sáng chế.

Ví dụ 1: Điều chế plasmit pGCMB75.6.

Bản đồ của pGCMB75.6 được thể hiện trên FIG.2. Trong pGCMB75.6, gen kháng kanamycin của pMB75.6 (xem FIG.1) đã được thay thế bằng trình tự không mã hóa từ *E. coli* K-12. Để tạo ra plasmit pGCMB75.6, điểm giới hạn cắt đơn AscI được đưa vào pMB75.6 ở điểm 5' của gen kháng kanamycin để tạo ra pMB75.6_AscI (SEQ ID NO: 3). Để đưa điểm giới hạn AscI vào, adenin có mặt trong trình tự của pGCMB75.6 được đột biến thành guanin, nhờ đó thay đổi trình tự AGCGCGCC trong plasmit pGCMB75.6 thành GGCGCGCC. Cải biến này được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp trên cơ sở đột biến gen bằng cách nối trong quá trình khuếch đại. Đoạn nối đơn được sử dụng, đoạn này mang điểm giới hạn AscI ở phần giữa của nó.

Mảnh AscI (GGCGCGCC) / XhoI (CTCGAG) dài 1779 nt (nt: nucleotit) được tổng hợp bởi công ty Life Technologies GmbH (Darmstadt, Germany). Mảnh này chứa năm vùng bao gồm trình tự không mã hóa từ *E. coli* K-12 (các vùng trao đổi 1–5, được viết tắt là “exc. 1,” “exc. 2,” v.v. trên FIG.2), gốc sao chép F1, và gen lacZ đã được cắt (xem FIG. 2). Trong trường hợp vùng trao đổi 4, trình tự *E. coli* được thay đổi bằng tay ở một số vị trí để tăng lượng GC của plasmit. Ngoài ra, trong vùng trao đổi 2, nucleotit đơn được thay đổi để cắt bỏ điểm giới hạn DraI, sao cho sẽ chỉ có một điểm DraI đơn trong plasmit.

Như được thể hiện trên Fig. 2, pGCMB75.6 chứa một số nhân tố điều hòa (gốc sao chép F1, đoạn khởi đầu CMV, và gốc sao chép pUC) và điểm đa tách dòng. pGCMB75.6 cũng chứa gen lacZ được cắt. Tuy nhiên, pGCMB75.6 không chứa các

gen đánh dấu có thể chọn lọc hoặc có thể sàng lọc về mặt chức năng hoặc có chiều dài đầy đủ bất kỳ. pGCMB75.6 có độ dài 4242 bp và chứa 283 dinucleotit CpG.

Một dòng dương tính, mang điểm AscI mới được đưa vào (pMB75.6_AscI) được tiêu hủy bằng AscI (GGCGCGCC) / XhoI (CTCGAG) để tạo ra mảnh 2463 chứa đoạn khởi đầu CMV, điểm đa tách dòng, và gốc sao chép pUC (xem FIG. 2). Mảnh tổng hợp AscI (GGCGCGCC) / XhoI (CTCGAG) 1779 nt cũng được tiêu hủy bằng AscI / XhoI.

Cả hai mảnh (mảnh vector 2463 nt và mảnh xen vào 1779 nt) được rửa giải bằng gel sử dụng gel agarosa 1% bằng cách sử dụng kit chiết gel QIAquick của Qiagen. Quá trình nối được thực hiện bằng cách sử dụng 600ng mảnh 1779 nt và 400ng mảnh vector pMB75.6_AscI 2463 nt với tổng thể tích là 20µl, qua đêm ở 16°C. Sau đó 20µl này được thẩm tách trong 2 giờ đối với 20ml H₂O trên đá, và sau đó được trộn với 5µl tế bào DH5α *E. coli* khả biến điện tử và 40µl H₂O (Invitrogen F-f80lacZΔM15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rk-, mk+) gal- phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1; Lot no. 1376481, Part no. 44-0097). Sau khi biến nạp và tái sinh 1 giờ trong môi trường SOC, các tế bào được cấy lên các đĩa LB không chứa kanamycin ở mức độ pha loãng là 10⁻⁴. Mức độ pha loãng này cho phép tách các dòng riêng rẽ.

PCR khuẩn lạc được thực hiện trên các dòng riêng rẽ bằng cách sử dụng các đoạn mồi dưới đây được liệt kê trong bảng 1.

Bảng 1. Đoạn mồi PCR.

AH-13 ngược	GTGCGCGGAACCCCTATTTG (SEQ ID NO: 5)
AH-22 xuôi	GCGTACCCGCCGTTCTCATC (SEQ ID NO: 6)

Các vị trí của các đoạn mồi AH-13 ngược và AH-22 xuôi được thể hiện trên FIG. 2. Hỗn hợp sơ chế chứa polymeraza Taq được sử dụng. Các phản ứng PCR được nạp lên gel agarosa 1% chứa ethidi bromua. Các dòng dương tính đã mang plasmit chính xác (pGCMB75.6) thể hiện sản phẩm 606 bp.

Tổng số trên 10.000 dòng được sàng lọc để xác định ba dòng dương tính. Ba dòng dương tính này được truyền tức thì đến các đĩa LB mới và được sử dụng để tạo

ra 3 Ngân hàng tế bào nghiên cứu (RCB-Research Cell Bank; Sys 3733, Sys 3734 và Sys 3735).

Đồng thời, môi trường được cấy ba dòng này và ADN plasmit được tạo ra. Việc xác nhận trình tự đầy đủ của mỗi dòng phụ trong số ba dòng phụ này được thực hiện bằng cách sử dụng các đoạn môi dưới đây được liệt kê trong bảng 2.

Bảng 2. PCR để xác nhận trình tự.

AH-12 xuôi	GTCTGACGCTCAGTGGAACG (SEQ ID NO: 7)
AH-13 ngược	GTGCGCGGAACCCCTATTTG (SEQ ID NO: 5)
AH-15	GTTCCAGTTTGAACAAGAGTC (SEQ ID NO: 8)
AH-16	GGCAATTAGCCATATTAGTC (SEQ ID NO: 9)
AH-17	GCAGAGCTCGTTTAGTGAACCG (SEQ ID NO: 10)
AH-18	GATCATAATCAGCCATACCAC (SEQ ID NO: 11)
AH-19	CGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACAC (SEQ ID NO: 12)
AH-20	CCACAGGTGTCCACTCCCAGGTTC (SEQ ID NO: 13)
AH-21 ngược	CTAGTCAAGGCACTATACATC (SEQ ID NO: 14)
AH-22 xuôi	GCGTACCCGCCGTTCTCATC (SEQ ID NO: 6)
AH-23	TCCACAGAATCAGGGGATAACG (SEQ ID NO: 15)

Ví dụ 2: Tạo plasmit pLacZMB75.6.

Để tạo ra plasmit pLacZMB75.6 (FIG. 3; SEQ ID NO: 4), mảnh XhoI (CTCGAG) / DraI (TTTAAA) 1307 nt được tổng hợp bởi công ty Life Technologies GmbH (Darmstadt, Germany). Mảnh 1307 nt này chứa một phần của gen lacZ (265 nt). Do đó, khi được nối vào pGCMB75.6, mảnh này kéo dài gen LacZ được cắt nằm ngược dòng với điểm giới hạn XhoI và cho phép gen LacZ được biểu hiện (so sánh FIG. 2 và FIG. 3). Ngoài ra, 91 nt của điểm đa tách dòng được trao đổi với trình tự không mã hóa *E. coli*, để loại tính tương đồng về trình tự với vùng gen LacZ mới được đưa vào và tránh sự tái tổ hợp. Ngoài ra, vùng 5' của đoạn khởi đầu CMV được cắt bỏ (265 nt) để tạo ra plasmit có kích thước giống như plasmit pGCMB75.6.

pGCMB75.6 và mảnh được tổng hợp 1311 nt đều được tiêu hủy bởi XhoI và DraI. Cả hai mảnh đều được rửa giải gel bằng gel agarosa 1% bằng cách sử dụng kit chiết gel QIAquick của Qiagen.

Quá trình nối được thực hiện bằng cách sử dụng 240ng mảnh 1311 nt và 240 ng mảnh vector với tổng thể tích là 20µl, qua đêm ở 16°C. 3µl này được trộn với 10µl tế bào DH5α *E. coli* khả biến điện tử (Invitrogen F-80lacZΔM15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rk-, mk+) gal- phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1; Lot no. 1376481, Part no. 44-0097) và 40µl dung dịch Glyxerin 10%. Sau khi biến nạp và tái sinh 1 giờ trong môi trường SOC, các tế bào được cấy lên các đĩa LB X-Gal/IPTG không chứa kanamycin ở mức độ pha loãng là 10^{-2} và 10^{-4} . Mức độ pha loãng này cho phép tách các dòng riêng rẽ.

Việc định dạng các khuẩn lạc với plasmid được thực hiện bằng cách chọn lọc xanh da trời/trắng và PCR khuẩn lạc được thực hiện để xác nhận bằng cách sử dụng các đoạn môi dưới đây được liệt kê trong bảng 3.

Bảng 3. Các đoạn môi PCR để xác nhận khuẩn lạc.

AH-15	GTTCCAGTTTGGAAACAAGAGTC (SEQ ID NO: 8)
AH-39	GCTCACTCATTAGGCACCCCAGG (SEQ ID NO: 16)

Các vị trí của các đoạn môi AH-15 và AH-39 được thể hiện trên FIG. 3. Hỗn hợp sơ chế chứa polymeraza Taq được sử dụng. Các phản ứng PCR được nạp lên gel agarosa 1% chứa ethidi bromua. Các dòng dương tính đã mang plasmid chính xác (pLacZMB75.6) thể hiện sản phẩm 777 bp.

Bốn dòng dương tính này được định dạng và truyền tức thì đến các đĩa LB mới và được sử dụng để tạo ra các Ngân hàng tế bào nghiên cứu (RCB; Sys 3736; Sys 3737, Sys 3738 và Sys 3739).

Đồng thời, môi trường được cấy bốn dòng này và ADN plasmid được tạo ra. Việc xác nhận trình tự đầy đủ của mỗi trong số bốn dòng phụ được thực hiện bằng cách sử dụng các đoạn môi giống như đối với pGCMB75.6 nhưng thay vì sử dụng đoạn môi AH-16 (SEQ ID NO: 10), đoạn môi AH-24 được sử dụng (xem bảng 4).

Bảng 4. Đoạn mồi PCR đối với AH-24

AH-24	CGCGTAATACGACTCACTATAG (SEQ ID NO. 17)
-------	--

Ví dụ 3: Chế phẩm điều hòa miễn dịch

Chất điều hòa miễn dịch là chế phẩm chứa lipit có tính cation và trình tự ADN không mã hóa được mô tả theo sáng chế. Các thành phần lipit điều hòa miễn dịch tổng hợp [1-[2-[9-(Z)-octadecenoyloxy]]-2-[8](Z)-heptadecenyl]-3-[hydroxyetyl]imidazoloni clorua (DOTIM) và cholesterol trung tính tổng hợp được phối chế để tạo ra các liposom có đường kính khoảng 200nm (xem, US 6,693,086). Thành phần ADN là pGCMB75.6 hoặc pLacZMB75.6. Do có điện tích âm, ADN plasmit kết hợp với các liposom có điện tích dương (có tính cation) (xem, US 6,693,086).

Ví dụ 4: Sử dụng chế phẩm điều hòa miễn dịch cho mẫu động vật có vú để gia tăng khả năng sống sót trong quá trình thử với virus.

Hiệu quả của các chế phẩm điều hòa miễn dịch được mô tả theo sáng chế được đánh giá ở mẫu động vật có vú được thử với tác nhân gây bệnh. Chuột được dùng chế phẩm điều hòa miễn dịch, chứa ADN pGCMB75.6 và các liposom có tính cation, bằng cách tiêm trong phúc mạc. Chế phẩm điều hòa miễn dịch được dùng với nồng độ 0,01µg, 0,02µg, 0,04µg, và 1,00µg. Các con chuột đối chứng được dùng dung dịch NaCl 0,9% bằng cách tiêm trong phúc mạc. Hai mươi bốn giờ sau khi dùng chế phẩm điều hòa miễn dịch, tất cả các con chuột được thử bằng cách tiêm virus vào qua phúc mạc (0,2ml $10^{3,4}$ KID₅₀/ml). Virus thử là Pseudorabies (PR). Mức độ khả năng sống sót được thể hiện trên FIG. 4. Các con chuột nhận chế phẩm điều hòa miễn dịch được mô tả theo sáng chế có khả năng sống sót phụ thuộc liều cao hơn so với các con chuột đối chứng.

Ví dụ 5: Việc dùng chế phẩm điều hòa miễn dịch cho loài lông vũ làm tăng khả năng nở trứng và khả năng sống sót trong quá trình thử với tác nhân gây bệnh.

Hiệu lực của các chế phẩm điều hòa miễn dịch được mô tả theo sáng chế được đánh giá trên mô hình loài lông vũ được thử với tác nhân gây bệnh bằng cách phun vào ngày E19 (ngày phôi thai 19). Các quả trứng gà được dùng chế phẩm điều hòa miễn dịch, chứa ADN pGCMB75.6 và các liposom có tính cation, bằng cách dùng trong trứng vào ngày E18 (ngày phôi thai 18). Các quả trứng đối chứng nhận chất pha loãng đối chứng giả dược (D5W) (trong trứng). Cả hai canh trường BHI (dạng phun)

được sử dụng làm chất thử giả (T1). Chi tiết về các nhóm điều trị thử nghiệm được thể hiện trên bảng 5 dưới đây.

Bảng 5. Mô tả việc điều trị bằng chế phẩm điều hòa miễn dịch trên loài lông vũ.

Nhóm xử lý	Số lượng trứng ở mỗi thử nghiệm vào ngày E18 ¹	Việc dùng trong trứng (ngày E18)	Thuốc phun thể hiện sự thử (ngày E19)	Số lượng phòng ²	Số lượng khay nở/khay con ³	Số lượng chỗ quây ⁴
T1	896	Dung dịch pha loãng đối chứng giả được (D5W)	Canh trường BHI (giả)	56	7/14	14
T2	896	Dung dịch pha loãng đối chứng giả được (D5W)	APEC ⁵	56	7/14	14
T3	896	1,0 mcg JV-77/quả trứng	APEC ⁵	56	7/14	14
T4	896	0,1 mcg JV-77/quả trứng	APEC ⁵	56	7/14	14
T5	896	1,0 mcg Lot X5872/quả trứng	APEC ⁵	56	7/14	14
T6	896	0,1 mcg Lot X5972/quả trứng	APEC ⁵	56	7/14	14
T7	896	1,0 mcg Lot X5928/quả trứng	APEC ⁵	56	7/14	14
T8	896	0,1 mcg Lot X5928/quả trứng	APEC ⁵	56	7/14	14

¹ Ngày thứ 18 của quá trình ấp trứng; ² 16 quả trứng trên mỗi phòng; ³ 64 quả trứng trên mỗi khay con (được phân chia thành hai nhóm trên mỗi khay); ⁴ Số con gà con nở ra từ mỗi phần của khay được chuyển đến một chỗ quây; ⁵ Escherichia coli gây bệnh cho loài lông vũ (APEC-Avian pathogenic Escherichia coli).

Thành phần ADN của chế phẩm điều hòa miễn dịch được chứa trong một trong số ba dòng được phân lập của ADN pGCMB75.6 (tức là Jv77, X5872, hoặc X5928). Như có thể thấy được từ kết quả được tổng kết trong bảng 6 dưới đây, tỷ lệ nở trung bình và cả tỷ lệ sống sót trung bình đều được cải thiện đối với trứng được dùng chế phẩm điều hòa miễn dịch được mô tả theo sáng chế so với trứng chỉ nhận sự điều trị đối chứng.

Bảng 6. Tỷ lệ nở và tỷ lệ sống sót ở loài lông vũ.*

Nhóm xử lý	N	Tỷ lệ tử vong ở quá trình ấp (t/b)	Tỷ lệ tử vong ở quá trình ấp (**)	Tỷ lệ tử vong sau quá trình ấp (t/b)	Tỷ lệ tử vong sau quá trình ấp (**)	Tỷ lệ tử vong nói chung (t/b)	Tỷ lệ tử vong chung (**)
01-Đối chứng không thử	14	12,5%		0,7%		13,2%	
02-Đối chứng thử (Thử)	14	22,5%		27,8%		43,5%	
03-Jv77: 1,0µg Thử	14	20,2%	-2,3%	26,5%	-1,3%	40,6%	-2,9%
04-Jv77: 0,1 µg Thử	14	20,8%	-1,7%	22,4%	-5,4%	38,6% (p=0,0368)	-4,9%
05-X5872: 1,0µg Thử	14	17,6% (p=0,0110)	-4,9%	22,1%	-5,7%	36,3% (p=0,0023)	-7,2%
06-X5872: 0,1 µg Thử	14	23,0%	0,5%	24,6%	-3,2%	42,0%	-1,5%
07-X5928: 1,0µg Thử	14	15,5% (p=0,0003)	-7,0%	22,3%	-5,5%	33,9% (p<0,0001)	-9,6%
08-X5928: 0,1 µg Thử	14	21,2%	-1,3%	27,7%	-0,1%	43,0%	-0,5%

*Tất cả các thử nghiệm hiệu lực đều đạt (so sánh giữa hai nhóm đối chứng). Khác biệt đáng kể so với nhóm đối chứng thử.

** khác so với nhóm đối chứng-thử

t/b: trung bình

Trong sáng chế này, cụm từ chứa danh từ và các từ "nêu trên", "đã nêu" được dự tính là gồm một hoặc nhiều danh từ tương ứng. Các thuật ngữ "chứa", "bao gồm" và "có" được dự tính là có nghĩa bao gồm và có nghĩa là có thể có các yếu tố bổ sung ngoài các yếu tố đã liệt kê.

Dựa vào phân mô tả trên đây, người ta sẽ thấy rằng một số đối tượng theo sáng chế đạt được và các kết quả có lợi khác cũng đạt được.

Các thay đổi khác có thể được thực hiện trong sản phẩm, các chế phẩm và các phương pháp nêu trên mà không vượt quá phạm vi của sáng chế, dự tính rằng tất cả

các vấn đề chứa trong phần mô tả nêu trên và trong các hình vẽ đi kèm sẽ được hiểu là chỉ nhằm minh họa và không có nghĩa làm giới hạn phạm vi của sáng chế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phân tử axit nucleic kích thích miễn dịch bao gồm mức độ tương đồng trình tự ít nhất 89% so với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1 và ít nhất 200 CpG dinucleotit, trong đó phân tử axit nucleic kích thích miễn dịch này không chứa chỉ thị có thể chọn lọc hoặc có thể sàng lọc được bất kỳ có chiều dài đầy đủ bất kỳ, và trong đó phân tử axit nucleic kích thích miễn dịch này không mã hóa chất sinh miễn dịch.
2. Phân tử axit nucleic kích thích miễn dịch theo điểm 1, trong đó phân tử axit nucleic này có mức độ tương đồng trình tự ít nhất 91% so với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1.
3. Phân tử axit nucleic kích thích miễn dịch theo điểm 1, trong đó phân tử axit nucleic này bao gồm SEQ ID NO: 1.
4. Chế phẩm kích thích miễn dịch chứa:
 - a. phân tử axit nucleic có mức độ tương đồng trình tự ít nhất 89% so với trình tự SEQ ID NO: 1 và ít nhất 200 CpG dinucleotit; và
 - b. tá dược dẫn phân phát liposom có tính cation.
5. Chế phẩm kích thích miễn dịch theo điểm 4, trong đó phân tử axit nucleic có mức độ tương đồng trình tự ít nhất 91% so với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1.
6. Chế phẩm kích thích miễn dịch theo điểm 4, trong đó phân tử axit nucleic bao gồm SEQ ID NO: 1.
7. Chế phẩm kích thích miễn dịch theo điểm 4, trong đó tá dược dẫn phân phát liposom chứa các cặp lipid được chọn từ nhóm bao gồm N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimetyl amoni clorua (DOTMA) và cholesterol; N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimetyl amoni clorua (DOTAP) và cholesterol; 1-[2-(oleoyloxy)etyl]-2-oleyl-3-(2-hydroxyetyl)imidazolini clorua (DOTIM) và cholesterol; và dimetyldioctadexyl-amoni bromua (DDAB) và cholesterol.
8. Phân tử axit nucleic theo điểm 1, trong đó phân tử này có ít nhất 260 CpG dinucleotit.
9. Phân tử axit nucleic theo điểm 1, trong đó phân tử này có ít nhất 280 CpG dinucleotit.
10. Phân tử axit nucleic theo điểm 1, trong đó phân tử này có 283 CpG dinucleotit.

FIG. 1

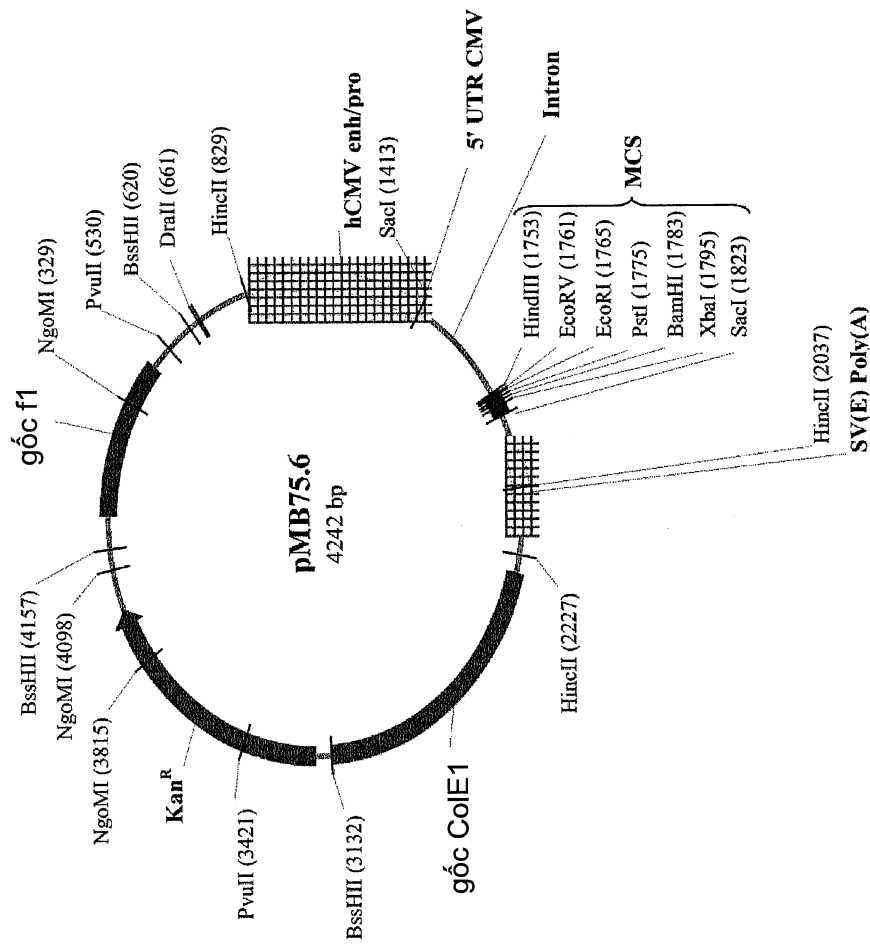


FIG. 2

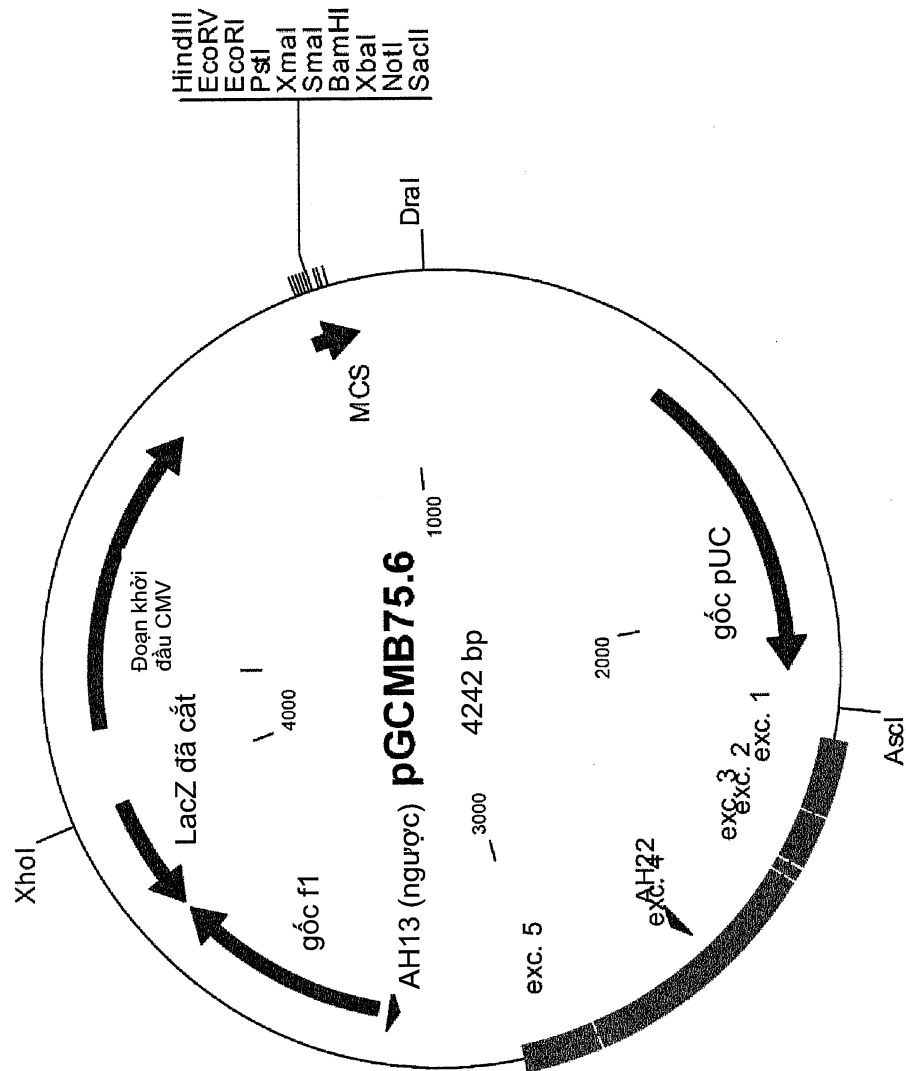


FIG. 3

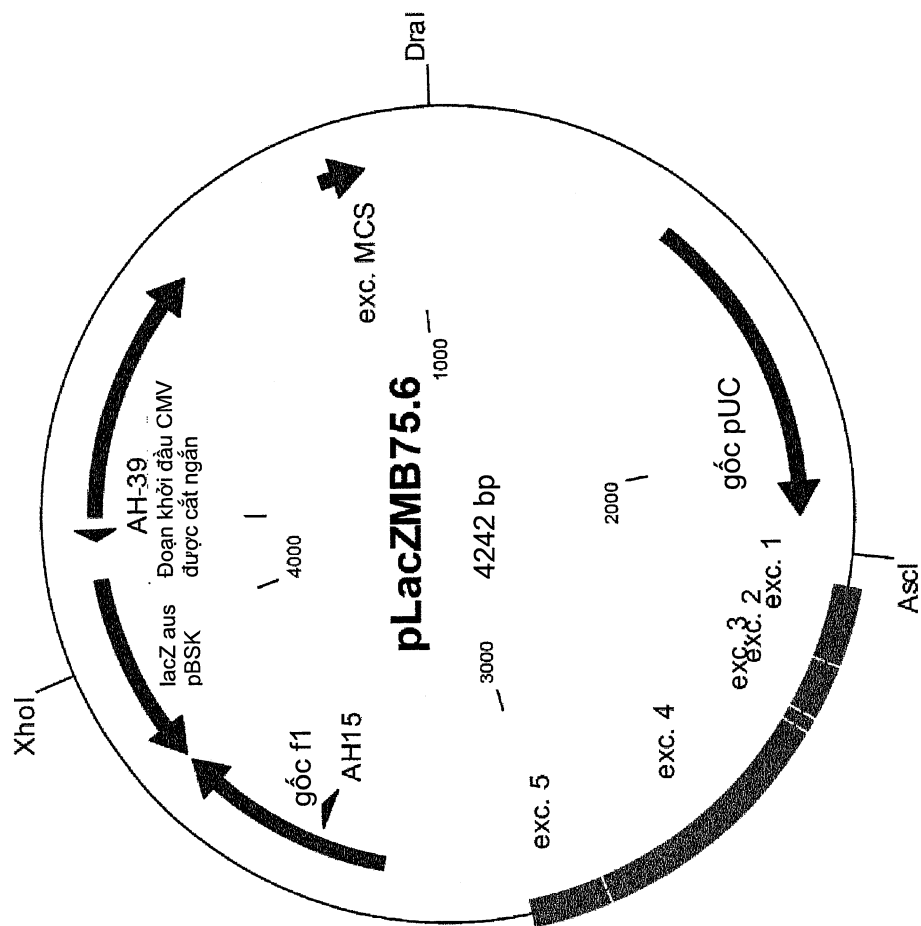


FIG. 4A

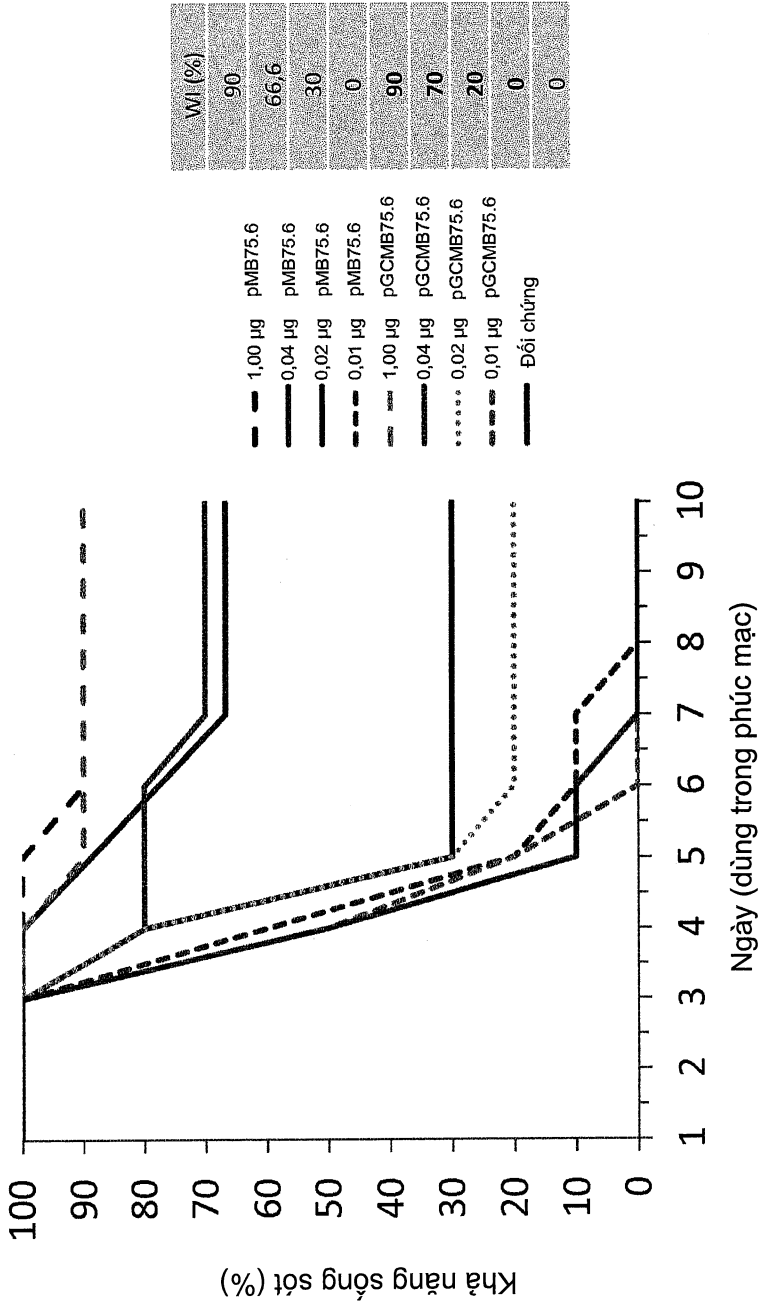
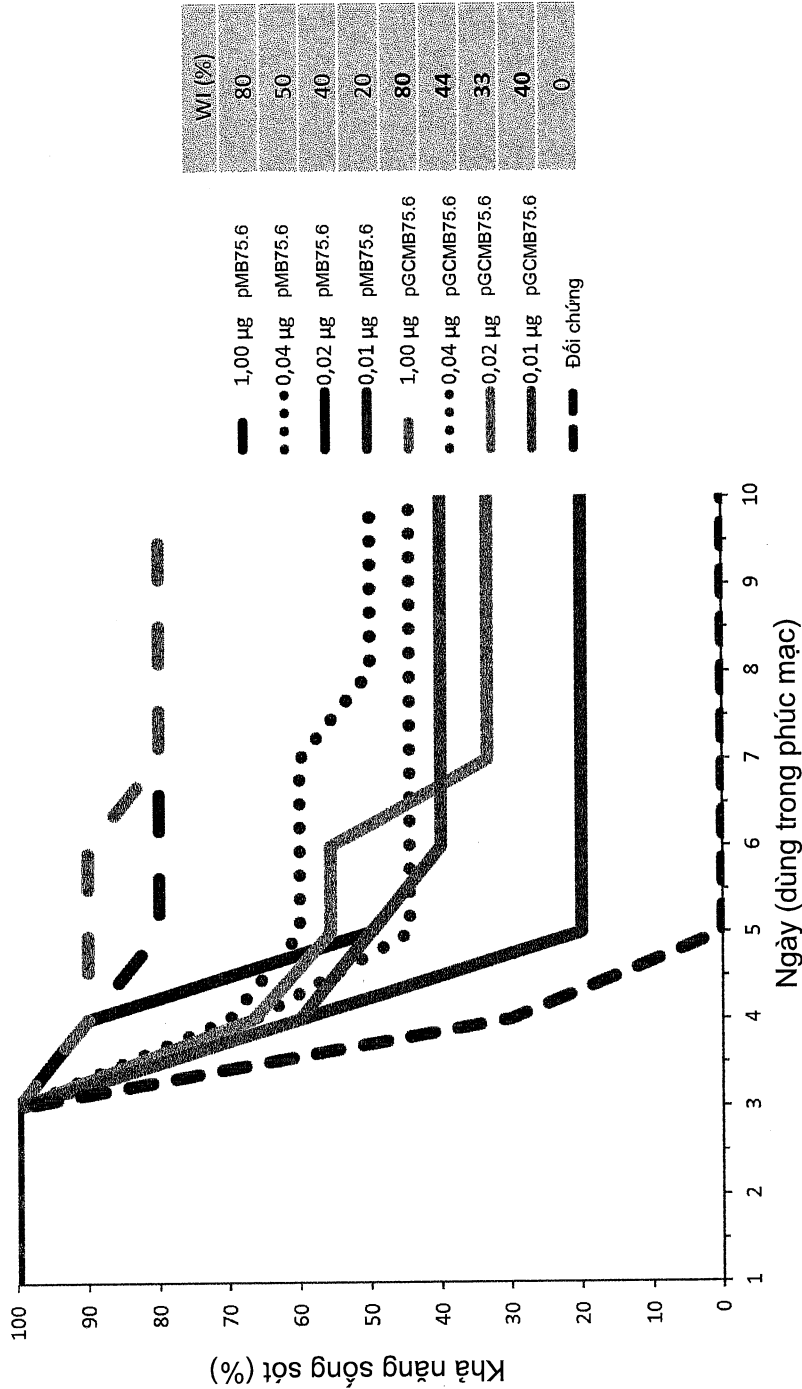


FIG. 4B



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Eicker, Andrea

<120> PHÂN TỬ AXIT NUCLEIC KÍCH THÍCH MIỄN DỊCH VÀ CHẾ PHẨM KÍCH THÍCH
MIỄN DỊCH CHỨA PHÂN TỬ NÀY

<130> BAYR 6436.PRO

<160> 17

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 4242

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nucleotit của plasmit pGCMB75.6

<400> 1

tgaccgccca acgacccccg ccattgacg tcaataatga cgtatgttcc catagtaacg	60
ccaataggga ctttccattg acgtcaatgg gtggagtatt tacggtaaac tgcccacttg	120
gcagtacatc aagtgtatca tatgccaatg ccgcccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa	180
tggcccgctt ggcatatgac ccagtacatg accttacggg actttcctac ttggcagtac	240
atctacgtat tagtcatcgc tattaccatg gtgatgcggg tttggcagta catcaatggg	300
cgtggatagc ggtttgactc acggggattt ccaagtctcc acccattga cgtcaatggg	360
agtttgtttt ggacacaaaa tcaacgggac tttccaaaat gtcgtaacaa ctccgccccca	420
ttgacgcaaa tgggcggtag gcgtgtacgg tgggaggtct atataagcag agctcgttta	480
gtgaaccgtc agatcgcttg gagacgcat ccacgtgtt ttgacctca tagaagacac	540
cgggaccgat ccagcctccc ctggaagccg atctgataac ggtaccgata agctggcggc	600
cgattaagct acagaagttg gtcgtgaggc actgggcagg taagtatcaa gggtacaaga	660
caggtttaag gagaccaata gaaactgggc ttgtcgagac agagaagact cttgcgtttc	720
tgataggcac ctattggtct tactgacatc cactttgcct ttctctccac aggtgtccac	780
tcccaggttc aattacagct ctttaagcagc cgcaagcttg atatcgaatt cctgcagccc	840
gggggatcca ctagttctag agcggccgcc accgcggtgg agctcgaatt atcagatcga	900
ttaataacta tgctcaaaaa ttgtgtacct ttagcttttt aatttgtaaa ggggttaata	960
aggaatatct gatgtatagt gccttgacta gagatcataa tcagccatac cacatttgta	1020
ga	

ggtttttac ttgctttaaa aaacctccca cacctccccc tgaacctgaa acataaaatg	1080
aatgcaattg ttgttggttaa cttgtttatt gcagcttata atgggttacia ataaagcaat	1140
agcatcacaa atttcacaaa taaagcattt ttttcaactgc attctagttg tggtttgtcc	1200
aaactcatca atgtatctta tcatgtctgg atcatcagat ctgccggtct ccctatagtg	1260
agtcgtatta atttcogataa gccagggttaa cctgcattaa tgaatcggcc aacgcgcggg	1320
gagaggcggg ttgcgtattg ggcgctcttc cgcttcctcg ctactgact cgctgcgctc	1380
ggtcgttcgg ctgcggcgag cgggtatcagc tcaactcaaag gcggtaatat ggttatccac	1440
agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa	1500
ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcggtttt ccataggctc cgtccccctg acgagcatca	1560
caaaaatcga cgctcaagtc agagggtggcg aaacccgaca ggactataaa gataccaggc	1620
gtttccccct ggaagctccc tcgtgcgctc tcctgttcgg accctgccgc ttaccggata	1680
cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct catagctcac gctgtaggta	1740
tctcagttcg gtgtaggtag ttcgctccaa gctgggctgt gtgcacgaac cccccgttca	1800
gcccgaaccg tgcgccttat ccggtacta tcgtcttgag tccaacccgg taagacacga	1860
cttatcgcca ctggcagcag ccactggtaa caggattagc agagcgagggt atgtaggcgg	1920
tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagaa cagtatttgg	1980
tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct cttgatccgg	2040
caaacaaacc accgctggta gcgggtggtt tttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag	2100
aaaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctacg gggctctgacg ctcagtggaa	2160
cgaaaactca cgtaaggga ttttggcat gggcgcgctt aggccttttc aaagatcgat	2220
caagagacag gatgaggatc gtttcgcagc ttttcattct gactgcaacg ggcaataagt	2280
ctctgtgtgg attaaaaaaa gagtgtctga tagcagcttc tgaactgggtt acctgccgtg	2340
agtaaattaa aattttattg acttaggtca ctaaggcgcc ttgcgctgag gttgcgtcgt	2400
gatatcatca gggcagaccg gttacatccc cctaacaagc tgtataaaga gaaatactat	2460
ctcattggcg ttgcccgcac ctgacagtgc gacgttggcg tgcgtccgct gaccaacggg	2520
accgaggtaa cagcccaatc tatccatgat ctcgccagc ccgggtcgcc cgttatgcag	2580
ccgggctcgg gtatgaagcc attaaggagc cgaccagcg cgaccgggcg gccggtcacg	2640
ctgcctctgc tgaagcctgc ctgtcactcc ctgcgcggcg taccgcgct tctcatcgag	2700
taggctccgg atcgcgaccc cggacgggccc ctgggcccag gagcggccta tgacaaatgc	2760
cgggtagcga tccggcattc agcattgact gcgcacggat ccagtccttg caggagcctt	2820

```

atgccgaccg tagcaaaaaa tgagcccgag ccgatcgca gttgtgatcc ggtcccgcg 2880
attgccggtc gcgatgacgg tcctgtgtaa gcgttatcgt taccaattgt ttaagaagta 2940
tatacgctac gaggtacttg ataacttctg cgtagcatac atgaggtttt gtataaaaat 3000
ggcgggcat atcaacgcag tgtcagaaat ccgaaacagt ctgcgggact ctgggggttcg 3060
aaatgaccga ccaagcgacg cccaacctgc catcacgaga ttctgattcc accgccgcct 3120
tctatgaaag gttgggcttc ggaatcggtt tccgggacgc cggctggatg atcctccagc 3180
gcggggatct catgctggag ttcttcgccc accctaggcg cgctcatgag cggatacata 3240
tttgaatgta tttagaaaaa taaacaaata ggggttcgc gcacatttcc ccgaaaagtg 3300
ccacctaaat tgtaagcggt aatattttgt taaaattcgc gttaaatttt tgttaaataca 3360
gctcattttt taaccaatag gccgaaatcg gcaaaatccc ttataaatca aaagaataga 3420
ccgagatagg gttgagtgtt gttccagttt ggaacaagag tccactatta aagaacgtgg 3480
actccaacgt caaagggcga aaaaccgtct atcagggcga tggccacta cgtgaaccat 3540
caccctaatac aagttttttg gggtcgaggt gccgtaaagc actaaatcgg aaccctaaag 3600
ggagcccccg atttagagct tgacggggaa agccggcgaa cgtggcgaga aaggaaggga 3660
agaaagcgaa aggagcgggc gctagggcgc tggcaagtgt agcggtcacg ctgcgcgtaa 3720
ccaccacacc cgccgcgctt aatgcgccgc tacagggcgc gtcccattcg ccattcaggc 3780
tgcgcaactg ttgggaaggg cgatcgggtc gggcctcttc gctattacgc cagctggcga 3840
aagggggatg tgctgcaagg cgattaagtt gggtaacgcc agggttttcc cagtcacgac 3900
gttgtaaaac gacggccagt gagcgcgct aatacgactc actatagggc gaattgggta 3960
ccgggcccc cctcgagcag gatctataca ttgaatcaat attggcaatt agccatatta 4020
gtcattgggtt atatagcata aatcaatatt ggctattggc cattgcatac gttgtatcta 4080
tatcataata tgtacattta tattgggtca tgtccaatat gaccgcatg ttgacattga 4140
ttattgacta gttattaata gtaatcaatt acgggggtcat tagttcatag cccatatatg 4200
gagttccgcg ttacataact tacggtaaatt ggcccgcctg gc 4242

```

<210> 2

<211> 4242

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nucleotit của plasmid pMB75.6

<400> 2

ctaaattgta agcggttaata ttttggttaaa attcgcgtta aatttttgtt aaatcagctc	60
attttttaac caataggccg aaatcggcaa aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga	120
gatagggttg agtggtgttc cagtttgga caagagtcca ctattaaaga acgtggactc	180
caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca gggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc	240
ctaatacaagt tttttggggt cgaggtgccg taaagcacta aatcggaacc cttaaaggag	300
ccccgatatt agagcttgac ggggaaagcc ggcgaacgtg gcgagaaagg aagggaagaa	360
agcgaaagga gcgggcgcta gggcgctggc aagtgtagcg gtcacgctgc gcgtaaccac	420
cacaccgcc gcgcttaatg cggcgctaca gggcgcgctc cattcgccat tcaggctgcg	480
caactgttgg gaaggcgat cgggtgcggc ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg	540
gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt aacgccaggg ttttcccagt cacgacgttg	600
taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata cgactcacta tagggcgaaat tgggtaccgg	660
gccccccctc gagcaggatc tatacattga atcaatattg gcaattagcc atattagtca	720
ttggttatat agcataaata aatattggct attggccatt gcatacgttg tatctatata	780
ataatatgta catttatatt ggctcatgtc caatatgacc gccatgttga cattgattat	840
tgactagtta ttaatagtaa tcaattacgg ggtcattagt tcatagccca tatatggagt	900
tccgcgttac ataacttacg gttaaaggcc cgcttggtg accgcccac gacccccgcc	960
cattgacgtc aataatgacg tatgttccca tagtaacgcc aatagggact ttccattgac	1020
gtcaatgggt ggagtattta cggtaaactg ccacttggc agtacatcaa gtgtatcata	1080
tgccaagtcc gccccctatt gacgtcaatg acggtaaagt gccgcctgg cattatgcc	1140
agtacatgac cttacgggac tttcctactt ggagtagcat ctacgtatta gtcacgcta	1200
ttaccatggt gatgcggttt tggcagtaca tcaatggcg tggatagcgg tttgactcac	1260
ggggatttcc aagtctccac ccattgacg tcaatgggag tttgttttgg caccaaaatc	1320
aacgggactt tccaaaatgt cgtaacaact ccgcccatt gacgcaaagt ggcggtaggc	1380
gtgtacgggt ggaggtctat ataagcagag ctcgtttagt gaaccgtcag atcgctgga	1440
gacgccatcc acgctgtttt gacctcata gaagacaccg ggaccgatcc agcctcccct	1500
cgaagccgat ctgataacgg taccgataag ctggcgggcg attaaagctac agaagttgg	1560
cgtgaggcac tgggcaggta agtatcaagg ttacaagaca ggtttaagga gaccaataga	1620
aactgggctt gtcgagacag agaagactct tgcgtttctg ataggcacct attggtctta	1680
ctgacatcca ctttgccttt ctctccacag gtgtccactc ccaggttcaa ttacagctct	1740
taagcagccg caagcttgat atogaattcc tgcagcccg gggatccact agttctagag	1800

cggccgccac	cgcggtggag	ctcgaattat	cagatcgatt	aataactatg	ctcaaaaatt	1860
gtgtaccttt	agctttttta	tttgtaaagg	ggtaataaag	gaatatttga	tgtatagtgc	1920
cttgactaga	gatcataatc	agccatacca	catttgtaga	ggttttactt	gcttttaaaaa	1980
acctcccaca	cctccccctg	aacctgaaac	ataaaatgaa	tgcaattggt	gttggttaact	2040
tgttttattgc	agcttataat	ggttacaaat	aaagcaatag	catcacaaat	ttcacaaata	2100
aagcattttt	ttcactgcat	tctagttgtg	gtttgtccaa	actcatcaat	gtatcttatac	2160
atgtctggat	catcagatct	gccggtctcc	ctatagttag	tcgtattaat	ttcgataagc	2220
caggttaacc	tgcattaatg	aatcggccaa	cgcgcgggga	gaggcggttt	gcgtattggg	2280
cgctcttccg	cttctcgcgt	cactgactcg	ctgcgctcgg	tcgttcggct	gcggcgagcg	2340
gtatcagctc	actcaaaggc	ggtaatacgg	ttatccacag	aatcagggga	taacgcagga	2400
aagaacatgt	gagcaaaagg	ccagcaaaag	gccagggaacc	gtaaaaaggc	cgcgttgctg	2460
gcgtttttcc	ataggctccg	ccccctgac	gagcatcaca	aaaatcgacg	ctcaagtcag	2520
aggtggcgaa	acccgacagg	actataaaga	taccaggcgt	ttccccctgg	aagctccctc	2580
gtgcgctctc	ctgttcgcac	cctgccgctt	accggatacc	tgccgcctt	tctcccttcg	2640
ggaagcgtgg	cgctttctca	tagctcacgc	tgtaggtatc	tcagttcggg	gtaggtcgtt	2700
cgctccaagc	tgggctgtgt	gcacgaacct	cccgttcagc	cgcaccgctg	cgccttatcc	2760
ggtaactatc	gtcttgagtc	caaccggta	agacacgaact	tatcgccact	ggcagcagcc	2820
actggtaaca	ggattagcag	agcgaggtat	gtaggcggtg	ctacagagtt	cttgaagtgg	2880
tggcctaact	acggctacac	tagaagaaca	gtatttggtg	tctgcgctct	gctgaagcca	2940
gttaccttcg	gaaaaagagt	tggtagctct	tgatccggca	aacaaaccac	cgctggtagc	3000
ggtaggtttt	ttgtttgcaa	gcagcagatt	acgcgcagaa	aaaaaggatc	tcaagaagat	3060
cctttgatct	tttctacggg	gtctgacgct	cagtggaaacg	aaaactcacg	ttaagggatt	3120
ttggatcatg	gcgcgcctag	gcttttgcaa	agatcgatca	agagacagga	tgaggatcgt	3180
ttcgcatgat	tgaacaagat	ggattgcacg	caggttctcc	ggccgcttgg	gtggagaggg	3240
tattcggcta	tgactgggca	caacagacaa	tcggctgctc	tgatgccgcc	gtgttcgggc	3300
tgtcagcgca	ggggcgcccg	gttctttttg	tcaagaccga	cctgtccggg	gccctgaatg	3360
aactgcaaga	cgaggcagcg	cggctatcgt	ggctggccac	gacgggcgtt	ccttgccgag	3420
ctgtgctcga	cgttgtcact	gaagcgggaa	gggactgggt	gctattgggc	gaagtgccgg	3480
ggcaggatct	cctgtcatct	caccttgctc	ctgccgagaa	agtatccatc	atggctgatg	3540

```

caatgcggcg gctgcatacg cttgatccgg ctacctgcc attcgaccac caagcgaaac 3600
atcgcatcga gcgagcacgt actcggatgg aagccggtct tgtcgatcag gatgatctgg 3660
acgaagagca tcaggggctc gcgccagccg aactgttcgc caggctcaag gcgagcatgc 3720
ccgacggcga ggatctcgtc gtgacccatg gcgatgcctg cttgccgaat atcatggtgg 3780
aaaatggccg cttttctgga ttcacgact gtggccggct ggggtgtggcg gaccgctatc 3840
aggacatagc gttggctacc cgtgatattg ctgaagagct tggcggcgaa tgggctgacc 3900
gcttcctcgt gctttacggt atcgccgctc ccgattcgca gcgcatcgcc ttctatcgcc 3960
ttcttgacga gttcttctga gcgggactct ggggttcgaa atgaccgacc aagcgacgcc 4020
caacctgcca tcacgagatt tcgattccac cgccgccttc tatgaaaggt tgggcttcgg 4080
aatcgttttc cgggacgccg gctggatgat cctccagcgc ggggatctca tgctggagtt 4140
cttcgcccac cctagggcgc ctcgatgagc gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata 4200
aacaaatagg ggttccgcgc acatttcccc gaaaagtgcc ac 4242

```

<210> 3

<211> 4242

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nucleotit của plasmit pMB75.6_AscI

<400> 3

```

tgaccgcccc acgacccccg ccattgacg tcaataatga cgtatgttcc catagtaacg 60
ccaataggga ctttccattg acgtcaatgg gtggagtatt tacggtaaac tgcccacttg 120
gcagtacatc aagtgtatca tatgccagt ccgcccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa 180
tgccccgcct ggcatatgac ccagtacatg acctacggg actttcctac ttggcagtac 240
atctacgtat tagtcatcgc tattaccatg gtgatgcggt tttggcagta catcaatggg 300
cgtggatagc ggtttgactc acggggatct ccaagtctcc acccattga cgtcaatggg 360
agtttgtttt ggacacaaaa tcaacgggac tttccaaaat gtcgtaacaa ctccgcccc 420
ttgacgcaaa tgggcggtag gcgtgtacgg tgggaggtct atataagcag agctcgttta 480
gtgaaccgtc agatcgctg gagacgccat ccacgctgtt ttgacctcca tagaagacac 540
cgggaccgat ccagcctccc ctogaagccg atctgataac ggtaccgata agctggcggc 600
cgattaagct acagaagttg gtcgtgaggg actgggcagg taagtatcaa ggttacaaga 660
caggtttaag gagaccaata gaaactgggc ttgtcgagac agagaagact cttgcgtttc 720
tgataggcac ctattggtct tactgacatc cactttgcct ttctctccac aggtgtccac 780

```

tcccaggttc aattacagct ctttaagcagc cgcaagcttg atatcgaatt cctgcagccc	840
gggggatcca ctagttotag agcggccgcc accgcggtgg agctcgaatt atcagatcga	900
ttaataacta tgctcaaaaa ttgtgtacct ttagcttttt aatttgtaaa ggggttaata	960
aggaatattt gatgtatagt gccttgacta gagatcataa tcagccatac cacatttgta	1020
gaggttttac ttgctttaaa aaacctccca cacctcccc tgaacctgaa acataaaatg	1080
aatgcaattg ttgttggttaa cttgtttatt gcagcttata atgggttaca ataaagcaat	1140
agcatcacia atttcacaaa taaagcattt ttttcaactgc attctagttg tggtttgccc	1200
aaactcatca atgtatctta tcatgtctgg atcatcagat ctgcoggtct ccctatagtg	1260
agtcgtatta atttcgataa gccagggttaa cctgcattaa tgaatcggcc aacgcgcggg	1320
gagaggcggg ttgcgtattg ggcgctcttc cgcttcctcg ctcaactgact cgctgcgctc	1380
ggtcgttcgg ctgcggcgag cgggtatcagc tcaactcaaag gcggttaatac ggttatccac	1440
agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa	1500
ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcggtttt ccataggctc cgccccctg acgagcatca	1560
caaaaatcga cgctcaagtc agagggtggcg aaacccgaca ggactataaa gataccaggc	1620
gtttccccct ggaagctccc tcgtgcgctc tcctgttccg accctgcgc ttaccggata	1680
cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct catagctcac gctgtaggta	1740
tctcagttcg gtgtaggtcg ttcgctccaa gctgggctgt gtgcacgaac cccccgttca	1800
gcccgaaccgc tgcgccttat ccggttaacta tcgtcttgag tccaaccggg taagacacga	1860
cttatcgcca ctggcagcag ccactggtaa caggattagc agagcgaggt atgtaggcgg	1920
tgctacagag ttcttgaaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagaa cagtatttgg	1980
tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct cttgatccgg	2040
caaacaaacc accgctggta gcggtggttt ttttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag	2100
aaaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctacg ggtctgacg ctcaagtggaa	2160
cgaaaactca cgtaaggga ttttggtcat gggcgcgcct aggccttttgc aaagatcgat	2220
caagagacag gatgaggatc gtttcgcatg attgaacaag atggattgca cgcaggttct	2280
ccggccgctt ggggtgagag gctattcggc tatgactggg cacaacagac aatcggctgc	2340
tctgatgccg ccgtgttccg gctgtcagcg caggggcgcc cggttctttt tgtcaagacc	2400
gacctgtccg gtgccctgaa tgaactgaa gacgaggcag cgcggctatc gtggctggcc	2460
acgacgggcg ttccttgccg agctgtgctc gacgttgtca ctgaagcggg aagggactgg	2520

ctgctattgg gogaagtgcc ggggcaggat ctcctgtcat ctcaccttgc tcctgccgag	2580
aaagtatcca tcatggctga tgcaatgcgg cggtgcata cgcttgatcc ggctacctgc	2640
ccattcgacc accaagcgaa acatcgcatc gagcgagcac gtactcggat ggaagccggt	2700
cttgtcgatc aggatgatct ggacgaagag catcaggggc tcgcgccagc cgaactgttc	2760
gccaggctca aggcgagcat gcccgcggc gaggatctcg tcgtgaccca tggcgatgcc	2820
tgcttgccga atatcatggt ggaaaatggc cgcttttctg gattcatcga ctgtggccgg	2880
ctgggtgtgg cggaccgcta tcaggacata gcgttgcta cccgtgatat tgctgaagag	2940
cttggcggcg aatgggctga ccgcttcctc gtgctttacg gtatcgccgc tcccgattcg	3000
cagcgcatcg cttctatcgc cttcttgac gagttcttct gagcgggact ctggggttcg	3060
aaatgaccga ccaagcgacg cccaacctgc catcacgaga ttctgattcc accgccgcct	3120
tctatgaaag gttgggcttc ggaatcgttt tccgggacgc cggctggatg atcctccagc	3180
gcggggatct catgctggag ttcttcgccc accctaggcg cgctcatgag cggatacata	3240
tttgaatgta tttagaaaaa taaacaaata ggggttccgc gcacatttcc ccgaaaagtg	3300
ccacctaaat tgtaagcgtt aatatTTTgt taaaattcgc gttaaatttt tgttaaataca	3360
gctcattttt taaccaatag gccgaaatcg gcaaaatccc ttataaatca aaagaataga	3420
ccgagatagg gttgagtgtt gttccagttt ggaacaagag tccactatta aagaacgtgg	3480
actccaacgt caaagggcga aaaaccgtct atcagggcga tggcccaacta cgtgaaccat	3540
caccctaatac aagttttttg gggctgaggt gccgtaaagc actaaatcgg aaccctaaag	3600
ggagcccccg atttagagct tgacggggaa agccggcgaa cgtggcgaga aaggaaggga	3660
agaaagcgaa aggagcggc gctagggcgc tggcaagtgt agcggtcacg ctgcgcgtaa	3720
ccaccacacc cgccgcgctt aatgcgcgcg tacagggcgc gtcccattcg ccattcaggc	3780
tgcgcaactg ttgggaaggg cgatcgggtgc gggcctcttc gctattacgc cagctggcga	3840
aagggggatg tgctgcaagg cgattaagtt gggtaacgcc agggttttcc cagtcacgac	3900
gttgtaaaac gacggccagt gagcgcgcgt aatacgactc actatagggc gaattgggta	3960
ccgggcccc cctcgagcag gatctataca ttgaatcaat attggcaatt agccatatta	4020
gtcattgggtt atatagcata aatcaatatt ggctattggc cattgcatac gttgtatcta	4080
tatcataata tgtacattta tattggctca tgtccaatat gaccgccatg ttgacattga	4140
ttattgacta gttattaata gtaatcaatt acgggggtcat tagttcatag cccatatatg	4200
gagttccgcg ttacataact tacggtaaatt ggccgcctg gc	4242

<210> 4
 <211> 4242
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nucleotit của plasmit pLacZMB75.6

<400> 4
 tgaccgcccc acgacccccg ccattgacg tcaataatga cgtatgttcc catagtaacg 60
 ccaatagggg ctttccattg acgtcaatgg gtggagtatt tacggtaaac tgcccacttg 120
 gcagtacatc aagtgtatca tatgccaatg ccgcccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa 180
 tggcccgccg ggcattatgc ccagtacatg accttacggg actttcctac ttggcagtac 240
 atctacgtat tagtcatcgc tattaccatg gtgatgcggg tttggcagta catcaatggg 300
 cgtggatagc ggtttgactc acggggattt ccaagtctcc accccattga cgtcaatggg 360
 agtttgtttt ggcacaaaaa tcaacgggac tttccaaaat gtcgtaacaa ctccgcccc 420
 ttgacgcaaa tgggcggtag gcgtgtacgg tgggaggtct atataagcag agctcgttta 480
 gtgaaccgtc agatcgcttg gagacgccat ccacgtgtt ttgacctcca tagaagacac 540
 cgggaccgat ccagcctccc ctgaagccg atctgataac ggtaccgata agctggcggc 600
 cgattaagct acagaagttg gtcgtgaggc actgggcagg taagtatcaa gggtacaaga 660
 caggtttaag gagaccaata gaaactgggc ttgtcgagac agagaagact cttgcgtttc 720
 tgataggcac ctattggtct tactgacatc cactttgcct ttctctccac aggtgtccac 780
 tcccaggttc aattacagct ctttaagcagc cgccaaaaca aaattcctca aaaatcatca 840
 tcgaatgaat ggtgaaataa tttccctgaa taactgtagt gttttcaggg cgcggcataa 900
 taattaacta tgctcaaaaa ttgtgtacct ttagcttttt aatttgtaaa ggggttaata 960
 aggaatatatt gatgtatagt gccttgacta gagatcataa tcagccatac cacatttgta 1020
 gaggttttac ttgctttaaa aaacctcca cacctcccc tgaacctgaa acataaaatg 1080
 aatgcaattg ttgttgtaaa cttgtttatt gcagcttata atggttacia ataaagcaat 1140
 agcatcacia atttcacaaa taaagcattt ttttactgc attctagttg tggtttgtcc 1200
 aaactcatca atgtatctta tcatgtctgg atcatcagat ctgccggtct ccctatagtg 1260
 agtcgtatta atttcgataa gccagggtta cctgcattaa tgaatcggcc aacgcgcggg 1320
 gagaggcggg ttgcgtattg ggcgctcttc cgcttcctcg ctcaactgact cgetgcgctc 1380
 ggtcgttcgg ctgcggcgag cggtatcagc tcaactcaaag gcggtataac gggtatccac 1440
 agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa 1500

ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc cgccccctg acgagcatca	1560
caaaaatcga cgctcaagtc agaggtggcg aaacccgaca ggactataaa gataccaggc	1620
gtttccccct ggaagctccc tcgtgcgctc tcctgttcog accctgccgc ttaccggata	1680
cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct catagctcac gctgtaggta	1740
tctcagttcg gtgtaggtcg ttcgctccaa gctgggctgt gtgcacgaac cccccgttca	1800
gcccgaaccg tgcgccttat ccggttaacta tcgtcttgag tccaacccgg taagacacga	1860
cttatcgcca ctggcagcag ccactggtaa caggattagc agagcgaggt atgtaggcgg	1920
tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagaa cagtatttgg	1980
tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct cttgatccgg	2040
caaacaaacc accgctggta gcggtggttt ttttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag	2100
aaaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctacg gggctctgacg ctcagtggaa	2160
cgaaaactca cgttaaggga ttttggcat gggcgcgcct aggcctttgc aaagatcgat	2220
caagagacag gatgaggatc gtttcgcagc ttttcattct gactgcaacg ggcaataagt	2280
ctctgtgtgg attaaaaaaa gagtgtctga tagcagcttc tgaactgggt acctgccgtg	2340
agtaaattaa aattttattg acttaggtca ctaaggcgcc ttgcgctgag gttgcgtcgt	2400
gatatcatca gggcagaccg gttacatccc cctaacaagc tgtataaaga gaaatactat	2460
ctcattggcg ttgcccgcac ctgacagtgc gacgttgggc tgcgtccgct gaccaacggt	2520
accgaggtaa cagcccaatc tatccatgat ctcgccagc cggggtcggc cgttatgcag	2580
cccggtcgg gtatgaagcc attaaggagc cgaccagcg cgaccgggcg gccggtcacg	2640
ctgcctctgc tgaagcctgc ctgtcactcc ctgcgcggcg taccgcgct tctcatcgag	2700
taggctccgg atcgcgaccc cggacgggccc ctggggccag gagcggccta tgacaaatgc	2760
cgggtagcga tccggcattc agcattgact gcgcacggat ccagtccttg caggagcctt	2820
atgccgaccg tagcaaaaaa tgagcccgag ccgatcgca gttgtgatcc ggtcccgcg	2880
attgccggtc gcgatgacgg tcctgtgtaa gcgttatcgt taccaattgt ttaagaagta	2940
tatacgctac gaggtacttg ataacttctg cgtagcatac atgaggtttt gtataaaaat	3000
ggcgggcat atcaacgcag tgtcagaaat ccgaaacagt ctgcgggact ctgggggttcg	3060
aaatgaccga ccaagcgacg cccaacctgc catcacgaga ttogattcc accgccgcct	3120
tctatgaaag gttgggcttc ggaatcgttt tccgggacgc cggctggatg atcctccagc	3180
gcggggatct catgctggag ttcttcgccc accctaggcg cgctcatgag cggatacata	3240
tttgaatgta ttagaaaaa taaacaaata ggggttccgc gcacatttcc ccgaaaagtg	3300

ccacctaaat tgtaagcggt aatattttgt taaaattcgc gttaaatttt tgttaaataca 3360
 gtcatttttt taaccaatag gccgaaatcg gcaaaatccc ttataaatca aaagaataga 3420
 ccgagatagg gttgagtgtt gttccagttt ggaacaagag tccactatta aagaacgtgg 3480
 actccaacgt caaagggcga aaaaccgtct atcagggcga tggcccacta cgtgaaccat 3540
 caccctaatac aagttttttg gggtcgaggt gccgtaaagc actaaatcgg aaccctaaag 3600
 ggagcccccg atttagagct tgacggggaa agccggcgaa cgtggcgaga aaggaaggga 3660
 agaaagcgaa aggagcgggc gctagggcgc tggcaagtgt agcggtcacg ctgcgcgtaa 3720
 ccaccacacc cgccgcgctt aatgcgccgc tacagggcgc gtcccattcg ccattcaggc 3780
 tgcgcaactg ttgggaaggc cgatcggtgc gggcctcttc gctattacgc cagctggcga 3840
 aagggggatg tgctgcaagg cgattaagtt gggtaacgcc agggttttcc cagtcacgac 3900
 gttgtaaaac gacggccagt gagcgcgctt aatacgactc actatagggc gaattgggta 3960
 ccgggcccc cctcgaggtc gacgggtatc ataagcttga tatcgaattc ctgcagcccc 4020
 ggggatccac tagttctaga gcggccgcca ccgcggtgga gctccagctt ttgttccctt 4080
 tagtgagggt taattgcgcg cttggcgtaa tcatgggtcat agctgtttcc tgtgtgaaat 4140
 tgttatccgc tcacaattcc acacaacata cgagccggaa gcataaagtg taaagcctgg 4200
 ggtgcctaatac gagtgagcta actcacatta attgcgttgc gc 4242

<210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi

<400> 5
 gtgcgcggaa cccctatttg 20

<210> 6
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi

<400> 6
 gcgtaccgcg cgttctcatc 20

<210> 7

<211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi

 <400> 7
 gtctgacgct cagtggaacg 20

 <210> 8
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi

 <400> 8
 gttccagttt ggaacaagag tc 22

 <210> 9
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi

 <400> 9
 ggcaattagc catattagtc 20

 <210> 10
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi

 <400> 10
 gcagagctcg tttagtgaac cg 22

 <210> 11
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi

 <400> 11
 gatcataatc agccatacca c 21

<210>	12	
<211>	27	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mỗi	
<400>	12	
	cgtcttgagt ccaacccggt aagacac	27
<210>	13	
<211>	24	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mỗi	
<400>	13	
	ccacaggtgt ccactcccag gttc	24
<210>	14	
<211>	21	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mỗi	
<400>	14	
	ctagtcaagg cactatacat c	21
<210>	15	
<211>	22	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mỗi	
<400>	15	
	tccacagaat caggggataa cg	22
<210>	16	
<211>	23	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mỗi	
<400>	16	
	gctcactcat taggcacccc agg	23

<210> 17
<211> 22
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi

<400> 17
cgcgtaatac gactcactat ag

22