



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

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

(11)



1-0033200

(51)⁸ C12N 15/86

(13) B

(21) 1-2018-03765

(22) 30/01/2017

(86) PCT/US2017/015622 30/01/2017

(87) WO 2017/132666 03/08/2017

(30) 62/288,540 29/01/2016 US

(45) 25/09/2022 414

(43) 27/05/2019 374A

(73) 1. Merial, Inc. (US)

3239 Satellite Blvd., Duluth, GA 30096, United States of America

2. GENVEC LLC (US)

910 Clopper Road, Gaithersburg, MD 20878, United States of America.

3. THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA, AS

REPRESENTED BY THE SECRETARY OF HOMELAND SECURITY (US)

Plum Island Animal Disease Center, PO Box 848, Greenport, NY 11944, United States of America

(72) WIDENER, Justin (US); WOODYWARD, Leszlie (US); SIGER, Leonardo (US);

ETTYREDDY, Damodar (US); GALL, Jason (US); MCVEY, Duncan (US);

BURRAGE, Tom (US); BROUGH, Douglas (US).

(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) CHẾ PHẨM SINH MIỄN DỊCH CHỨA VECTƠ VIRUT TÁI TỔ HỢP

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch chứa vectơ virus tái tổ hợp biểu hiện kháng nguyên virus gây bệnh lở mồm long móng (foot and mouth Disease Virus - FMDV), trong đó kháng nguyên FMDV này chứa polypeptit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2, SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.6 hoặc SEQ ID NO.8 hoặc trình tự có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 80% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2, SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.6 hoặc SEQ ID NO.8.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chế phẩm để chống lây nhiễm virus gây bệnh lở mồm long móng (Foot and Mouth Disease Virus - FMDV) ở động vật. Sáng chế cũng đề cập đến được phẩm chứa kháng nguyên FMDV, và kit để dùng với được phẩm này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh lở mồm long móng (Foot-and-mouth disease - FMD) là một trong số các bệnh do virus và lây nhiều nhất ảnh hưởng đến vật nuôi. Bệnh này là bệnh địa phương ở nhiều quốc gia trên thế giới, đặc biệt là ở châu Phi, châu Á và Nam Mỹ. Ngoài ra, sự bùng phát dịch bệnh có thể xảy ra theo chu kỳ. Sự xuất hiện bệnh này ở các quốc gia có thể gây ra hậu quả kinh tế rất trầm trọng do sự giảm năng suất, giảm cân nặng và khả năng sản xuất sữa ở đàn bị nhiễm, và do lệnh cấm vận thương mại được áp đặt đối với các quốc gia này. Các biện pháp được thực hiện đối với bệnh này bao gồm áp dụng nghiêm ngặt sự hạn chế nhập khẩu, kiểm soát vệ sinh và kiểm dịch, tiêu hủy các động vật ốm và các chương trình chủng ngừa bằng cách sử dụng vaccin, như là biện pháp phòng bệnh ở phạm vi quốc gia hoặc vùng, hoặc một cách định kỳ khi sự bùng phát dịch bệnh xảy ra.

FMD được đặc trưng bởi thời gian ủ bệnh ngắn, tính lây nhiễm cao, sự tạo loét trong miệng và trên bàn chân và đôi khi, gây chết các động vật nhỏ. FMD ảnh hưởng đến một số loài động vật, đặc biệt là gia súc, lợn, cừu và dê. Tác nhân gây bệnh này là virus axit ribonucleic (ARN) thuộc giống Aphthovirus thuộc họ *Picornaviridae* (Cooper *et al.*, Intervirology, 1978, 10, 165-180). Hiện nay, đã biết ít nhất bảy typ virus gây bệnh lở mồm long móng (FMDV): typ châu Âu (A, O và C), typ châu Phi (SAT1, SAT2 và SAT3) và typ châu Á (Asia 1). Nhiều phân typ cũng được phân biệt (Kleid *et al.* Science (1981), 214, 1125-1129).

FMDV là virus nhị thập diện trần có đường kính khoảng 25 nm, chứa phân tử ARN sợi đơn được cấu thành từ khoảng 8500 nucleotit, có tính phân cực dương. Phân tử ARN này chứa khung đọc mở (open reading frame - ORF) đơn, mã hóa polyprotein đơn chứa, không kể các thành phần khác, tiền chất vỏ capsit còn được gọi là protein P1 hoặc P88. Protein P1 được myristyl hóa ở đầu tận cùng amino của nó. Trong quá trình trưởng

thành, protein P1 được phân cắt bởi proteaza 3C thành ba protein được gọi là VP0, VP1 và VP3 (hoặc lần lượt là 1AB, 1D và 1C; Belsham G. J., *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 1993, 60, 241-261). Sau đó, trong virion, protein VP0 được phân cắt thành hai protein, VP4 và VP2 (hoặc lần lượt là 1A và 1B). Cơ chế để biến đổi protein VP0 thành VP4 và VP2, và để tạo ra virion trưởng thành chưa được biết. Các protein VP1, VP2 và VP3 có khối lượng phân tử khoảng 26.000 Da, trong khi protein VP4 nhỏ hơn, có khối lượng phân tử khoảng 8.000 Da.

Sự kết hợp đơn giản của các protein vỏ capsit tạo ra protome (đơn phân gốc) hoặc phân tử 5S, mà là thành phần cơ bản của vỏ capsit FMDV. Sau đó, protome này được tạo phức thành pentame để tạo ra phân tử 12S. Virion thu được từ việc tạo vỏ capsit của phân tử ARN hệ gen bằng cách lắp ráp mười hai pentame 12S, từ đó cấu thành hạt 146S. Vỏ capsit của virus cũng có thể được tạo ra mà không có mặt phân tử ARN bên trong nó (dưới đây được gọi là “capsit trống”). Capsit trống còn được gọi là hạt 70S. Việc tạo ra capsit trống có thể xảy ra theo cách tự nhiên trong quá trình sao chép của virus hoặc có thể được sản xuất nhân tạo bằng cách xử lý hóa học.

Một số nghiên cứu đã được thực hiện trên các capsit trống tự nhiên. Đặc biệt, Rowlands et al. (Rowlands et al., *J. Gen. Virol.*, 1975, 26, 227-238) đã chứng minh được rằng các virion của bệnh lở mồm long móng A10 chủ yếu chứa bốn protein VP1, VP2, VP3 và VP4. Để so sánh, các capsit trống tự nhiên (không thu được bằng cách tái tổ hợp nhưng đã tinh chế khỏi môi trường nuôi cấy virus gây bệnh lở mồm long móng A10) về cơ bản chứa protein chưa được phân cắt VP0; các kết quả tương tự với virus gây bệnh lở mồm long móng A-Pando được mô tả bởi Rweyemamu (Rweyemamu et al., *Archives of Virology*, 1979, 59, 69-79). Các capsit trống nhân tạo, thu được sau khi thẩm tách với sự có mặt của Tris-EDTA và sau khi ly tâm, không chứa protein VP4. Các capsit nhân tạo này có tính sinh miễn dịch yếu theo Rowlands et al., và các capsit trống tự nhiên chỉ có tính sinh miễn dịch sau khi xử lý bằng formaldehyt để làm ổn định chúng, tuy vậy đáp ứng kháng thể được gây ra bởi capsit trống tự nhiên ở chuột lang không ổn định, như được nêu bởi tác giả này. Hơn nữa, Rowlands *et al.* và Rweyemamu *et al.* không đồng ý với sự cần thiết phải làm ổn định capsit trống tự nhiên. Đối với Rweyemamu *et al.*, việc không xử lý bằng formaldehyt không gây thiệt hại cho mức độ kháng nguyên của capsit

trống tự nhiên. Khả năng sinh miễn dịch chỉ được đánh giá bởi việc tạo ra kháng thể trung hòa ở chuột lang.

Mức độ biểu hiện của gen mã hóa tiền chất P1 của protein vỏ capsit bởi baculovirut tái tổ hợp trong tế bào côn trùng được so sánh với mức độ biểu hiện của gen mã hóa P1 liên quan đến proteaza 3C trong *E. coli* (Grubman et al., Vaccine, 1993, 11, 825-829; Lewis et al., J. Virol., 1991, 65, 6572-6580). Sự đồng biểu hiện của P1 và 3C trong *E. coli* dẫn đến việc lắp ráp capsit trống 70S. Sản phẩm biểu hiện của hai cấu trúc này tạo ra kháng thể trung hòa ở chuột lang và lợn. Nồng độ chuẩn thu được với cấu trúc P1/baculovirut là thấp. Các sản phẩm biểu hiện giống nhau này tạo ra sự bảo vệ một phần ở lợn. Tuy nhiên, một số lợn đã được bảo vệ khỏi bệnh không được bảo vệ chống sự sao chép của virut gây nhiễm. Tuy nhiên, hệ biểu hiện *E. coli* không myristyl hóa các protein và proteaza 3C là độc với tế bào này. Lewis *et al.* kết luận rằng các câu hỏi cơ bản liên quan đến bản chất của virut và cấu trúc của vỏ capsit cần để đạt được mức độ bảo vệ lớn nhất ở động vật chưa được giải đáp. Hơn thế nữa, Grubman *et al.* tuyên bố rằng cần phải làm ổn định capsit trống trước khi bào chế vaccin; về điểm này, các tác giả đồng ý về vấn đề gặp phải với capsit trống thu được bằng cách tách ra khỏi môi trường nuôi cấy virut (xem trên đây).

Các protein dung hợp chứa một số hoặc tất cả là protein P1 cũng thu được bằng cách sử dụng các vector virut, cụ thể là virut ecpet hoặc virut gây bệnh đậu mùa. Cụ thể, CA-A-2,047,585 mô tả virut ecpet loài bò được sử dụng để sản xuất protein dung hợp chứa trình tự peptit của virut gây bệnh lở mồm long móng (các axit amin 141 đến 158 của P1 gắn kết với các axit amin 200 đến 213 của P1) được dung hợp với glycoprotein gpIII của virut ecpet loài bò này. Vector virut adeno đã được sử dụng để biểu hiện vỏ capsit virut rỗng của FMDV (US 8,323,663). Các vector virut còn được sử dụng để biểu hiện vỏ capsit FMDV rỗng đã được làm ổn định (US 7,531,182, USSN14/863,181).). Gần đây, các thực vật và các tế bào côn trùng đã được khảo sát là nguồn sản xuất kháng nguyên FMDV (US 2011/0236416, USSN14/863,181).

Đã có báo cáo rằng các kháng thể thu được từ mẹ (maternally derived antibodies - MDA) có thể ức chế đáp ứng của bê (gia súc dưới 2 năm tuổi) với sự chủng ngừa chống FMD (Graves, 1963, Journal of Immunology 91:251-256; Brun et al., 1977, Developments in Biological Standardisation, 25:117-122).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến chế phẩm hoặc vaccin chứa vector virus tái tổ hợp biểu hiện polypeptit FMDV và các mảnh và các biến thể của nó. Kháng nguyên FMDV và các mảnh và các biến thể của nó có tính sinh miễn dịch và bảo vệ. Các vector virus tái tổ hợp có thể là các vector virus adeno biểu hiện kháng nguyên FMDV.

Vector virus tái tổ hợp có thể được bào chế thành vaccin và/hoặc dược phẩm. Các vaccin hoặc chế phẩm này có thể được sử dụng để chủng ngừa động vật và tạo ra sự bảo vệ khỏi các chủng FMDV tương đồng và khác loại. Các vaccin hoặc chế phẩm được bào chế với chất mang, tá dược, chất bổ trợ, hoặc chất dẫn được dùng hoặc dùng trong thú y đạt được sự cải thiện về tính bền nhiệt và khả năng đáp ứng với sự thay đổi nhiệt độ.

Sáng chế mô tả phương pháp tăng cường sự bảo vệ ở động vật bình thường và động vật dương tính với kháng thể thu được từ mẹ (dương tính với MDA) khỏi sự nhiễm FMDV. Sáng chế cũng đề cập đến kit bao gồm ít nhất một polypeptit có tính kháng nguyên hoặc mảnh hoặc biến thể của nó và hướng dẫn sử dụng.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Phần mô tả chi tiết sau, được đưa ra để làm ví dụ, nhưng không được dự định giới hạn phạm vi của sáng chế chỉ ở các phương án cụ thể được mô tả, có thể được hiểu tốt nhất kết hợp với các hình vẽ kèm theo, trong đó:

Fig.1 là bảng tóm tắt các trình tự ADN và protein.

Fig.2 thể hiện các gen đối với chủng FMDV A24 và các gen A24 (p1-2AB') được sử dụng trong cấu trúc A24-A12 ghép.

Fig.3 thể hiện các gen đối với chủng FMDV A12 và các gen A12 (3B'/3C) được sử dụng trong cấu trúc A24-A12 ghép.

Fig.4 thể hiện thử nghiệm nhận diện cấu trúc di truyền của vaccin FMDV A24-A12 chứa vector virus adeno tái tổ hợp bằng phương pháp PCR.

Fig.5 thể hiện phương pháp thẩm tách Western của vaccin FMDV A24-A12 chứa vector virus adeno tái tổ hợp.

Fig.6 thể hiện các gen đối với chủng FMDV O1M dùng trong vaccin FMDV O1M chứa vector virus adeno tái tổ hợp.

Fig.7 thể hiện các gen đối với chủng FMDV Irn dùng trong vacxin FMDV Irn chứa vector virus adeno tái tổ hợp.

Fig.8 thể hiện các gen đối với chủng FMDV Asia dùng trong vacxin FMDV Asia chứa vector virus adeno tái tổ hợp.

Fig.9 thể hiện tỷ lệ phần trăm bảo vệ bằng vacxin FMDV typ huyết thanh O với các liều khác nhau.

Fig.10 thể hiện huyết thanh học của vacxin FMDV typ huyết thanh O với các liều khác nhau.

Fig.11 thể hiện hoạt tính diệt virus của FMDV chứa vector virus adeno tái tổ hợp + chất bổ trợ ở nhiệt độ 25°C.

Fig.12 thể hiện hoạt tính diệt virus của FMDV chứa vector virus adeno tái tổ hợp + chất bổ trợ ở nhiệt độ 4°C.

Fig.13 thể hiện trung bình nhân của nồng độ chuẩn FMDV VN.

Fig.14 thể hiện trung bình nhân của nồng độ chuẩn SAV.

Fig.15 thể hiện trung bình nhân của nồng độ chuẩn FMDV VN.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến chế phẩm hoặc vacxin chứa vector virus tái tổ hợp biểu hiện kháng nguyên FMDV gây đáp ứng miễn dịch ở động vật. Các vector virus tái tổ hợp này có thể là các vector virus adeno biểu hiện kháng nguyên FMDV. Vector virus tái tổ hợp biểu hiện kháng nguyên này có thể được bào chế thành vacxin hoặc dược phẩm và được sử dụng để gây ra hoặc kích thích đáp ứng bảo vệ ở động vật. Theo một phương án, kháng nguyên polypeptit là protein cấu trúc FMDV P1 (VP4-VP2-VP3-VP1), protein không cấu trúc P2 (2A, 2B, và 2C) hoặc protein không cấu trúc P3 (3A, 3B, 3C và 3D) hoặc mảnh hoặc biến thể có hoạt tính của chúng.

Đã nhận ra rằng polypeptit có tính kháng nguyên theo sáng chế có thể là polypeptit có chiều dài đầy đủ hoặc các mảnh hoặc các biến thể có hoạt tính của chúng. “Các mảnh có hoạt tính” hoặc “các biến thể có hoạt tính” được dự định rằng các mảnh hoặc các biến thể này giữ được tính kháng nguyên của polypeptit. Do đó, sáng chế bao gồm polypeptit, kháng nguyên, epitop hoặc chất kháng nguyên FMDV bất kỳ gây đáp

ứng miễn dịch ở động vật. Polypeptit, kháng nguyên, epitop hoặc chất kháng nguyên FMDV có thể là polypeptit, kháng nguyên, epitop hoặc chất kháng nguyên FMDV bất kỳ, như, nhưng không chỉ giới hạn ở, protein, peptit hoặc mảnh hoặc biến thể của chúng, mà gây ra, cảm ứng hoặc kích thích đáp ứng ở động vật, như loài cừu, loài bò, loài dê hoặc loài lợn.

Sự kết hợp đơn giản của các protein vỏ capsit tạo ra protome (đơn phân gốc) hoặc phân tử 5S, mà là thành phần cơ bản của vỏ capsit FMDV. Sau đó, protome này được tạo phức thành pentame để tạo ra phân tử 12S. Virion thu được từ việc tạo vỏ capsit của phân tử ARN hệ gen bằng cách lắp ráp mười hai pentame 12S, từ đó cấu thành hạt 146S. Vỏ capsit của virus cũng có thể được tạo ra mà không có mặt phân tử ARN bên trong nó (dưới đây được gọi là “capsit trống”). Capsit trống này còn được gọi là hạt 70S. Việc tạo ra capsit trống có thể xảy ra theo cách tự nhiên trong quá trình sao chép virus hoặc có thể được sản xuất nhân tạo bằng cách xử lý hóa học.

Sáng chế đề cập đến vaccin hoặc chế phẩm dùng cho loài bò, loài cừu, loài dê, hoặc loài lợn có thể chứa kháng nguyên FMDV tái tổ hợp hoặc vector virus tái tổ hợp biểu hiện kháng nguyên FMDV với lượng có hiệu quả, và chất mang, tá dược, chất bổ trợ, hoặc chất dẫn được dùng hoặc dùng trong thú y.

Theo một số phương án, vaccin này còn chứa các chất bổ trợ, như nhũ tương dầu trong nước (oil-in-water - O/W) đã được mô tả trong patent Mỹ số 7,371,395.

Theo các phương án khác, các chất bổ trợ bao gồm nhũ tương TS6, TS7, TS8 và TS9, nhũ tương LR3, LR4 và LR6, nhũ tương LF2, chất bổ trợ CARBIGEN™, chất bổ trợ ENABL®, axit polyacrylic, nhôm hydroxit hoặc nhôm phosphat, saponin, CpG, nhũ tương nước trong dầu, và nhũ tương dầu trong nước, hoặc hỗn hợp của chúng.

Theo một số phương án, đáp ứng ở động vật là đáp ứng miễn dịch bảo vệ.

Thuật ngữ “động vật” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ động vật có vú, gia cầm, và các loài tương tự. Động vật hoặc vật chủ bao gồm động vật có vú và người. Động vật này có thể được chọn từ nhóm bao gồm loài ngựa (ví dụ, ngựa), loài chó (ví dụ, chó, chó sói, cáo, chó sói đồng cỏ, chó rừng), loài mèo (ví dụ, sư tử, hổ, mèo nhà, mèo hoang, mèo lớn khác, và các loài mèo khác bao gồm báo gêpa và mèo rừng), loài cừu (ví dụ, cừu), loài bò (ví dụ, gia súc, bò), loài lợn (ví dụ, lợn), loài dê (ví dụ, dê), loài gia cầm

(ví dụ, gà, vịt, ngỗng, gà tây, chim cú, gà lôi, vịt, chim họ sẻ, điều hâu, quạ, đà điểu châu Phi, đà điểu sa mạc Úc và đà điểu đầu mèo), động vật linh trưởng (ví dụ, bộ bán hâu, phủ hâu, khỉ, vượn, khỉ không đuôi), và cá. Thuật ngữ “động vật” còn bao gồm động vật riêng ở tất cả các giai đoạn phát triển, kể cả các giai đoạn phôi và bào thai.

Trừ khi được giải thích khác, tất cả thuật ngữ kỹ thuật và khoa học dùng trong bản mô tả có nghĩa giống như thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực của sáng chế. Thuật ngữ dạng số ít “một” (“a”, “an”, và “the” trong bản mô tả tiếng Anh) cũng bao gồm cả dạng số nhiều trừ khi ngữ cảnh chỉ rõ khác. Tương tự, từ “hoặc” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ “và” trừ khi ngữ cảnh chỉ rõ khác.

Polypeptit có tính kháng nguyên theo sáng chế có khả năng bảo vệ khỏi FMDV. Tức là, chúng có khả năng kích thích đáp ứng miễn dịch ở động vật. “Kháng nguyên” hoặc “chất kháng nguyên” có nghĩa là chất gây ra đáp ứng miễn dịch đặc hiệu ở động vật chủ. Kháng nguyên này có thể bao gồm sinh vật nguyên vẹn, được làm chết, nhược độc hoặc sống; tiểu đơn vị hoặc một phần của sinh vật; vectơ tái tổ hợp chứa đoạn xen có đặc tính sinh miễn dịch; đoạn hoặc mảnh ADN có khả năng gây ra đáp ứng miễn dịch khi trình diện với động vật chủ; polypeptit, epitop, hapten, hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng. Theo cách khác, chất kháng nguyên hoặc kháng nguyên có thể bao gồm độc tố hoặc kháng độc tố.

Thuật ngữ “protein, polypeptit, hoặc peptit sinh miễn dịch” được sử dụng trong bản mô tả bao gồm các polypeptit có hoạt tính miễn dịch với nghĩa là ngay khi được sử dụng cho vật chủ, nó có thể gây ra đáp ứng miễn dịch kiểu dịch thể và/hoặc tế bào trực tiếp chống lại protein. Theo các phương án, mảnh protein có hoạt tính miễn dịch gần giống như protein toàn phần. Do đó, mảnh protein theo sáng chế có thể bao gồm hoặc về cơ bản được cấu thành từ hoặc được cấu thành từ ít nhất một epitop hoặc quyết định kháng nguyên. Protein hoặc polypeptit “sinh miễn dịch”, được sử dụng trong bản mô tả, bao gồm protein có trình tự với chiều dài đầy đủ, thể tương tự của chúng, hoặc các mảnh sinh miễn dịch của chúng. “Mảnh sinh miễn dịch” có nghĩa là mảnh của protein mà chứa một hoặc nhiều epitop và do đó, gây ra đáp ứng miễn dịch được mô tả trên đây. Các mảnh như vậy có thể được nhận diện bằng cách sử dụng một số kỹ thuật lập bản đồ epitop bất kỳ. Ví dụ, các epitop mạch thẳng có thể được xác định bằng cách, ví dụ, tổng hợp đồng thời một số lượng lớn các peptit trên chất mang rắn, các peptit này tương ứng

với các phần của phân tử protein, và cho các peptit này phản ứng với các kháng thể trong khi các peptit này vẫn được gắn vào chất mang. Các kỹ thuật như vậy là đã biết trong lĩnh vực này và được mô tả trong, ví dụ, patent Mỹ 4,708,871; các bài báo: Geysen *et al.*, 1984, PNAS USA, 81(13): 3998-400; Geysen *et al.*, 1985, PNAS USA, 82(1): 178-82. Tương tự, các epitop cấu hình riêng dễ được nhận diện bằng cách xác định cấu hình trong không gian của các axit amin như bằng, ví dụ, tinh thể học tia x và cộng hưởng từ hạt nhân 2 chiều. Các phương pháp đặc biệt có thể áp dụng được đối với các protein của *T. parva* được mô tả trong PCT/US2004/022605.

Như đã được bàn luận, sáng chế bao gồm các mảnh và các biến thể có hoạt tính của polypeptit có tính kháng nguyên. Do đó, thuật ngữ “protein, polypeptit, hoặc peptit sinh miễn dịch” còn bao gồm sự mất đoạn, thêm đoạn và thay thế vào trình tự, miễn là polypeptit này có chức năng tạo ra đáp ứng miễn dịch như được xác định trong bản mô tả. Thuật ngữ “sự biến đổi bảo thủ” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ sự thay thế gốc axit amin bằng một gốc khác tương tự về mặt sinh học, hoặc sự thay thế nucleotit trong trình tự axit nucleic sao cho gốc axit amin được mã hóa không thay đổi hoặc là một gốc khác tương tự về mặt sinh học. Về mặt này, một số thay thế thường sẽ có bản chất bảo thủ, tức là sự thay thế mà diễn ra trong họ các axit amin. Ví dụ, các axit amin nói chung được chia thành bốn họ: (1) axit--aspartat và glutamat; (2) bazơ--lysin, arginin, histidin; (3) không phân cực--alanin, valin, leuxin, isoleuxin, prolin, phenylalanin, metionin, tryptophan; và (4) phân cực không mang điện--glyxin, asparagin, glutamin, xystin, serin, threonin, tyrosin. Phenylalanin, tryptophan, và tyrosin đôi khi được phân loại là các axit amin thơm. Ví dụ về các biến đổi bảo thủ bao gồm sự thay thế một gốc kỵ nước như isoleuxin, valin, leuxin hoặc metionin cho một gốc kỵ nước khác, hoặc sự thay thế một gốc phân cực cho một gốc phân cực khác, như sự thay thế arginin cho lysin, axit glutamic cho axit aspartic, hoặc glutamin cho asparagin, và các thay thế tương tự; hoặc sự thay thế bảo thủ tương tự của axit amin bằng axit amin liên quan về mặt cấu trúc mà sẽ không ảnh hưởng lớn đến hoạt tính sinh học. Các protein có trình tự axit amin gần giống như phân tử đối chiếu nhưng có sự thay thế axit amin nhỏ mà không ảnh hưởng đáng kể đến khả năng sinh miễn dịch của protein là, do đó, thuộc định nghĩa của polypeptit đối chiếu. Tất cả các polypeptit được tạo ra nhờ các cải biến này được bao gồm trong bản mô tả. Thuật ngữ “sự biến đổi bảo thủ” cũng bao gồm việc sử dụng axit amin được thế thay cho axit

amin gốc không được thể miễn là các kháng thể được sinh ra bởi polypeptit được thể cũng phản ứng miễn dịch với polypeptit không được thể.

Thuật ngữ “epitop” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ vị trí trên kháng nguyên hoặc hapten mà tế bào B và/hoặc tế bào T đặc hiệu đáp ứng với. Thuật ngữ này cũng được sử dụng thay thế cho thuật ngữ “quyết định kháng nguyên” hoặc “vị trí quyết định kháng nguyên”. Các kháng thể mà nhận diện cùng một epitop có thể được xác định trong thử nghiệm miễn dịch đơn giản thể hiện khả năng của một kháng thể phong bế gắn kết của một kháng thể khác với kháng nguyên đích.

“Đáp ứng miễn dịch” với chế phẩm hoặc vacxin là quá trình trong vật chủ có đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào và/hoặc kháng thể với chế phẩm hoặc vacxin cần quan tâm. Thông thường, “đáp ứng miễn dịch” bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, một hoặc nhiều tác động sau: sản sinh kháng thể, tế bào B, tế bào T hỗ trợ, và/hoặc tế bào T độc, hướng đích đặc hiệu đến kháng nguyên hoặc các kháng nguyên được bao gồm trong chế phẩm hoặc vacxin cần quan tâm. Tốt hơn là, vật chủ sẽ biểu hiện đáp ứng miễn dịch trị liệu hoặc bảo vệ sao cho tính kháng với sự nhiễm mới sẽ được tăng cường và/hoặc mức độ nghiêm trọng lâm sàng của bệnh được làm giảm. Sự bảo vệ này sẽ được minh họa bởi việc làm giảm hoặc làm mất các triệu chứng thường được biểu hiện bởi vật chủ bị nhiễm, thời gian hồi phục nhanh hơn và/hoặc hàm lượng virus được giảm trong vật chủ bị nhiễm.

Các kháng nguyên tổng hợp cũng được bao gồm trong định nghĩa này, ví dụ, polyepitop, epitop mạch bên, và các kháng nguyên tái tổ hợp hoặc thu được bằng cách tổng hợp khác. Các mảnh sinh miễn dịch, nhằm các mục đích của sáng chế, thường sẽ có phân tử chứa ít nhất khoảng 3 axit amin, ít nhất khoảng 5 axit amin, ít nhất khoảng 10-15 axit amin, hoặc khoảng 15-25 axit amin hoặc nhiều axit amin hơn. Không có giới hạn trên tối hạn đối với chiều dài của mảnh, có thể bao gồm gần như chiều dài đầy đủ của trình tự protein, hoặc ngay cả protein dung hợp chứa ít nhất một epitop của protein.

Do đó, cấu trúc tối thiểu của polynucleotit biểu hiện epitop là ở chỗ nó bao gồm hoặc về cơ bản được cấu thành từ hoặc được cấu thành từ các nucleotit mã hóa epitop hoặc quyết định kháng nguyên của polypeptit FMDV. Polynucleotit mã hóa mảnh của polypeptit FMDV có thể bao gồm hoặc về cơ bản được cấu thành từ hoặc được cấu thành

từ tối thiểu là 15 nucleotit, khoảng 30-45 nucleotit, khoảng 45-75, hoặc ít nhất 57, 87 hoặc 150 nucleotit liền nhau hoặc liền kề của trình tự mã hóa polypeptit này.

Thuật ngữ “axit nucleic” và “polynucleotit” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ ARN hoặc ADN mà có mạch thẳng hoặc mạch nhánh, sợi đơn hoặc sợi kép, hoặc thể lai của chúng. Thuật ngữ này cũng bao gồm thể lai ARN/ADN. Dưới đây là các ví dụ không nhằm mục đích giới hạn phạm vi của sáng chế về các polynucleotit: gen hoặc mảnh gen, exon, intron, ARN thông tin, ARN vận chuyển, ARN ribosom, ribozym, ADN bổ trợ, polynucleotit tái tổ hợp, polynucleotit mạch nhánh, plasmit, vector, ADN phân lập có trình tự bất kỳ, ARN phân lập có trình tự bất kỳ, mẫu dò và đoạn môi của axit nucleic. Polynucleotit có thể bao gồm các nucleotit được cải biến, như nucleotit được metyl hóa và thể tương tự nucleotit, uraxyl, các đường khác và các nhóm liên kết như floribozơ và thiolat, và các nhánh nucleotit. Trình tự của các nucleotit có thể được cải biến tiếp sau khi polyme hóa, như bằng cách tiếp hợp, với thành phần đánh dấu. Các loại cải biến khác thuộc trong định nghĩa này là gắn mũ, thay thế một hoặc nhiều nucleotit có trong tự nhiên bằng thể tương tự, và đưa bằng cách nào đó để gắn polynucleotit vào các protein, ion kim loại, thành phần đánh dấu, polynucleotit khác hoặc chất mang rắn. Các polynucleotit này có thể thu được bằng cách tổng hợp hóa học hoặc thu được từ vi sinh vật.

Thuật ngữ “gen” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ đoạn polynucleotit bất kỳ liên quan đến chức năng sinh học. Do đó, các gen bao gồm các intron và exon như trong trình tự hệ gen, hoặc chỉ là trình tự mã hóa như trong các ADN bổ trợ và/hoặc trình tự điều hòa cần thiết đối với sự biểu hiện của chúng. Ví dụ, gen cũng được sử dụng trong bản mô tả để chỉ mảnh axit nucleic mà biểu hiện mRNA hoặc ARN chức năng, hoặc mã hóa protein đặc hiệu, và chứa các trình tự điều hòa.

Sáng chế còn bao gồm sợi bổ sung vào polynucleotit mã hóa kháng nguyên, epitop hoặc chất kháng nguyên FMDV. Sợi bổ sung này có thể là polyme và có chiều dài bất kỳ, và có thể chứa các deoxyribonucleotit, các ribonucleotit, và thể tương tự theo tổ hợp bất kỳ.

Thuật ngữ “protein”, “peptit”, “polypeptit” và “mảnh polypeptit” được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả để chỉ các polyme chứa các gốc axit amin có chiều dài bất kỳ. Polyme này có thể có mạch thẳng hoặc mạch nhánh, nó có thể chứa các axit amin được cải biến hoặc các thể tương tự axit amin, và nó có thể bị gián đoạn bởi các gốc hóa

học không phải axit amin. Thuật ngữ này cũng bao gồm polyme axit amin mà được cải biến theo cách tự nhiên hoặc bằng cách can thiệp; ví dụ, tạo ra liên kết disulfua, glycosyl hóa, lipid hóa, axetyl hóa, phosphoryl hóa, hoặc thao tác hoặc cải biến khác bất kỳ, như liên hợp với thành phần đánh dấu hoặc có hoạt tính sinh học.

Thành phần sinh học “được phân lập” (như axit nucleic hoặc protein hoặc bào quan) được sử dụng trong bản mô tả để chỉ thành phần mà đã được tách hoặc làm sạch phần lớn khỏi các thành phần sinh học khác trong tế bào của sinh vật trong đó thành phần này có theo cách tự nhiên, ví dụ, ADN và ARN nhiễm sắc thể và ngoài nhiễm sắc thể khác, protein, và bào quan. Axit nucleic và protein mà đã “được phân lập” bao gồm axit nucleic và protein đã tinh chế bằng các phương pháp làm sạch chuẩn. Thuật ngữ này cũng bao gồm các axit nucleic và các protein được tạo ra bằng công nghệ tái tổ hợp cũng như tổng hợp hóa học.

Thuật ngữ “tinh chế” được sử dụng trong bản mô tả không cần phải sạch tuyệt đối; đúng hơn là, nó được dự định là thuật ngữ tương đối. Do đó, ví dụ, chế phẩm polypeptit đã tinh chế là chế phẩm trong đó polypeptit được làm giàu hơn so với polypeptit ở trong môi trường tự nhiên của nó. Trong một số trường hợp, polypeptit này được tách ra khỏi các thành phần tế bào. “Tinh chế phần lớn” được dự định sao cho polypeptit này thể hiện một số phương án mà các thành phần hoặc các nguyên liệu tế bào đã được loại bỏ ít nhất 60%, ít nhất 70%, ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc ít nhất 98%, hoặc nhiều hơn. Tương tự, polypeptit có thể tinh chế một phần. “Tinh chế một phần” được dự định rằng các thành phần hoặc nguyên liệu tế bào đã được loại bỏ ít hơn 60%. Các định nghĩa tương tự cũng áp dụng cho các polynucleotit. Các polypeptit được bộc lộ trong bản mô tả có thể tinh chế bằng cách bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này.

Như nêu trên, polypeptit có tính kháng nguyên hoặc các mảnh hoặc các biến thể của nó là polypeptit có tính kháng nguyên FMDV mà được sản xuất bởi vectơ virus *in vivo*. Các mảnh và các biến thể của polynucleotit theo sáng chế và polypeptit được mã hóa từ đó cũng thuộc sáng chế. “Mảnh” được dự định là một phần của polynucleotit hoặc một phần của trình tự axit amin có tính kháng nguyên được mã hóa từ đó. Các mảnh của polynucleotit có thể mã hóa các mảnh protein mà giữ được hoạt tính sinh học của protein nguyên thể và vì vậy, có hoạt tính sinh miễn dịch như được nêu ở đâu đó nữa trong bản

mô tả. Các mảnh của trình tự polypeptit giữ được khả năng gây ra đáp ứng miễn dịch bảo vệ ở động vật.

Thuật ngữ “biến thể” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ trình tự gần như tương tự. Đối với polynucleotit, biến thể bao gồm sự làm mất và/hoặc thêm một hoặc nhiều nucleotit ở một hoặc nhiều vị trí trong polynucleotit nguyên thể và/hoặc sự thay thế một hoặc nhiều nucleotit ở một hoặc nhiều vị trí trong polynucleotit nguyên thể. Khi được sử dụng trong bản mô tả, polynucleotit hoặc polypeptit “nguyên thể” lần lượt bao gồm trình tự nucleotit hoặc trình tự axit amin có trong tự nhiên. Các biến thể của polynucleotit cụ thể theo sáng chế (ví dụ, polynucleotit đối chiếu) cũng có thể được đánh giá bằng cách so sánh tỷ lệ phần trăm đồng nhất trình tự giữa polypeptit được mã hóa bởi polynucleotit biến thể và polypeptit được mã hóa bởi polynucleotit đối chiếu. Protein “biến thể” được dự định có nghĩa là protein thu được từ protein nguyên thể bằng cách làm mất hoặc thêm một hoặc nhiều axit amin ở một hoặc nhiều vị trí trong protein nguyên thể và/hoặc thay thế một hoặc nhiều axit amin ở một hoặc nhiều vị trí trong protein nguyên thể. Các protein biến thể được bao gồm trong sáng chế là có hoạt tính sinh học, tức là chúng có khả năng gây ra đáp ứng miễn dịch.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến polypeptit FMDV từ các thể phân lập FMDV từ loài cừu, loài bò, loài dê, hoặc lợn. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến polypeptit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2, 4, 6, hoặc 8, và biến thể hoặc mảnh của nó.

Hơn nữa, các thể tương đồng của polypeptit FMDV từ loài cừu, loài bò, loài dê, hoặc lợn được dự định nằm trong phạm vi của sáng chế. Khi được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “thể tương đồng” bao gồm các thể đồng đẳng, thể tương tự và các thể bản sao. Thuật ngữ “thể tương tự” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ hai polynucleotit hoặc polypeptit mà có chức năng giống hoặc tương tự, nhưng đã được tiến hóa một cách riêng rẽ trong các sinh vật không liên quan. Thuật ngữ “thể đồng đẳng” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ hai polynucleotit hoặc polypeptit từ các loài khác nhau, nhưng đã được tiến hóa từ gen di truyền chung bởi sự hình thành loài. Thông thường, các thể đồng đẳng mã hóa các polypeptit có các chức năng giống hoặc tương tự nhau. Thuật ngữ “thể bản sao” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ hai polynucleotit hoặc polypeptit mà có liên quan nhờ việc nhân đôi trong hệ gen. Các thể bản sao thường có chức năng khác

nhau, nhưng các chức năng này có thể có liên quan. Các thể tương tự, các thể đồng đẳng, và các thể bản sao của polypeptit FMDV kiểu đại có thể khác với polypeptit FMDV kiểu đại bởi sự cải biến sau dịch mã, bởi sự khác biệt trình tự axit amin, hoặc bởi cả hai. Cụ thể, các thể tương đồng theo sáng chế nói chung sẽ có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 80-85%, 85-90%, 90-95%, hoặc 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, so với tất cả hoặc một phần của trình tự polypeptit hoặc polynucleotit FMDV kiểu đại, và sẽ thể hiện chức năng tương tự. Các biến thể bao gồm các biến thể alen. Thuật ngữ “biến thể alen” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ polynucleotit hoặc polypeptit có hiện tượng đa hình mà dẫn đến các thay đổi trong trình tự axit amin của protein và tồn tại trong quần thể tự nhiên (ví dụ, loài hoặc giống virus). Các biến đổi alen tự nhiên này thường có thể dẫn đến sự sai lệch 1- 5% trong polynucleotit hoặc polypeptit. Các biến thể alen có thể được nhận diện bằng cách giải trình tự trình tự axit nucleic cần quan tâm trong một số loài khác nhau, có thể dễ dàng được thực hiện bằng cách sử dụng các mẫu dò lai để nhận diện cùng một locut di truyền gen trong các loài đó. Bất kỳ và tất cả các biến đổi axit nucleic này và hiện tượng đa hình hoặc các biến đổi axit amin thu được mà là kết quả của sự biến đổi alen tự nhiên và không làm thay đổi hoạt tính chức năng của gen cần quan tâm, được dự định nằm trong phạm vi của sáng chế.

Khi được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “dẫn xuất” hoặc “biến thể” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ polypeptit, hoặc axit nucleic mã hóa polypeptit, mà có một hoặc nhiều biến đổi axit amin bảo thủ hoặc cải biến nhỏ khác sao cho (1) polypeptit tương ứng có chức năng gần như tương đương khi so sánh với polypeptit kiểu đại hoặc (2) kháng thể được sinh ra chống lại polypeptit có tính phản ứng miễn dịch với polypeptit kiểu đại. Các biến thể hoặc các dẫn xuất này bao gồm các polypeptit có các cải biến nhỏ trong trình tự axit amin cơ bản của polypeptit FMDV có thể tạo ra các peptit có hoạt tính gần như tương đương so với polypeptit đối tác chưa được biến đổi. Các cải biến này có thể là cố ý, như bằng cách gây đột biến định hướng vị trí, hoặc có thể là tự phát. Thuật ngữ “biến thể” còn dự định bao gồm sự mất đoạn, thêm đoạn và thay thế vào trình tự, với điều kiện là polypeptit này có chức năng tạo ra đáp ứng miễn dịch như được xác định trong bản mô tả.

Thuật ngữ “sự biến đổi bảo thủ” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ sự thay thế gốc axit amin bằng một gốc khác tương tự về mặt sinh học, hoặc sự thay thế nucleotit

trong trình tự axit nucleic sao cho gốc axit amin được mã hóa không thay đổi hoặc là một gốc khác tương tự về mặt sinh học. Về mặt này, sự thay thế được đặc biệt ưu tiên thường sẽ có bản chất bảo thủ, như đã mô tả trên đây.

Các polynucleotit theo sáng chế bao gồm các trình tự mà là suy biến như là kết quả của mã di truyền, ví dụ, việc sử dụng bộ ba mã hóa được tối ưu hóa đối với vật chủ cụ thể. Khi được sử dụng trong bản mô tả, “được tối ưu hóa” dùng để chỉ polynucleotit mà được xử lý kỹ thuật di truyền để làm tăng mức độ biểu hiện của nó ở loài đã định. Để thu được các polynucleotit được tối ưu hóa mã hóa các polypeptit FMDV, trình tự ADN của gen protein FMDV có thể được cải biến để 1) chứa các bộ ba mã hóa được ưu tiên bởi các gen được biểu hiện cao ở loài cụ thể; 2) chứa lượng A+T hoặc G+C trong thành phần bazơ nucleotit mà chủ yếu được tìm thấy trong loài này; 3) tạo ra trình tự khởi đầu của loài này; hoặc 4) làm mất các trình tự mà gây ra sự mất ổn định, sự polyadenyl hóa không thích hợp, sự thoái hóa và sự kết thúc của ARN, hoặc tạo ra cấu trúc kẹp tóc bậc hai hoặc các vị trí ghép ARN. Mức độ biểu hiện tăng của protein FMDV trong các loài này có thể đạt được bằng cách sử dụng tần suất phân bố việc sử dụng bộ ba mã hóa trong sinh vật có nhân điển hình và sinh vật chưa có nhân điển hình, hoặc trong loài cụ thể. Thuật ngữ “tần suất của việc sử dụng bộ ba mã hóa được ưu tiên” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ sự ưu tiên được biểu thị bởi tế bào chủ cụ thể trong việc sử dụng các bộ ba mã hóa nucleotit để quy định axit amin đã định. Có 20 axit amin tự nhiên, hầu hết trong số đó được quy định bởi nhiều hơn một bộ ba mã hóa. Do đó, tất cả các trình tự nucleotit suy biến là được bao gồm trong sáng chế miễn là trình tự axit amin của polypeptit FMDV được mã hóa bởi trình tự nucleotit này không thay đổi về mặt chức năng.

Độ tương đồng trình tự giữa hai trình tự axit amin có thể được thiết lập bởi thuật toán blast từng cặp của NCBI (National Center for Biotechnology Information - Trung tâm thông tin công nghệ sinh học quốc gia) và ma trận blosum62, bằng cách sử dụng các thông số chuẩn (xem, ví dụ, thuật toán BLAST hoặc BLASTX có trên máy chủ của “National Center for Biotechnology Information” (“Trung tâm thông tin công nghệ sinh học quốc gia”) (NCBI, Bethesda, Md., USA).

“Độ tương đồng” đối với các trình tự có thể chỉ số lượng vị trí nucleotit hoặc axit amin giống nhau chia cho số lượng nucleotit hoặc axit amin của trình tự ngắn hơn trong

số hai trình tự trong đó sự bắt cặp của hai trình tự có thể được xác định theo thuật toán Wilbur và Lipman (1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol 80, pp726-730). Độ tương đồng trình tự hoặc mức độ tương đồng trình tự của hai trình tự axit amin, hoặc độ tương đồng trình tự giữa hai trình tự nucleotit có thể được xác định bằng cách sử dụng gói phần mềm Vector NTI (Invitrogen, 1600 Faraday Ave., Carlsbad, CA). Khi trình tự ARN được cho là giống, hoặc có độ tương đồng hoặc tương đồng trình tự với trình tự ADN, thymidin (T) trong trình tự ADN được coi là tương đương với uraxil (U) trong trình tự ARN. Do đó, các trình tự ARN là nằm trong phạm vi của sáng chế và có thể thu được từ trình tự ADN, do thymidin (T) trong trình tự ADN được coi là tương đương với uraxil (U) trong trình tự ARN.

Các phản ứng tạo thể lai có thể được thực hiện dưới các điều kiện “nghiêm ngặt” khác nhau. Xem, ví dụ, “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, 4th edition (Sambrook et al., 2014).

Sáng chế còn bao gồm các polynucleotit FMDV được chứa trong phân tử vector hoặc vector biểu hiện và được liên kết hoạt động với yếu tố khởi động và tùy ý với trình tự tăng cường.

Thuật ngữ “vector” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ plasmit ADN hoặc ARN tái tổ hợp hoặc virus mà chứa polynucleotit khác loại cần phân phối đến tế bào đích, *in vitro* hoặc *in vivo*. Polynucleotit khác loại có thể bao gồm trình tự cần quan tâm nhằm mục đích phòng hoặc điều trị bệnh, và có thể tùy ý ở dạng băng biểu hiện. Khi được sử dụng trong bản mô tả, vector cần phải không có khả năng sao chép trong tế bào hoặc đối tượng đích cuối cùng. Thuật ngữ này bao gồm các vector tách dòng và các vector virus.

Thuật ngữ “tái tổ hợp” có nghĩa là polynucleotit có nguồn gốc bán tổng hợp, hoặc tổng hợp mà không có trong tự nhiên hoặc được liên kết với một polynucleotit khác theo cấu trúc không tìm thấy được trong tự nhiên.

Thuật ngữ “khác loại” có nghĩa là có nguồn gốc từ thực thể khác biệt về mặt di truyền so với phần còn lại của thực thể mà nó được so sánh. Ví dụ, polynucleotit có thể được đưa vào plasmit hoặc vector có nguồn gốc từ nguồn khác bằng kỹ thuật xử lý di truyền, và là polynucleotit khác loại. Trình tự khởi động được tách ra khỏi trình tự mã hóa nguyên thể của nó và được liên kết hoạt động với trình tự mã hóa không phải trình tự nguyên thể là trình tự khởi động khác loại.

Sáng chế đề cập đến vaccin hoặc dược phẩm hoặc chế phẩm miễn dịch dùng cho loài cừu, loài bò, loài dê và lợn có thể chứa kháng nguyên FMDV tái tổ hợp với lượng có hiệu quả và chất mang, chất bổ trợ, tá dược, hoặc chất dẫn được dụng hoặc dùng trong thú y.

Đối tượng được mô tả trong bản mô tả nhằm, một phần, đến chế phẩm và phương pháp liên quan đến kháng nguyên FMDV được tạo ra trong hệ biểu hiện baculovirut/tế bào côn trùng mà có tính sinh miễn dịch cao và bảo vệ động vật khỏi sự nhiễm các chủng FMDV tương đồng và khác loại.

Chế phẩm

Sáng chế đề cập đến vaccin hoặc chế phẩm FMDV có thể chứa kháng nguyên FMDV tái tổ hợp với lượng có hiệu quả và chất mang, tá dược, chất bổ trợ, hoặc chất dẫn được dụng hoặc dùng trong thú y. Theo một phương án, vaccin hoặc chế phẩm FMDV chứa vector virut tái tổ hợp biểu hiện kháng nguyên FMDV.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến vaccin hoặc chế phẩm chứa vector virut biểu hiện kháng nguyên FMDV. Kháng nguyên FMDV thu được bằng cách biểu hiện ADN bổ trợ của các vùng P1 (VP4-VP2-VP3-VP1), 2A/2B'/3B' và 3C, hoặc P1 (VP4-VP2-VP3-VP1), 2A/2B/2C và 3A/3B/3C/3D. Vùng cấu trúc P1 và các vùng không cấu trúc P2 hoặc P3 có thể thu được từ cùng một typ huyết thanh hoặc typ huyết thanh khác (các kháng nguyên ghép) của FMDV.

Sáng chế bao gồm polypeptit, kháng nguyên, epitop hoặc chất kháng nguyên FMDV bất kỳ gây đáp ứng miễn dịch ở động vật, như loài cừu, loài bò, loài dê hoặc lợn. Polypeptit, kháng nguyên, epitop hoặc chất kháng nguyên FMDV có thể là polypeptit, kháng nguyên, epitop hoặc chất kháng nguyên FMDV bất kỳ, như, nhưng không chỉ giới hạn ở, protein, peptit hoặc mảnh của chúng, mà gây ra, cảm ứng hoặc kích thích đáp ứng ở động vật, như loài cừu, loài bò, loài dê hoặc lợn.

Theo một phương án trong đó chế phẩm miễn dịch hoặc vaccin FMDV là chế phẩm miễn dịch hoặc vaccin tái tổ hợp, chế phẩm hoặc vaccin này chứa vector tái tổ hợp và tá dược, chất mang, chất bổ trợ hoặc chất dẫn được dụng hoặc dùng trong thú y; vector tái tổ hợp là vector baculovirut biểu hiện có thể chứa polynucleotit mã hóa polypeptit, kháng nguyên, epitop hoặc chất kháng nguyên FMDV. Polypeptit, kháng nguyên, epitop

hoặc chất kháng nguyên FMDV có thể là VP1, VP2, VP3, VP4, 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C, hoặc 3D, hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng.

Theo một phương án, các polypeptit P1 (VP4-VP2-VP3-VP1)-2A/một phần 2B/một phần 3B và 3C có thể được biểu hiện trong vector virus và sự biểu hiện này có thể được điều hòa bởi một hoặc nhiều trình tự khởi động. Theo một phương án khác, kháng nguyên FMDV có thể là kháng nguyên thể khảm bao gồm kháng nguyên P1 (VP4-VP2-VP3-VP1)-2A-một phần 2B từ FMDV typ huyết thanh A24 và một phần 3B từ FMDV typ huyết thanh A12 và 3C từ FMDV typ huyết thanh A24. Theo một phương án khác, kháng nguyên FMDV có thể là P1 (VP4-VP2-VP3-VP1)-2A-2B-một phần 2C-một phần 3A-3B-3C.

Theo một phương án khác, kháng nguyên FMDV có thể có nguồn gốc từ FMDV O1 Manisa, O1 BFS hoặc Campos, A24 Cruzeiro, A12, Asia 1 Shamir, A Iran'96, Asia/IRN/05, A22 Iraq, SAT2 Saudi Arabia.

Sáng chế đề cập đến vacxin FMDV có thể chứa kháng nguyên FMDV tái tổ hợp hoặc vector virus tái tổ hợp biểu hiện kháng nguyên FMDV với lượng có hiệu quả, và chất mang, tá dược, chất bổ trợ, hoặc chất dẫn được dụng hoặc dùng trong thú y.

Theo một phương án khác, chất mang, tá dược, chất bổ trợ, hoặc chất dẫn được dụng hoặc dùng trong thú y có thể là nhũ tương nước trong dầu. Theo một phương án khác, chất mang, tá dược, chất bổ trợ, hoặc chất dẫn được dụng hoặc dùng trong thú y có thể là nhũ tương dầu trong nước.

Sáng chế còn bao gồm các polynucleotit FMDV được chứa trong phân tử vector hoặc vector biểu hiện và được liên kết hoạt động với yếu tố khởi động và tùy ý với trình tự tăng cường.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến polypeptit FMDV, đặc biệt là polypeptit của loài cừu, loài bò, loài dê hoặc lợn có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2, 4, 6, hoặc 8, và các biến thể hoặc các mảnh của nó.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến polypeptit có độ tương đồng trình tự ít nhất 70%, ít nhất 75%, ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% so với polypeptit có tính kháng nguyên theo sáng chế, cụ thể là với các polypeptit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2, 4, 6, hoặc 8.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến mảnh và các biến thể của polypeptit FMDV được xác định trên đây (SEQ ID NO.2, 4, 6, hoặc 8) có thể dễ dàng được tạo ra bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này bằng cách sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử.

Các biến thể là các polypeptit tương đồng có độ tương đồng trình tự axit amin ít nhất 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% so với trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.2, 4, 6, hoặc 8.

Mảnh sinh miễn dịch của polypeptit FMDV bao gồm ít nhất 8, 10, 15, hoặc 20 axit amin liền nhau, ít nhất 21 axit amin, ít nhất 23 axit amin, ít nhất 25 axit amin, hoặc ít nhất 30 axit amin của polypeptit FMDV có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2, 4, 6, hoặc 8, hoặc các biến thể của chúng. Theo một phương án khác, mảnh của polypeptit FMDV bao gồm epitop có tính kháng nguyên đặc hiệu được tìm thấy trên polypeptit FMDV có chiều dài đầy đủ.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến polynucleotit mã hóa polypeptit FMDV, như polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2, 4, 6, hoặc 8. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến polynucleotit mã hóa polypeptit có độ tương đồng trình tự ít nhất 70%, ít nhất 75%, ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% so với polypeptit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2, 4, 6, hoặc 8, hoặc biến thể bảo thủ, biến thể alen, chất tương đồng hoặc mảnh sinh miễn dịch chứa ít nhất tám hoặc ít nhất mười axit amin liền nhau của một trong số các polypeptit này, hoặc tổ hợp của các polypeptit này.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến polynucleotit có trình tự nucleotit như nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.3, SEQ ID NO.5, hoặc SEQ ID NO.7, hoặc biến thể của nó. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến polynucleotit có độ tương đồng trình tự ít nhất 70%, ít nhất 75%, ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% so với một trong số các polynucleotit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.3, SEQ ID NO.5, hoặc SEQ ID NO.7, hoặc biến thể của nó.

Các polynucleotit theo sáng chế có thể bao gồm các trình tự bổ sung, như các trình tự mã hóa bổ sung trong cùng đơn vị phiên mã, các yếu tố kiểm soát như trình tự khởi động, vị trí gắn kết ribosom, trình tự tăng cường, 5'UTR, 3'UTR, vùng kết thúc phiên

mã, vị trí polyadenyl hóa, đơn vị phiên mã bổ sung dưới sự kiểm soát của cùng trình tự khởi động hoặc trình tự khởi động khác, các trình tự cho phép sự tách dòng, biểu hiện, tái tổ hợp tương đồng, và biến nạp của tế bào chủ, và cấu trúc như vậy bất kỳ như có thể mong muốn để tạo ra các phương án theo sáng chế.

Các yếu tố để biểu hiện polypeptit, kháng nguyên, epitop hoặc chất kháng nguyên FMDV là có mặt một cách có lợi trong vector theo sáng chế. Ở mức độ ít nhất, các vector này bao gồm, về cơ bản được cấu thành từ, hoặc được cấu thành từ bộ ba mã hóa mở đầu (ATG), bộ ba mã hóa kết thúc và trình tự khởi động, và tùy ý còn trình tự polyadenyl hóa đối với các vector nhất định như plasmid và các vector virus nhất định, ví dụ, các vector virus không phải là poxvirus. Khi polynucleotit mã hóa mảnh polypeptit, ví dụ, peptit FMDV, một cách có lợi, trong vector, ATG được đặt ở 5' của khung đọc và bộ ba mã hóa kết thúc được đặt ở 3'. Các yếu tố khác để kiểm soát sự biểu hiện có thể có mặt, như trình tự tăng cường, trình tự làm ổn định, như intron và trình tự tín hiệu cho phép tiết protein.

Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm chứa các vector, như vector biểu hiện, ví dụ, chế phẩm trị liệu. Các chế phẩm này có thể chứa một hoặc nhiều vector, ví dụ, các vector biểu hiện, như các vector biểu hiện *in vivo*, bao gồm và biểu hiện một hoặc nhiều polypeptit, kháng nguyên, epitop hoặc chất kháng nguyên FMDV. Theo một phương án, vector bao gồm và biểu hiện polynucleotit mà bao gồm, về cơ bản được cấu thành từ, hoặc được cấu thành từ polynucleotit mã hóa (và biểu hiện một cách có lợi) kháng nguyên, epitop hoặc chất kháng nguyên FMDV, trong chất mang, tá dược hoặc chất dẫn được dụng hoặc dùng trong thú y. Do đó, theo phương án theo sáng chế, vector hoặc các vector khác trong chế phẩm bao gồm, về cơ bản được cấu thành từ hoặc được cấu thành từ polynucleotit mà mã hóa, và trong các trường hợp thích hợp, vector này biểu hiện một hoặc nhiều protein khác của polypeptit FMDV, kháng nguyên, epitop hoặc chất kháng nguyên, hoặc mảnh của nó.

Theo một phương án khác, vector hoặc các vector trong chế phẩm này bao gồm, hoặc về cơ bản được cấu thành từ, hoặc được cấu thành từ (các) polynucleotit) mã hóa một hoặc nhiều protein hoặc mảnh của chúng của polypeptit, kháng nguyên, epitop hoặc chất kháng nguyên FMDV, vector hoặc các vector biểu hiện (các) polynucleotit này. Theo một phương án khác, chế phẩm này chứa một, hai hoặc nhiều vector bao gồm các polynucleotit mã hóa và biểu hiện, một cách có lợi *in vivo*, polypeptit FMDV, kháng

nguyên, protein dung hợp hoặc epitop của nó. Sáng chế cũng đề cập đến hỗn hợp của các vector mà bao gồm các polynucleotit mã hóa và biểu hiện các polypeptit, kháng nguyên, epitop hoặc chất kháng nguyên FMDV khác nhau, ví dụ, polypeptit, kháng nguyên, epitop hoặc chất kháng nguyên FMDV từ loài động vật khác như, nhưng không chỉ giới hạn ở, loài cừu, loài bò, loài dê hoặc lợn.

Theo một phương án khác, vector biểu hiện là vector plasmit hoặc vector plasmit ADN, đặc biệt là vector biểu hiện *in vivo*. Trong ví dụ cụ thể, không giới hạn phạm vi của sáng chế, plasmit pVR1020 hoặc 1012 (VICAL Inc.; Luke et al., 1997; Hartikka et al., 1996, Hum Gene Ther, 7(10): 1205-17; xem, ví dụ, các patent Mỹ: 5,846,946 và 6,451,769) có thể được sử dụng làm vector để cài xen trình tự polynucleotit. Plasmit pVR1020 có nguồn gốc từ pVR1012 và chứa trình tự tín hiệu tPA của người. Theo một phương án, tín hiệu tPA của người bao gồm từ axit amin M(1) đến axit amin S(23) trong Ngân hàng gen với số hiệu lưu giữ HUMTPA14. Trong một ví dụ cụ thể khác không giới hạn phạm vi của sáng chế, plasmit được sử dụng làm vector để cài xen trình tự polynucleotit có thể chứa trình tự peptit tín hiệu của IGF1 loài ngựa từ axit amin M(24) đến axit amin A(48) trong Ngân hàng gen với số hiệu lưu giữ U28070. Thông tin bổ sung về các plasmit ADN có thể được tham khảo hoặc được sử dụng trong thực tế được tìm thấy trong, ví dụ, các patent Mỹ 6,852,705; 6,818,628; 6,586,412; 6,576,243; 6,558,674; 6,464,984; 6,451,770; 6,376,473; và 6,221,362.

Thuật ngữ “plasmit” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ đơn vị phiên mã ADN bất kỳ chứa polynucleotit theo sáng chế và các yếu tố cần thiết cho sự biểu hiện *in vivo* của nó trong tế bào hoặc các tế bào của vật chủ hoặc đích mong muốn; và, về vấn đề này, lưu ý rằng plasmit siêu xoắn hoặc không siêu xoắn, vòng, cũng như dạng mạch thẳng, được dự định nằm trong phạm vi của sáng chế.

Plasmit có thể bao gồm hoặc chứa hoặc về cơ bản được cấu thành từ, ngoài polynucleotit mã hóa kháng nguyên, epitop hoặc chất kháng nguyên FMDV, tùy ý được dung hợp với trình tự, biến thể, chất tương tự hoặc mảnh peptit khác loại, được liên kết hoạt động với trình tự khởi động hoặc dưới sự kiểm soát của trình tự khởi động hoặc phụ thuộc vào trình tự khởi động. Nói chung, có lợi nếu sử dụng trình tự khởi động mạnh có chức năng trong các tế bào sinh vật có nhân điển hình. Trình tự khởi động mạnh có thể, nhưng không chỉ giới hạn ở, trình tự khởi động cytomegalovirus sớm ngay tức thì (CMV-

IE) có nguồn gốc từ người hoặc chuột, hoặc tùy ý có nguồn gốc khác như chuột cống hoặc chuột lang, trình tự khởi động Super (Ni, M. et al., Plant J. 7, 661-676, 1995.). Trình tự khởi động CMV-IE có thể bao gồm phần trình tự khởi động thực tế, có thể hoặc có thể không được kết hợp với phần trình tự tăng cường. Có thể tham khảo EP-A-260 148, EP-A-323 597, các patent Mỹ: 5,168,062, 5,385,839, và 4,968,615, cũng như đơn PCT số WO87/03905. Theo các phương án, trình tự khởi động CMV-IE là CMV-IE của người (Boshart et al., 1985, Cell, 41(2): 521-30) hoặc CMV-IE của chuột.

Theo thuật ngữ chung hơn, trình tự khởi động có nguồn gốc từ virus, thực vật, hoặc tế bào. Trình tự khởi động mạnh của virus không phải là CMV-IE có thể được sử dụng trong thực hành sáng chế là trình tự khởi động sớm/muộn của virus SV40 hoặc trình tự khởi động LTR của virus sarkom Rous. Trình tự khởi động mạnh của tế bào có thể được sử dụng hữu ích trong thực hành sáng chế là trình tự khởi động của gen của bộ khung tế bào, ví dụ, trình tự khởi động desmin (Kwissa et al., 2000, Vaccine, 18(22): 2337-44), hoặc trình tự khởi động actin (Miyazaki *et al.*, 1989, Gene, 79(2): 269-77).

Các plasmit có thể chứa các yếu tố kiểm soát sự biểu hiện khác. Đặc biệt có lợi nếu kết hợp (các) trình tự làm ổn định, ví dụ, (các) trình tự intron, ví dụ, intron dehydrogenaza của rượu ngô (Callis *et al.* Genes & Dev.1(10):1183-1200, Dec. 1987), intron thứ nhất của hCMV-IE (công bố đơn PCT số WO1989/01036), intron II của gen β -globin của thỏ (van Ooyen et al., 1979, Science, 206(4416): 337-44). Theo một phương án khác, các plasmit có thể chứa 3' UTR. 3' UTR có thể là, nhưng không chỉ giới hạn ở, 3' UTR nopaline syntaza (Nos) của *agrobacterium* (Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. Depicker, A. et al. J. Mol. Appl. Genet., 1982; Bevan, NAR, 1984, 12(22): 8711-8721).

Liên quan đến tín hiệu polyadenyl hóa (polyA) đối với các plasmit và các vector virus không phải là poxvirus, có thể sử dụng thêm tín hiệu poly(A) của gen hormon sinh trưởng của loài bò (bovine growth hormone - bGH) (xem U.S. 5,122,458), hoặc tín hiệu poly(A) của gen β -globin của thỏ hoặc tín hiệu poly(A) của virus SV40.

Thuật ngữ “tế bào của vật chủ” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ tế bào của sinh vật chưa có nhân điển hình hoặc sinh vật có nhân điển hình mà đã được biến đổi di truyền, hoặc có khả năng được biến đổi di truyền bằng cách dùng polynucleotit ngoại

sinh, như plasmid hoặc vector tái tổ hợp. Khi đề cập đến các tế bào được biến đổi di truyền, thuật ngữ này chỉ cả tế bào được biến đổi ban đầu và tế bào thế hệ sau của nó.

Theo một phương án, kháng nguyên FMDV tái tổ hợp được biểu hiện trong tế bào côn trùng.

Phương pháp sử dụng

Theo một phương án, sáng chế mô tả phương pháp chủng ngừa cho loài cừu, loài bò, loài dê, hoặc lợn bao gồm việc cho loài cừu, loài bò, loài dê, hoặc lợn này dùng vaccin có thể chứa vector virus tái tổ hợp biểu hiện kháng nguyên FMDV, với lượng có hiệu quả, và chất mang, tá dược, chất bổ trợ, hoặc chất dẫn được dùng hoặc dùng trong thú y.

Theo một phương án của sáng chế, phương pháp này bao gồm một lần dùng chế phẩm vaccin được bào chế với nhũ tương theo sáng chế. Ví dụ, theo một phương án, chế phẩm miễn dịch hoặc vaccin chứa vector virus tái tổ hợp biểu hiện kháng nguyên FMDV.

Theo một phương án khác của sáng chế, phương pháp này bao gồm một lần dùng hai chế phẩm vaccin khác loại. Các vaccin hoặc chế phẩm khác loại có thể là các loại vaccin khác nhau, như vaccin chứa VLP FMDV hoặc vaccin chứa vector virus FMDV. Các vaccin khác loại cũng có thể là các vaccin cùng loại biểu hiện vỏ capsid thuộc các typ huyết thanh FMDV khác nhau, như các chủng A24, A12, O1 Manisa, Asia hoặc Iraq.

Theo một phương án, sáng chế mô tả phương pháp chủng ngừa cho loài cừu, loài bò, loài dê, hoặc lợn bao gồm việc cho loài cừu, loài bò, loài dê, hoặc lợn này dùng vaccin chứa vector virus tái tổ hợp biểu hiện kháng nguyên FMDV *in vivo*.

Theo một phương án, sáng chế mô tả phương pháp gây đáp ứng miễn dịch bao gồm việc cho loài cừu, loài bò, loài dê, hoặc lợn dùng vaccin chứa vector virus tái tổ hợp biểu hiện kháng nguyên FMDV *in vivo*.

Cả hai chủng FMDV tương đồng và khác loại được sử dụng để gây nhiễm để thử nghiệm hiệu quả của vaccin. Việc dùng có thể là dưới da hoặc trong cơ. Việc dùng có thể không cần dùng kim tiêm (ví dụ Pigjet hoặc Bioject).

Theo một phương án của sáng chế, chế độ chủng ngừa nhắc lại có thể được dùng, chế độ này bao gồm ít nhất một lần dùng cơ bản và ít nhất một lần dùng tăng cường bằng cách sử dụng ít nhất một polypeptit, kháng nguyên, epitop hoặc chất kháng nguyên thông

thường. Chế phẩm miễn dịch hoặc vaccin được sử dụng trong lần dùng cơ bản về bản chất là khác với chế phẩm miễn dịch hoặc vaccin được sử dụng làm chế phẩm tăng cường. Tuy nhiên, lưu ý rằng chế phẩm giống nhau có thể được sử dụng trong lần dùng cơ bản và lần dùng tăng cường. Quy trình dùng này được gọi là “chủng ngừa nhắc lại”.

Chủng ngừa nhắc lại theo sáng chế có thể bao gồm vector virus tái tổ hợp mà được sử dụng để biểu hiện trình tự mã hóa FMDV hoặc mảnh của nó mã hóa polypeptit có tính kháng nguyên hoặc mảnh hoặc biến thể của nó. Đặc biệt, vector virus này có thể biểu hiện gen FMDV hoặc mảnh của nó mà mã hóa polypeptit có tính kháng nguyên. Vector virus được tính đến trong bản mô tả bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, poxvirus [ví dụ, virus gây bệnh đậu mùa hoặc virus gây bệnh đậu mùa đã được làm giảm độc, avipox virus hoặc avipox virus giảm độc (ví dụ, bệnh đậu chim bạch yến, bệnh đậu gà, bệnh đậu chim bồ câu, bệnh đậu chim cu, bệnh đậu chim cun cút, ALVAC, TROVAC; xem ví dụ, các patent Mỹ: 5,505,941 và 5,494,807), virus gây bệnh đậu gấu trúc Mỹ, virus gây bệnh đậu lợn, v.v.], virus adeno (ví dụ, virus adeno người, virus adeno loài chó), virus ecpet (ví dụ, virus ecpet loài chó, virus ecpet gà tây, virus gây bệnh Marek, virus gây bệnh viêm thank-khí quản nhiễm trùng, virus ecpet loài mèo, virus gây bệnh viêm thank-khí quản (laryngotracheitis virus - ILTV), virus ecpet loài bò, virus ecpet lợn), baculovirus, retrovirus, v.v.. Theo một phương án khác, vector biểu hiện avipox có thể là vector bệnh đậu chim bạch yến, như, ALVAC. Theo một phương án khác, vector biểu hiện avipox có thể là vector bệnh đậu gà, như, TROVAC. Kháng nguyên FMDV theo sáng chế cần được biểu hiện được cài xen dưới sự kiểm soát của trình tự khởi động poxvirus đặc hiệu, ví dụ, trình tự khởi động entomopoxvirus *Amsacta moorei* 42 K (Barcena, Lorenzo et al., 2000, J Gen Virol., 81(4): 1073-85), trình tự khởi động bệnh đậu mùa 7,5 kDa (Cochran et al., 1985, J Virol, 54(1): 30-7), trình tự khởi động bệnh đậu mùa I3L (Riviere et al., 1992, J Virol, 66(6): 3424-34), trình tự khởi động bệnh đậu mùa HA (Shida, 1986, Virology, 150(2): 451-62), trình tự khởi động bệnh đậu bò ATI (Funahashi et al., 1988, J Gen Virol, 69 (1): 35-47), trình tự khởi động bệnh đậu mùa H6 (Taylor et al., 1988, Vaccine, 6(6): 504-8; Guo et al., 1989, J Virol, 63(10): 4189-98; Perkus et al., 1989, J Virol, 63(9): 3829-36.), không kể các trình tự khác.

Theo một phương án khác, vector biểu hiện avipox có thể là vector bệnh đậu chim bạch yến, như, ALVAC. Kháng nguyên, epitop hoặc chất kháng nguyên FMDV có thể là

FMDV P1-3C. Vector virus FMDV có thể là virus gây bệnh đậu chim bạch yến như vCP2186, vCP2181, hoặc vCP2176, hoặc virus gây bệnh đậu gà như vFP2215 (xem patent Mỹ 7,527,960). Theo một phương án khác, kháng nguyên, epitop hoặc chất kháng nguyên FMDV có thể được tạo ra trong bào tằm (đơn yêu cầu cấp patent Mỹ 2011/0236416).

Theo một khía cạnh khác về quy trình chủng ngừa nhắc lại theo sáng chế, chế phẩm chứa kháng nguyên FMDV theo sáng chế được dùng, sau đó dùng vaccin hoặc chế phẩm bao gồm vaccin tiểu đơn vị chứa FMDV VLP được biểu hiện bởi baculovirus trong tế bào côn trùng (xem USSN14/863,181), hoặc vaccin hoặc chế phẩm virus bất hoạt chứa kháng nguyên FMDV, hoặc vaccin hoặc chế phẩm plasmid ADN chứa hoặc biểu hiện kháng nguyên FMDV. Tương tự, quy trình chủng ngừa nhắc lại có thể bao gồm việc dùng vaccin hoặc chế phẩm bao gồm vaccin tiểu đơn vị chứa FMDV VLP được biểu hiện bởi baculovirus trong tế bào côn trùng, hoặc vaccin hoặc chế phẩm virus bất hoạt chứa kháng nguyên FMDV, hoặc vaccin hoặc chế phẩm plasmid ADN mà chứa hoặc biểu hiện kháng nguyên FMDV, sau đó dùng chế phẩm chứa kháng nguyên FMDV theo sáng chế. Cũng lưu ý rằng cả lần dùng cơ bản và lần dùng thứ hai có thể bao gồm chế phẩm chứa kháng nguyên FMDV theo sáng chế.

Quy trình chủng ngừa nhắc lại bao gồm ít nhất một lần dùng cơ bản và ít nhất một lần dùng tăng cường bằng cách sử dụng ít nhất một polypeptit thông thường và/hoặc các biến thể hoặc mảnh của chúng. Vaccin được sử dụng trong lần dùng cơ bản có thể khác về bản chất với vaccin được sử dụng làm vaccin nhắc lại sau đó. Lần dùng cơ bản có thể bao gồm một hoặc nhiều lần dùng. Tương tự, lần dùng tăng cường có thể bao gồm một hoặc nhiều lần dùng.

Thể tích liều chế phẩm đối với các loài đích là động vật có vú, ví dụ, thể tích liều chế phẩm dùng cho loài cừu, loài bò, loài dê hoặc lợn, trên cơ sở các vector virus, ví dụ, chế phẩm trên cơ sở vector virus không phải poxvirus, nói chung nằm trong khoảng từ 0,1 đến 5,0mL, nằm trong khoảng từ 0,1 đến 3,0mL, và nằm trong khoảng 0,5mL đến 2,5mL.

Hiệu quả của vaccin có thể được thử nghiệm khoảng 2 đến 4 tuần sau lần gây miễn dịch cuối bằng cách gây nhiễm động vật, như loài cừu, loài bò, loài dê hoặc lợn, bằng chủng FMDV có tính độc, như các chủng FMDV *O1 Manisa*, *O1 BFS* hoặc

Campos, A24 Cruzeiro, A12, Asia I Shamir, A Iran'96, Asia/IRN/05, A22 Iraq, SAT2 Saudi Arabia.

Các chủng khác có thể bao gồm các chủng FMDV A10-61, A5, A12, A24/Cruzeiro, C3/Indaial, O1, C1-Santa Pau, C1-C5, A22/550/Azerbaijan/65, SAT1-SAT3, A, A/TNC/71/94, A/IND/2/68, A/IND/3/77, A/IND/5/68, A/IND/7/82, A/IND/16/82, A/IND/17/77, A/IND/17/82, A/IND/19/76, A/IND/20/82, A/IND/22/82, A/IND/25/81, A/IND/26/82, A/IND/54/79, A/IND/57/79, A/IND/73/79, A/IND/85/79, A/IND/86/79, A/APA/25/84, A/APN/41/84, A/APS/44/05, A/APS/50/05, A/APS/55/05, A/APS/66/05, A/APS/68/05, A/BIM/46/95, A/GUM/33/84, A/ORS/66/84, A/ORS/75/88, A/TNAn/60/947/Asia/1, A/IRN/05, Asia/IRN/05, O/HK/2001, O/UKG/3952/2001, O/UKG/4141/2001, Asia 1/HNK/CHA/05 (số hiệu lưu giữ tại ngân hàng gen EF149010, được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn), Asia I/XJ (Li, ZhiYong *et al.* Chin Sci Bull, 2007), HK/70 (Chin Sci Bull, 2006, 51(17): 2072—2078), O/UKG/7039/2001, O/UKG/9161/2001, O/UKG/7299/2001, O/UKG/4014/2001, O/UKG/4998/2001, O/UKG/9443/2001, O/UKG/5470/2001, O/UKG/5681/2001, O/ES/2001, HKN/2002, O5India, O/BKF/2/92, K/37/84/A, KEN/1/76/A, GAM/51/98/A, A10/Holland, O/KEN/1/91, O/IND49/97, O/IND65/98, O/IND64/98, O/IND48/98, O/IND47/98, O/IND82/97, O/IND81/99, O/IND81/98, O/IND79/97, O/IND78/97, O/IND75/97, O/IND74/97, O/IND70/97, O/IND66/98, O/IND63/97, O/IND61/97, O/IND57/98, O/IND56/98, O/IND55/98, O/IND54/98, O/IND469/98, O/IND465/97, O/IND464/97, O/IND424/97, O/IND423/97, O/IND420/97, O/IND414/97, O/IND411/97, O/IND410/97, O/IND409/97, O/IND407/97, O/IND399/97, O/IND39/97, O/IND391/97, O/IND38/97, O/IND384/97, O/IND380/97, O/IND37/97, O/IND352/97, O/IND33/97, O/IND31/97, O/IND296/97, O/IND23/99, O/IND463/97, O/IND461/97, O/IND427/98, O/IND28/97, O/IND287/99, O/IND285/99, O/IND282/99, O/IND281/97, O/IND27/97, O/IND278/97, O/IND256/99, O/IND249/99, O/IND210/99, O/IND208/99, O/IND207/99, O/IND205/99, O/IND185/99, O/IND175/99, O/IND170/97, O/IND164/99, O/IND160/99, O/IND153/99, O/IND148/99, O/IND146/99, O/SKR/2000, A22/India/17/77.

Chi tiết hơn về các chủng FMDV này có thể được tìm thấy trên trang web về Thông tin tin sinh học châu Âu (European Bioinformatics Information - EMBL-EBI), và

tất cả các trình tự nucleotit liên quan được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn. Các tác giả sáng chế dự định rằng tất cả các chủng FMDV, cả các chủng được liệt kê trong bản mô tả, và các chủng cần nhận diện, có thể được biểu hiện theo hướng dẫn trong sáng chế để tạo ra, ví dụ, chế phẩm vacxin có hiệu quả. Cả hai chủng tương đồng và khác loại được sử dụng để gây nhiễm để thử nghiệm hiệu quả của vacxin. Động vật có thể được gây nhiễm trong da, dưới da, phun xịt trong mũi, trong mắt, trong khí quản, và/hoặc qua đường miệng.

Việc chủng ngừa nhắc lại có thể được thực hiện một cách có lợi cách nhau 1 đến 6 tuần, ví dụ, cách nhau khoảng 3 tuần. Theo một phương án, việc chủng ngừa tăng cường mỗi nửa năm hoặc tăng cường hàng năm, một cách có lợi, bằng cách sử dụng vacxin trên cơ sở vectơ virus, cũng được dự tính. Có lợi nếu các động vật có độ tuổi ít nhất 6 đến 8 tuần tuổi hoặc khoảng 6 tháng tuổi tại thời điểm dùng lần đầu tiên.

Chế phẩm chứa polypeptit có tính kháng nguyên tái tổ hợp theo sáng chế được sử dụng trong quy trình chủng ngừa nhắc lại được chứa trong chất dẫn, chất pha loãng, chất hỗ trợ, hoặc tá dược được dùng hoặc dùng trong thú y. Quy trình theo sáng chế bảo vệ động vật khỏi FMDV loài cừu, loài bò, loài dê hoặc loài lợn và/hoặc phòng tiến triển của bệnh ở động vật bị nhiễm.

Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này cần phải hiểu rằng sáng chế được bộc lộ trong bản mô tả chỉ nhằm mục đích minh họa chứ không giới hạn phạm vi của sáng chế. Từ bộc lộ trong bản mô tả và hiểu biết trong lĩnh vực, người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này có thể xác định số lần dùng, đường dùng, và các liều cần sử dụng cho mỗi quy trình tiêm chủng, mà không cần thử nghiệm quá mức bất kỳ.

Sáng chế dự định ít nhất một lần dùng chế phẩm trị liệu theo sáng chế với lượng có hiệu quả cho động vật. Động vật này có thể là con đực, con cái, con cái có thai và con mới sinh. Việc dùng này có thể thông qua các đường khác nhau bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tiêm trong cơ (IM), trong da (ID) hoặc dưới da (SC) hoặc thông qua đường trong mũi hoặc qua đường miệng. Chế phẩm trị liệu theo sáng chế cũng có thể được sử dụng bằng thiết bị không dùng kim (ví dụ, như bằng thiết bị Pigjet, Dermojet, Biojector, Avijet (Merial, GA, USA), Vetjet hoặc Vitajet (Bioject, Oregon, USA)). Phương pháp khác để dùng chế phẩm plasmit là dùng xung điện (xem, ví dụ, Tollefsen et al., 2002; Tollefsen et al., 2003; Babiuk et al., 2002; công bố đơn PCT số WO99/01158).

Theo một phương án khác, chế phẩm trị liệu này được phân phối trong động vật bằng súng bắn gen hoặc bắn phá hạt vàng.

Theo một phương án, sáng chế mô tả việc dùng sản phẩm với lượng có hiệu quả điều trị bệnh để phân phối và biểu hiện kháng nguyên hoặc epitop FMDV trong tế bào đích. Việc xác định lượng có hiệu quả điều trị bệnh là thử nghiệm thường quy đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Theo một phương án, sản phẩm chứa vector biểu hiện chứa polynucleotit mà biểu hiện kháng nguyên hoặc epitop FMDV và chất mang, chất dẫn hoặc tá dược được dùng hoặc dùng trong thú y. Theo một phương án khác, chất mang, chất dẫn hoặc tá dược được dùng hoặc dùng trong thú y tạo thuận lợi cho việc chuyển nạp hoặc các cách chuyển polynucleotit khác đến động vật chủ và/hoặc cải thiện sự duy trì vector hoặc protein trong vật chủ.

Theo một phương án, sáng chế mô tả phương pháp phát hiện phân biệt giữa các động vật bị nhiễm và các động vật được chủng ngừa (differentiation between infected and vaccinated animals - DIVA).

Sáng chế mô tả việc sử dụng vaccin hoặc chế phẩm theo sáng chế để phát hiện sự nhiễm FMDV ở động vật. Sáng chế mô tả việc sử dụng vaccin hoặc chế phẩm theo sáng chế để phát hiện sự nhiễm ở động vật bằng cách phân biệt giữa các động vật bị nhiễm và các động vật được chủng ngừa (DIVA). Các phương pháp được bộc lộ trong bản mô tả để chẩn đoán tình trạng nhiễm FMDV ở động vật bằng cách sử dụng protein không cấu trúc FMDV (ví dụ, ELISA đặc hiệu 3ABC hoặc 3D FMDV).

Vật phẩm sản xuất

Theo một phương án, đối tượng được bộc lộ trong bản mô tả là kit để thực hiện phương pháp gây hoặc tạo ra đáp ứng miễn dịch có thể bao gồm bất kỳ trong số chế phẩm miễn dịch hoặc vaccin FMDV tái tổ hợp, hoặc chế phẩm miễn dịch hoặc vaccin FMDV bất hoạt, chế phẩm hoặc vaccin virus FMDV tái tổ hợp, và hướng dẫn để thực hiện phương pháp này.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến kit để thực hiện phương pháp gây đáp ứng miễn dịch hoặc bảo vệ chống FMDV ở động vật bao gồm chế phẩm hoặc vaccin chứa kháng nguyên FMDV theo sáng chế và chế phẩm miễn dịch hoặc vaccin virus

FMDV tái tổ hợp, và hướng dẫn để thực hiện phương pháp phân phối một lượng có hiệu quả để gây ra đáp ứng miễn dịch ở động vật.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến kit để thực hiện phương pháp gây đáp ứng miễn dịch hoặc bảo vệ chống FMDV ở động vật bao gồm chế phẩm hoặc vaccin chứa kháng nguyên FMDV theo sáng chế và chế phẩm miễn dịch hoặc vaccin FMDV bất hoạt, và hướng dẫn để thực hiện phương pháp phân phối một lượng có hiệu quả để gây ra đáp ứng miễn dịch ở động vật.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến kit để chủng ngừa nhắc lại theo sáng chế như đã được mô tả trên đây. Kit này có thể bao gồm ít nhất hai lọ: lọ thứ nhất chứa vaccin hoặc chế phẩm để chủng ngừa cơ bản theo sáng chế, và lọ thứ hai chứa vaccin hoặc chế phẩm để chủng ngừa nhắc lại theo sáng chế. Kit này có thể chứa lọ bổ sung thứ nhất hoặc thứ hai để chủng ngừa cơ bản bổ sung hoặc chủng ngừa nhắc lại bổ sung.

Theo một phương án, chế phẩm chứa kháng nguyên FMDV hoặc mảnh hoặc biến thể của nó và chất mang, tá dược, chất bổ trợ, hoặc chất dẫn được đựng hoặc dùng trong thú y được bộc lộ. Theo một phương án khác, chế phẩm chứa vector virus tái tổ hợp biểu hiện kháng nguyên FMDV và chất mang, tá dược, chất bổ trợ, hoặc chất dẫn được đựng hoặc dùng trong thú y được bộc lộ. Theo một phương án khác, chế phẩm được mô tả trên đây trong đó kháng nguyên FMDV hoặc mảnh hoặc biến thể của nó chứa mảnh sinh miễn dịch bao gồm ít nhất 15 axit amin của kháng nguyên FMDV loài cừu, loài bò, loài dê, hoặc lợn được bộc lộ. Theo một phương án, các chế phẩm nêu trên trong đó kháng nguyên FMDV hoặc mảnh hoặc biến thể của nó tinh chế một phần được bộc lộ. Theo một phương án, các chế phẩm nêu trên trong đó kháng nguyên FMDV hoặc mảnh hoặc biến thể của nó tinh chế phần lớn được bộc lộ.

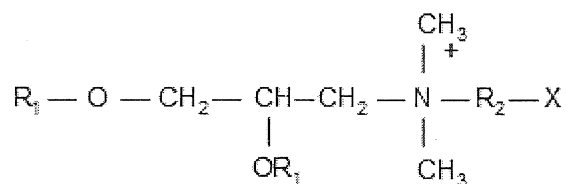
Theo một phương án, các chế phẩm nêu trên trong đó kháng nguyên FMDV hoặc mảnh hoặc biến thể của nó là polypeptit FMDV loài cừu, loài bò, loài dê, hoặc lợn được bộc lộ. Theo một phương án, các chế phẩm nêu trên trong đó polypeptit FMDV là polypeptit P1, polypeptit VP0, polypeptit VP1, polypeptit VP3, polypeptit VP2, polypeptit VP4, polypeptit 2A, polypeptit 2B, polypeptit 2C, polypeptit 3A, polypeptit 3B, polypeptit 3C, hoặc polypeptit 3D được bộc lộ. Theo một phương án, các chế phẩm nêu trên trong đó kháng nguyên FMDV hoặc mảnh hoặc biến thể của nó có độ tương

đồng trình tự ít nhất 80% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2, 4, 6, hoặc 8 được bộc lộ. Theo một phương án, các chế phẩm nêu trên trong đó kháng nguyên FMDV được mã hóa bởi polynucleotit có độ tương đồng trình tự ít nhất 70% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.3, SEQ ID NO.5, hoặc SEQ ID NO.7 được bộc lộ. Theo một phương án, các chế phẩm nêu trên trong đó chất mang, tá dược, chất bổ trợ, hoặc chất dẫn được dung hoặc dùng trong thú y là nhũ tương nước trong dầu hoặc nhũ tương dầu trong nước được bộc lộ. Theo một phương án khác, phương pháp chủng ngừa cho động vật mẫn cảm với FMDV loài cừu, loài bò, loài dê, hoặc lợn bao gồm việc cho động vật này dùng các chế phẩm nêu trên được bộc lộ. Theo một phương án, phương pháp chủng ngừa cho động vật mẫn cảm với FMDV loài cừu, loài bò, loài dê, hoặc lợn bao gồm chế độ chủng ngừa nhắc lại được bộc lộ. Theo một phương án, polypeptit có tính kháng nguyên đã tinh chế phần lớn được biểu hiện trong tế bào côn trùng, trong đó polypeptit này bao gồm: trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất 80% so với polypeptit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2, 4, 6, hoặc 8 được bộc lộ. Trong phương án bất kỳ, tốt hơn là động vật này là loài cừu, loài bò, lợn, hoặc loài dê. Theo một phương án, phương pháp chẩn đoán nhiễm FMDV ở động vật được bộc lộ. Theo một phương án khác, kit để chủng ngừa nhắc lại bao gồm ít nhất hai lọ, trong đó lọ thứ nhất chứa chế phẩm chứa kháng nguyên FMDV hoặc mảnh hoặc biến thể của nó, và lọ thứ hai chứa vector virut tái tổ hợp mà chứa hoặc biểu hiện kháng nguyên FMDV được bộc lộ.

Các chất mang hoặc chất dẫn hoặc chất bổ trợ hoặc tá dược được dung hoặc dùng trong thú y là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Ví dụ, chất mang hoặc chất dẫn hoặc tá dược được dung hoặc dùng trong thú y có thể là dung dịch NaCl 0,9% (ví dụ, nước muối sinh lý) hoặc dung dịch đệm phosphat. Chất mang hoặc chất dẫn hoặc tá dược được dung hoặc dùng trong thú y khác có thể được sử dụng trong các phương pháp theo sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn ở, poly-(L-glutamat) hoặc polyvinylpyrrolidon. Chất mang hoặc chất dẫn hoặc chất bổ trợ hoặc tá dược được dung hoặc dùng trong thú y có thể là hợp chất bất kỳ hoặc tổ hợp các hợp chất tạo thuận lợi cho việc dùng vector (hoặc protein được biểu hiện từ vector theo sáng chế *in vitro*); một cách có lợi, chất mang, chất dẫn hoặc tá dược này có thể tạo thuận lợi cho việc chuyển nạp và/hoặc cải thiện việc duy trì vector (hoặc protein). Các liều và thể tích liều được bàn luận trong bản mô tả trong phần mô tả chung và cũng có thể được xác định bởi người có

trình độ trung bình trong lĩnh vực này từ việc đọc bản mô tả kết hợp với hiểu biết trong lĩnh vực, mà không cần thử nghiệm quá mức bất kỳ.

Các lipid cation chứa muối amoni bậc bốn mà thích hợp một cách có lợi nhưng không chuyên biệt đối với các plasmit, có lợi là các lipid có công thức sau:



trong đó R₁ là gốc béo mạch thẳng no hoặc không no có 12 đến 18 nguyên tử cacbon, R₂ là một gốc béo khác chứa 2 hoặc 3 nguyên tử cacbon và X là nhóm amin hoặc hydroxyl, ví dụ, DMRIE. Theo một phương án khác, lipid cation có thể được kết hợp với lipid trung hòa, ví dụ, DOPE.

Trong số các lipid cation này, ưu tiên đối với DMRIE (N-(2-hydroxyetyl)-N,N-dimetyl-2,3-bis(tetradecyloxy)-1-propan amoni; WO96/34109), được kết hợp một cách có lợi với lipid trung hòa, có lợi là DOPE (dioleoyl-phosphatidyl-ethanol amin; Behr, 1994), để tạo ra DMRIE-DOPE.

Một cách có lợi, hỗn hợp plasmit với chất bổ trợ được tạo ra ngay lúc dùng và một cách thuận lợi đồng thời với việc dùng chế phẩm hoặc ngay trước khi dùng chế phẩm; ví dụ, ngay trước hoặc trước khi dùng, hỗn hợp plasmit-chất bổ trợ được tạo ra, một cách thuận lợi sao cho có đủ thời gian trước việc dùng để hỗn hợp tạo thành phức hợp, ví dụ, nằm khoảng từ 10 đến 60 phút trước khi dùng, như khoảng 30 phút trước khi dùng.

Khi DOPE có mặt, tỷ lệ mol DMRIE:DOPE nằm trong khoảng từ khoảng 95: khoảng 5 đến khoảng 5: khoảng 95, có lợi hơn nếu bằng khoảng 1: khoảng 1, ví dụ, 1:1.

Tỷ lệ khối lượng chất bổ trợ DMRIE hoặc DMRIE-DOPE:plasmit có thể nằm trong khoảng từ khoảng 50: khoảng 1 đến khoảng 1: khoảng 10, như nằm trong khoảng từ khoảng 10: khoảng 1 đến khoảng 1: khoảng 5, và nằm trong khoảng từ khoảng 1: khoảng 1 đến khoảng 1: khoảng 2, ví dụ, nằm trong khoảng từ 1:1 đến 1:2.

Theo một phương án khác, chất mang, tá dược, chất bổ trợ, hoặc chất dẫn được dùng hoặc dùng trong thú y có thể là nhũ tương nước trong dầu. Các ví dụ về nhũ tương

nước trong dầu thích hợp bao gồm nhũ tương vacxin nước trong dầu trên cơ sở dầu mà ổn định và lỏng ở nhiệt độ 4°C chứa: pha nước chứa kháng nguyên với lượng nằm trong khoảng từ 6 đến 50% thể tích/thể tích (thể tích/thể tích), tốt hơn là nằm trong khoảng từ 12 đến 25% thể tích/thể tích, nằm trong khoảng từ 50 đến 94% thể tích/thể tích của pha dầu chứa toàn bộ hoặc một phần dầu không chuyển hóa (ví dụ, dầu khoáng như dầu parafin) và/hoặc dầu dễ chuyển hóa (ví dụ, dầu thực vật, hoặc axit béo, rượu polyhydric hoặc rượu este), các chất hoạt động bề mặt với lượng nằm trong khoảng từ 0,2 đến 20% p/v, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 3 đến 8% p/v, chất hoạt động bề mặt này có mặt, toàn bộ hoặc một phần, hoặc trong hỗn hợp mỗi polyglyxerol este, các polyglyxerol este này tốt hơn là polyglyxerol (poly)ricinoleat, hoặc dầu polyoxyetylen ricin hoặc dầu polyoxyetylen ricin được hydro hóa. Các ví dụ về các chất hoạt động bề mặt có thể được sử dụng trong nhũ tương nước trong dầu bao gồm sorbitan este được etoxyl hóa (ví dụ, polyoxyetylen (20) sorbitan monooleat (TWEEN 80®), có thể mua được từ AppliChem, Inc., Cheshire, CT) và sorbitan este (ví dụ, sorbitan monooleat (SPAN 80®), có thể mua được từ Sigma Aldrich, St. Louis, MO). Ngoài ra, đối với nhũ tương nước trong dầu, cũng xem patent Mỹ 6,919,084, ví dụ, ví dụ 8 của nó, được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn. Theo một số phương án, pha nước chứa kháng nguyên bao gồm dung dịch nước muối chứa một hoặc nhiều chất đệm. Ví dụ về dung dịch đệm thích hợp là dung dịch muối đệm phosphat. Theo phương án thực hiện ưu tiên, nhũ tương nước trong dầu có thể là nhũ tương ba thành phần nước/dầu/nước (W/O/W) (patent Mỹ 6,358,500). Các ví dụ về nhũ tương thích hợp khác được mô tả trong patent Mỹ 7,371,395.

Các chế phẩm miễn dịch và vacxin theo sáng chế có thể chứa hoặc về cơ bản bao gồm một hoặc nhiều chất bổ trợ. Các chất bổ trợ thích hợp để sử dụng trong thực hành sáng chế là (1) các polyme của axit acrylic hoặc metacrylic, anhydrit maleic và các polyme dẫn xuất alkenyl, (2) các trình tự kích thích miễn dịch (immunostimulating sequence - ISS), như trình tự oligodeoxyribonucleotit có một hoặc nhiều đơn vị CpG không được metyl hóa (Klinman et al., 1996, PNAS USA, 93(7): 2879-83; WO98/16247), (3) nhũ tương dầu trong nước, như nhũ tương SPT được mô tả ở trang 147 của tài liệu "Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach" được công bố bởi M. Powell, M. Newman, Plenum Press 1995, 6: 147, 183, và nhũ tương MF59 được mô tả ở trang 183 của cùng tài liệu này, (4) lipid cation chứa muối amoni bậc bốn, ví dụ, DDA (5) xytokin, (6) nhôm hydroxit hoặc nhôm phosphat, (7) saponin hoặc (8) các chất

bổ trợ khác được bàn luận trong tài liệu bất kỳ được trích dẫn và được kết hợp bằng cách viện dẫn vào bản mô tả này, hoặc (9) tổ hợp hoặc hỗn hợp bất kỳ của các chất này.

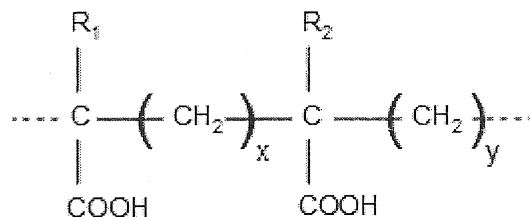
Nhũ tương dầu trong nước (3), mà đặc biệt thích hợp đối với các vectơ virut, có thể trên cơ sở: dầu parafin lỏng nhẹ (loại được điển châu Âu), dầu isoprenoid như squalan, squalen, dầu thu được từ quá trình polyme hóa ở mức thấp của các alken, ví dụ, isobuten hoặc dextrin, este của các axit hoặc rượu có nhóm alkyl mạch thẳng, như dầu thực vật, etyl oleat, propylen glycol, di(caprylat/caprat), glyxerol tri(caprylat/caprat) và propylen glycol dioleat, hoặc este của các rượu hoặc axit béo mạch nhánh, đặc biệt là este của axit isostearic.

Dầu được sử dụng kết hợp với các chất nhũ hóa để tạo ra nhũ tương. Các chất nhũ hóa có thể là các chất hoạt động bề mặt không ion hóa, như: este của một mặt là sorbitan, mannide (ví dụ, anhydromannitol oleat), glyxerol, polyglyxerol hoặc propylen glycol và mặt khác là các axit oleic, isostearic, ricinoleic hoặc hydroxystearic, các este này tùy ý được etoxyl hóa, hoặc các khối copolyme polyoxypropylen-polyoxyetylen, như Pluronic, ví dụ, L121.

Trong số các chất bổ trợ polyme loại (1), ưu tiên các polyme của axit acrylic hoặc metacrylic được liên kết chéo, đặc biệt là được liên kết chéo bởi các polyalkenyl ete của đường hoặc rượu đa chức. Các hợp chất này là đã biết dưới tên carbome (Pharmeuropa, vol. 8, no. 2, June 1996). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cũng có thể đề cập đến patent Mỹ 2,909,462, mà có đề cập đến polyme acrylic này được liên kết chéo bởi hợp chất polyhydroxyl có ít nhất ba nhóm hydroxyl, tốt hơn là không quá tám nhóm này, các nguyên tử hydro ít nhất ba nhóm hydroxyl được thay thế bằng các gốc béo, không no có ít nhất hai nguyên tử cacbon. Các gốc được ưu tiên là các gốc chứa 2 đến 4 nguyên tử cacbon, ví dụ, các vinyl, allyl và các nhóm không no chứa etylen khác. Các gốc không no này cũng có thể chứa các phần tử thế khác, như methyl. Các sản phẩm được bán dưới tên CARBOPOL® (BF Goodrich, Ohio, USA) là đặc biệt thích hợp. Chúng được liên kết chéo bởi allyl sacaroza hoặc bởi allyl pentaerythritol. Trong số chúng, có thể kể đến CARBOPOL® 1974P, 934P và 971P.

Liên quan đến copolyme dẫn xuất anhydrit maleic-alkenyl, ưu tiên EMA® (Monsanto), mà là copolyme etylen-anhydrit maleic mạch thẳng hoặc được liên kết chéo và chúng, ví dụ, được liên kết chéo bởi divinyl ete.

Liên quan đến cấu trúc, tốt hơn là các polyme axit acrylic hoặc metacrylic và EMA[®] được tạo ra bởi các đơn vị cơ bản có công thức sau:



trong đó:

-R₁ và R₂, có thể giống hoặc khác nhau, là H hoặc CH₃

-x = 0 hoặc 1, tốt hơn nếu x = 1

-y = 1 hoặc 2, với x + y = 2.

Đối với EMA[®], x = 0 và y = 2 và đối với carbome x = y = 1.

Các polyme này hòa tan được trong nước hoặc dung dịch nước muối sinh lý (20 g/l NaCl) và độ pH có thể được điều chỉnh đến khoảng từ 7,3 đến 7,4, ví dụ, bằng nước soda (NaOH), để thu được dung dịch chất bổ trợ trong đó (các) vectơ biểu hiện có thể được kết hợp vào. Nồng độ polyme trong chế phẩm miễn dịch hoặc vacxin cuối có thể nằm trong khoảng từ 0,01 đến 1,5% khối lượng/thể tích (khối lượng/thể tích), nằm trong khoảng từ 0,05 đến 1% khối lượng/thể tích, và nằm trong khoảng từ 0,1 đến 0,4% khối lượng/thể tích.

Xytokin hoặc các xytokin (5) có thể ở dạng protein trong chế phẩm miễn dịch hoặc vacxin, hoặc có thể được đồng biểu hiện trong vật chủ với chất kháng nguyên hoặc kháng nguyên hoặc (các) epitop của chúng. Ưu tiên sự đồng biểu hiện của xytokin hoặc các xytokin, bởi cùng vectơ mà biểu hiện chất kháng nguyên hoặc kháng nguyên hoặc (các) epitop của chúng, hoặc bởi vectơ riêng rẽ của nó.

Sáng chế bao gồm việc tạo ra các chế phẩm kết hợp này; ví dụ, bằng cách trộn các hoạt chất, một cách có lợi cùng nhau và với chất bổ trợ, chất mang, xytokin, và/hoặc chất pha loãng.

Các xytokin có thể được sử dụng theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, yếu tố kích thích tạo bạch cầu hạt (granulocyte colony stimulating factor - G-CSF), yếu tố kích thích tạo bạch cầu hạt/đại thực bào (granulocyte/macrophage colony

stimulating factor - GM-CSF), interferon α (IFN α), interferon β (IFN β), interferon γ , (IFN γ), interleukin-1 α (IL-1 α), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-2 (IL-2), interleukin-3 (IL-3), interleukin-4 (IL-4), interleukin-5 (IL-5), interleukin-6 (IL-6), interleukin-7 (IL-7), interleukin-8 (IL-8), interleukin-9 (IL-9), interleukin-10 (IL-10), interleukin-11 (IL-11), interleukin-12 (IL-12), yếu tố hoại tử khối u α (tumor necrosis factor α - TNF α), yếu tố hoại tử khối u β (tumor necrosis factor β - TNF β), axit polyinosinic và polycytidylic, cytidin-phosphat-guanosin oligodeoxynucleotit (CpG ODN), và yếu tố sinh trưởng biến nạp β (transforming growth factor β - TGF β). Cần phải hiểu rằng các xytokin có thể được sử dụng phối hợp và/hoặc được sử dụng lần lượt với chế phẩm miễn dịch hoặc vaccin theo sáng chế. Do đó, ví dụ, vaccin theo sáng chế cũng có thể chứa phân tử axit nucleic ngoại sinh mà biểu hiện *in vivo* xytokin thích hợp, ví dụ, xytokin tương hợp với vật chủ cần được chủng ngừa hoặc trong đó đáp ứng miễn dịch cần được tạo ra (ví dụ, xytokin loài bò đối với các chế phẩm cần được sử dụng cho loài bò).

Theo một phương án cụ thể, chất bổ trợ có thể bao gồm nhũ tương TS6, TS7, TS8 và TS9 (patent Mỹ số 7,371,395); LR3 và LR4 (US7,691,368); TSAP (đơn sáng chế Mỹ 20110129494); TRIGENTTM (Newport Labs); dsARN (ARN sợi kép) tổng hợp (ví dụ, poly-IC, poly-ICLC [HILTONOL[®]]); chất bổ trợ CARBIGENTM (MVP Laboratories, Inc.); chất bổ trợ ENABL[®] (VaxLiant); và chất bổ trợ MONTANIDETM (W/O, W/O/W, O/W, IMS và Gel) (SEPPIC). Nồng độ chất bổ trợ trong chế phẩm miễn dịch hoặc chế phẩm vaccin cuối có thể nằm trong khoảng từ 5% đến 80% thể tích/thể tích.

Trong trường hợp chế phẩm miễn dịch và/hoặc vaccin trên cơ sở polypeptit được biểu hiện bởi baculovirut/tế bào côn trùng, liều có thể bao gồm, khoảng từ 1 μ g đến 2000 μ g, khoảng từ 50 μ g đến 1000 μ g, và khoảng từ 100 μ g đến 500 μ g kháng nguyên, epitop hoặc chất kháng nguyên FMDV. Liều này có thể bao gồm khoảng từ 10^2 đến 10^{20} , khoảng từ 10^3 đến 10^{18} , khoảng từ 10^4 đến 10^{16} , khoảng từ 10^5 đến 10^{12} VLP (hạt giống virut). Trong trường hợp chế phẩm miễn dịch và/hoặc vaccin trên cơ sở vectơ virut biểu hiện kháng nguyên FMDV, liều có thể bao gồm, khoảng từ 10^3 hạt virut đến 10^{15} hạt virut, khoảng từ 10^3 hạt virut đến 10^{14} hạt virut, khoảng từ 10^3 hạt virut đến 10^{13} hạt virut, khoảng từ 10^3 hạt virut đến 10^{12} hạt virut. Các hạt virut có thể được tính dựa trên phương pháp chuẩn độ virut bất kỳ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, FFA (Focus Forming Assay - thử nghiệm tạo cụm) hoặc FFU (Focus Forming Unit - đơn vị tạo cụm), TCID₅₀

(liều lây nhiễm 50% môi trường nuôi cấy mô), PFU (Plaque Forming Unit - đơn vị tạo mảng), và FAID₅₀ (liều nhiễm 50% kháng thể huỳnh quang). Thể tích liều có thể nằm trong khoảng từ 0,1 đến 10mL, nằm trong khoảng từ 0,2 đến 5mL.

Dưới đây sáng chế sẽ được mô tả thêm bằng các ví dụ không nhằm mục đích giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Việc tạo cấu trúc của các đoạn xen ADN, các plasmit và các vector virus tái tổ hợp được thực hiện bằng cách sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử chuẩn được mô tả bởi J. Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4th edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 2014).

Ví dụ 1: Tạo cấu trúc kháng nguyên FMDV chứa vector virus adeno 5 tái tổ hợp của người

Ví dụ 1.1: Tạo cấu trúc kháng nguyên A24-A12 thể khả FMDV chứa vector virus adeno 5 tái tổ hợp của người

Vector *Human Adenovirus C*, typ huyết thanh 5 (Ad5) (vector virus adeno) với sự mất đoạn trong các vùng E1, E3, và E4 của hệ gen (khung GV11, xem patent Mỹ 8,323,663) được sử dụng để tạo cấu trúc vacxin FMDV tái tổ hợp biểu hiện protein FMDV thể khả. Protein FMDV thể khả chứa gen vỏ capsit cấu trúc của FMDV typ huyết thanh A24 (A24 P1) và các gen không cấu trúc A24 (2A-một phần 2B), gen một phần 3B không cấu trúc và gen proteaza của FMDV typ huyết thanh A12 (một phần 3B-C3) (SEQ ID NO.2).

Polynucleotit thể khả mã hóa FMDV A24 (P1-2A-một phần 2B)-A12 (một phần 3B-3C) được đưa vào plasmit vận chuyển (xem các Fig.2 và 3). Sau khi đồng biến nạp plasmit khung GV11 được tạo mạch thẳng (mà mang gen kháng kanamycin) và plasmit vận chuyển được tạo mạch thẳng chứa polynucleotit FMDV thể khả vào trong các tế bào *E. coli* BJDE3, các dòng vô tính kháng kanamycin của *E. coli* được chọn. Các dòng vô tính mang các plasmit tái tổ hợp được xác nhận bằng RFLP. Một dòng vô tính được chọn, plasmit được tạo mạch thẳng và được chuyển nạp vào trong các tế bào M2A. Dịch tan từ sự chuyển nạp tế bào M2A được cấy truyền nối tiếp để tạo ra dung dịch gốc có nồng độ cao của vacxin FMDV thể khả chứa vector virus adeno tái tổ hợp.

Vị trí cài xen gen cho là nằm giữa trình tự khởi động CMV và SV40 PolyA của băng biểu hiện Ad5 E1, và băng biểu hiện này được cài xen vào trong BBA ở vùng E1. Băng biểu hiện A24-A12, nằm ở mỗi nối mất đoạn vùng E 1, đọc từ phải sang trái đối với sự phiên mã ARN hệ gen của virus. Không có tín hiệu điều hòa đã biết trong trình tự nucleotit mạch bên của băng cài xen. Trình tự tăng cường/trình tự khởi động CMV kiểm soát sự khởi đầu của quá trình phiên mã. Trong trình tự này là hộp CAAT trình tự tăng cường của virus, hộp TATA, vị trí khởi đầu phiên mã, và các trình tự vị trí ghép 5'.

Các trình tự CMV được nối tiếp bởi vùng không được dịch mã (untranslated region - UTR) nhân tạo chứa trình tự cho ghép vào. Khung đọc mở của gen cần được biểu hiện tiếp theo các trình tự vị trí ghép 3' và tín hiệu polyadenyl hóa sớm của virus 40 ở khỉ (Simian Virus 40 - SV40) được định vị 3' của khung đọc mở để kết thúc quá trình phiên mã.

Các cặp đoạn nối được thiết kế cho thử nghiệm nhận diện cấu trúc di truyền (Genetic Structural Identity - GSI) RBA. Thử nghiệm GSI sử dụng PCR để nhận diện chất sinh học khung và băng biểu hiện. Thẩm tách GSI (xem Fig.4) thể hiện khung chính xác và băng biểu hiện FMDV A24-A12. Việc phân tích trình tự của băng biểu hiện A24-A12 còn xác nhận độ đồng nhất trình tự nucleotit giữa plasmit vận chuyển và ADN được tách chiết từ vacxin FMDV A24-A12 thể khả chứa vector virus adeno tái tổ hợp.

Vacxin FMDV A24-A12 thể khả chứa vector virus adeno tái tổ hợp được xác nhận là biểu hiện protein A24 *in vitro* trong các tế bào 293 bằng thử nghiệm thẩm tách Western, thu được protein phản ứng mà được di chuyển đến vị trí có khối lượng phân tử xấp xỉ 28 KDa (xem Fig.5). Kháng thể được sử dụng để phát hiện trong thử nghiệm thẩm tách Western là kháng thể đơn dòng. Khối lượng phân tử của protein A24 được biểu hiện từ vacxin FMDV A24-A12 thể khả chứa vector virus adeno tái tổ hợp không thể phân biệt được với khối lượng phân tử thu được sau khi chuyển nạp plasmit vận chuyển đối chứng dương vào trong các tế bào 293 (xem Fig.5).

Ví dụ 1.1: Tạo cấu trúc kháng nguyên FMDV O1M chứa vector virus adeno 5 tái tổ hợp của người

Vector *Human Adenovirus C*, typ huyết thanh 5 (Ad5) (vector virus adeno) với sự mất đoạn trong các vùng E1, E3, và E4 của hệ gen (khung GV11, xem patent Mỹ 8,323,663) được sử dụng để tạo cấu trúc vacxin FMDV tái tổ hợp biểu hiện protein

FMDV. Protein FMDV chứa vỏ capsit cấu trúc P1 (VP4-VP2-VP3-VP1) và các protein không cấu trúc 2ABC và 3ABC bao gồm proteaza 3C có chiều dài đầy đủ (SEQ ID NO.4) từ chủng FMDV O1/Man/87.

Polynucleotit tổng hợp (SEQ ID NO.3) mã hóa FMDV O1M P1 (VP4-VP2-VP3-VP1-2ABC'3A'BC) được đưa vào plasmit vận chuyển (xem Fig.6). Vacxin FMDV O1M chứa vectơ virus adeno tái tổ hợp được cấu trúc theo quy trình như được mô tả trong ví dụ 1.2.

Băng biểu hiện FMDV O1M87, nằm ở mỗi nối mất đoạn vùng E1, đọc từ phải sang trái đối với sự phiên mã ARN hệ gen của virus. Không có tín hiệu điều hòa đã biết trong trình tự nucleotit mạch bên của băng cài xen. Trình tự tăng cường/trình tự khởi động CMV kiểm soát sự khởi đầu của quá trình phiên mã. Trong trình tự này là hộp CAAT trình tự tăng cường của virus, hộp TATA, vị trí khởi đầu phiên mã, và các trình tự vị trí ghép 5'.

Các trình tự CMV được nối tiếp bởi vùng không được dịch mã (untranslated region - UTR) nhân tạo chứa trình tự cho ghép vào. Khung đọc mở của gen cần được biểu hiện tiếp theo các trình tự vị trí ghép 3' và tín hiệu polyadenyl hóa sớm của virus 40 ở khỉ (Simian Virus 40 - SV40) được định vị 3' của khung đọc mở để kết thúc quá trình phiên mã.

Thẩm tách GSI thể hiện khung chính xác và băng biểu hiện FMDV O1M87. Việc phân tích trình tự của băng biểu hiện FMDV O1M87 còn xác nhận độ đồng nhất trình tự nucleotit giữa plasmit vận chuyển và ADN được tách chiết từ vacxin FMDV O1M87 chứa vectơ virus adeno tái tổ hợp. Vacxin FMDV O1M87 chứa vectơ virus adeno tái tổ hợp được xác nhận là biểu hiện protein O1M87 *in vitro* trong các tế bào 293 bằng thử nghiệm thẩm tách Western.

Ví dụ 1.3 Tạo cấu trúc kháng nguyên FMDV Irn chứa vectơ virus adeno 5 tái tổ hợp của người

Vectơ *Human Adenovirus C*, typ huyết thanh 5 (Ad5) (vectơ virus adeno) với sự mất đoạn trong các vùng E1, E3, và E4 của hệ gen (khung GV11, xem patent Mỹ 8,323,663) được sử dụng để tạo cấu trúc vacxin FMDV tái tổ hợp biểu hiện protein FMDV. Trình tự mã hóa vỏ capsit FMDV tổng hợp của P1 và các gen không cấu trúc 2A,

2B, một phần 2C (2C'), một phần 3A (3A'), 3B và trình tự mã hóa proteaza của 3C của FMDV typ huyết thanh A/Irn/05 được đưa vào plasmit vận chuyển (xem Fig.7). Vaccin FMDV Irn chứa vector virus adeno tái tổ hợp được cấu trúc theo quy trình như được mô tả trong ví dụ 1.2.

Bảng biểu hiện FMDV Irn, nằm ở mỗi nối mất đoạn vùng E1, đọc từ phải sang trái đối với sự phiên mã ARN hệ gen của virus. Không có tín hiệu điều hòa đã biết trong trình tự nucleotit mạch bên của băng cài xen. Trình tự tăng cường/trình tự khởi động CMV kiểm soát sự khởi đầu của quá trình phiên mã. Trong trình tự này là hộp CAAT trình tự tăng cường của virus, hộp TATA, vị trí khởi đầu phiên mã, và các trình tự vị trí ghép 5'.

Các trình tự CMV được nối tiếp bởi vùng không được dịch mã (untranslated region - UTR) nhân tạo chứa trình tự cho ghép vào. Khung đọc mở của gen cần được biểu hiện tiếp theo các trình tự vị trí ghép 3' và tín hiệu polyadenyl hóa sớm của virus 40 ở khỉ (Simian Virus 40 - SV40) được định vị 3' của khung đọc mở để kết thúc quá trình phiên mã.

Vaccin FMDV Irn chứa vector virus adeno tái tổ hợp được nhận diện bằng cách sử dụng thử nghiệm nhận diện cấu trúc di truyền (GSI) dựa trên PCR và được xác nhận bằng cách sử dụng sự biểu hiện protein bằng kỹ thuật thẩm tách western.

Ví dụ 1.4: Tạo cấu trúc kháng nguyên FMDV Asia chứa vector virus adeno 5 tái tổ hợp của người

Vector *Human Adenovirus C*, typ huyết thanh 5 (Ad5) (vector virus adeno) với sự mất đoạn trong các vùng E1, E3, và E4 của hệ gen (khung GV11, xem patent Mỹ 8,323,663) được sử dụng để tạo cấu trúc vaccin FMDV tái tổ hợp biểu hiện protein FMDV. Trình tự mã hóa vỏ capsit FMDV tổng hợp của P1 và các gen không cấu trúc 2A, 2B, một phần 2C (2C'), một phần 3A (3A'), 3B và trình tự mã hóa proteaza của 3C từ chủng FMDV Asia/Leb/89 được đưa vào plasmit vận chuyển (xem Fig.8). Vaccin FMDV Asia chứa vector virus adeno tái tổ hợp được cấu trúc theo quy trình như được mô tả trong ví dụ 1.2.

Bảng biểu hiện FMDV Asia, nằm ở mỗi nối mất đoạn vùng E1, đọc từ phải sang trái đối với sự phiên mã ARN hệ gen của virus. Không có tín hiệu điều hòa đã biết trong trình tự nucleotit mạch bên của băng cài xen. Trình tự tăng cường/trình tự khởi động

CMV kiểm soát sự khởi đầu của quá trình phiên mã. Trong trình tự này là hộp CAAT trình tự tăng cường của virus, hộp TATA, vị trí khởi đầu phiên mã, và các trình tự vị trí ghép 5'.

Các trình tự CMV được nối tiếp bởi vùng không được dịch mã (untranslated region - UTR) nhân tạo chứa trình tự cho ghép vào. Khung đọc mở của gen cần được biểu hiện tiếp theo các trình tự vị trí ghép 3' và tín hiệu polyadenyl hóa sớm của virus 40 ở khỉ (Simian Virus 40 - SV40) được định vị 3' của khung đọc mở để kết thúc quá trình phiên mã.

Vacxin FMDV Asia chứa vector virus adeno tái tổ hợp được xác nhận là biểu hiện protein Asia *in vitro* trong các tế bào 293 bằng thử nghiệm thấm tách Western, thu được protein phản ứng mà được di chuyển đến vị trí có khối lượng phân tử xấp xỉ 38 kDa. Kháng thể được sử dụng để phát hiện trong thử nghiệm thấm tách Western là kháng thể đa dòng FMD VP2. Khối lượng phân tử của protein AsiaSS.2B được biểu hiện là không thể phân biệt được với khối lượng phân tử thu được sau khi chuyển nạp plasmit đối chứng dương vào trong các tế bào 293.

Ví dụ 2: Nghiên cứu gây nhiễm ở gia súc và lợn

Gia súc và lợn được chủng ngừa bằng vaccin FMDV A24-A12 hoặc vaccin FMDV O1M87 một lần ở ngày 0 thông qua IM và được gây nhiễm ở ngày 14 bằng nhiều typ huyết thanh FMDV, như các chủng A24, A12, O1, Asia, Im, và Iraq.

Fig.9 thể hiện sự bảo vệ của vaccin FMDV O1 ở các động vật khỏi nhiễm FMDV ở ba liều khác nhau và đối chứng. Trong nghiên cứu chuẩn độ liều này, vaccin FMDV O1M chứa vector adeno- tái tổ hợp được đánh giá về khả năng đem lại sự bảo vệ đối với bệnh lan tỏa FMD (tổn thương bàn chân) sau khi gây nhiễm tương đồng IDL, trực tiếp ở 14 ngày sau chủng ngừa (days post-vaccination - dpv). Con gia súc Holstein cái khỏe mạnh 6 tháng tuổi được ngẫu nhiên hóa vào một trong bốn nhóm điều trị. Gia súc đối chứng, chưa được chủng ngừa (T01; n=4) được gây miễn dịch trong cơ bằng một liều 2 ml dung dịch đậm bào chế cuối (final formulation buffer - FFB). Gia súc trong T02-T04 (n=7/nhóm) được chủng ngừa bằng các liều giảm dần [Đơn vị tạo cụm (focus forming units - FFU) hexon kháng virus adeno hoặc thử nghiệm tạo cụm (focus forming assay - FFA); log₁₀] của hoạt chất được chuẩn bị từ virus hạt chủ cấy truyền 2 (MSV+2) được bào chế trong chất bổ trợ ENABL™ C1. T02-T04 được nhận tổng liều lần lượt là

$2,38 \times 10^5$, $5,94 \times 10^4$ FFU hoặc $1,49 \times 10^4$ FFU. Ở 2 tuần sau chủng ngừa (ngày gây nhiễm), 100% gia súc chủng ngừa thuộc T02 và T03 có nồng độ chuẩn trung hòa virus với huyết thanh (serum virus neutralizing - SVN) FMDV O1 Manisa, so với 43% trong nhóm điều trị bằng liều vaccin thấp nhất (T04). Sau khi gây nhiễm trong da ở lưỡi bằng 1×10^4 đơn vị liều nhiễm 50% loài bò (bovine infectious dose units 50% - BID₅₀) của FMDV O1 Manisa, 100% gia súc đối chứng, không được chủng ngừa T01 biểu hiện bệnh lan tỏa (tổn thương bàn chân). Ngược lại, mức độ bảo vệ khỏi bệnh lan tỏa trong các nhóm được chủng ngừa nằm trong khoảng từ 86% (T04) đến 100% (T02 và T03). Tất cả bốn gia súc đối chứng (T01) là dương tính với FMDV trong huyết tương được lấy vào 1-3 ngày sau khi gây nhiễm (dpc), còn không có con nào trong số hai mươi một gia súc chủng ngừa có virus huyết trong huyết tương có thể phát hiện được vào 1-5 dpc. Trong T01, 88% các mẫu mũi được gom 2-5 dpc là dương tính với virus, so với 25% (T03), 27% (T02) và 36% (T04) của các mẫu được thử nghiệm vào 2-5 dpc. Fig.10 thể hiện huyết thanh học của vaccin FMDV O1 ở ba liều và đối chứng.

Các kết quả này chứng tỏ rằng hoạt chất của vaccin FMDV O1M chứa vector adeno tái tổ hợp được bào chế trong chất bổ trợ ENABL C1 là có tính sinh miễn dịch và có hiệu quả cao đối với việc gây nhiễm FMDV tương đồng, IDL ở gia súc, và cung cấp dữ liệu về liều bảo vệ tối thiểu ước tính.

Cả hai vaccin A24-A12 và O1M87 được thử nghiệm là an toàn đối với bê và chuột nhắt.

Ví dụ 3: Nghiên cứu đánh giá khả năng sinh miễn dịch huyết thanh và hoạt tính diệt virus tương ứng/độ ổn định của chất bổ trợ

Việc bổ sung chất bổ trợ vào vaccin có thể làm giảm liều bảo vệ tối thiểu (minimum protective dose - MPD) và tạo ra vaccin có hiệu quả hơn. MPD giảm có thể được cân đối bởi chi phí chất bổ trợ và sự đảm bảo nguồn cung. Tuy nhiên, một số chất bổ trợ có thể làm giảm hiệu quả của vaccin. Chất bổ trợ có thể đẩy hệ miễn dịch về phía đáp ứng không mong muốn hoặc chất bổ trợ có thể bất lợi cho chất gây miễn dịch (làm mất độ ổn định chẳng hạn).

Mục đích của nghiên cứu này là đánh giá hiệu lực huyết thanh học của chất bổ trợ. Nghiên cứu huyết thanh học đánh giá hiệu lực được thực hiện ở gia súc, và song song với nghiên cứu đánh giá hoạt tính diệt virus/độ ổn định được thực hiện để xác định xem chất

bổ trợ bất kỳ trong số năm chất bổ trợ có tác dụng bất lợi trong các vaccin FMDV virus adeno hay không. Mỗi liều bao gồm 200µl hoạt chất (Active Ingredient - AI) cuối trên mỗi liều ở liều 2 ml với mỗi chất bổ trợ. Các chất bổ trợ là axit polyacrylic, nhũ tương LF2, nhũ tương LR6, CARBIGEN™ M và ENABL® C1 (xem bảng 1.1 dưới đây).

Bảng 1.1: Bào chế các vaccin FMDV virus adeno

Nhóm	Chất bổ trợ	Sản phẩm vaccin
G1	Không chất bổ trợ	Vaccin FMDV ($10^{5,7}$ trên mỗi mL) + FFB (dung dịch đệm bào chế cuối) (50% thể tích/thể tích)
G2	Axit polyacrylic	Vaccin FMDV ($10^{5,7}$ trên mỗi mL) + polyme axit polyacrylic (liều 4 mg/2mL)
G3	Nhũ tương LF2	Vaccin FMDV ($10^{5,7}$ trên mỗi mL) + TS6* ở 20% thể tích/thể tích của chuỗi cuối
G4	Nhũ tương LR6	Vaccin FMDV ($10^{5,7}$ trên mỗi mL) + LR4** ở 25% thể tích/thể tích của chuỗi cuối
G5	CARBIGEN™ M	Vaccin FMDV ($10^{5,7}$ trên mỗi mL) + CARBIGEN™ M đến 10% thể tích/thể tích chuỗi cuối
G6	ENABL® C1	Vaccin FMDV ($10^{5,7}$ trên mỗi mL) + ENABL® C1 (20% trong chuỗi cuối)

TS6*: Chất bổ trợ/nhũ tương TS6 như được mô tả trong US 7,608,279 và US 7,371,395

LR4**: Chất bổ trợ/nhũ tương LR4 như được mô tả trong US7,691,368

CARBIGEN™: Huyền phù chất bổ trợ trên cơ sở carbome (Carbopol 934P), sản phẩm của MVP Laboratories, Inc.

ENABL® C1: Sản phẩm chất bổ trợ cho gia súc được mua thương mại từ VaxLiant

Bảng 1.2: Nhũ tương TS6 (tiền nhũ tương được mô tả trong US 7,608,279 và US 7,371,395)

Pha dầu (120mL)	
Sorbitan monooleat (SPAN 80®)	1,8% khối lượng/thể tích
Sorbitan trioleat (20 OE) (TWEEN 85®)	10,2% khối lượng/thể tích
Dầu parafin (MARCOL 82®)	88% thể tích/thể tích
Pha nước (120mL)	
Dung dịch sorbitan monooleat 20% (khối lượng/thể tích) (20 OE) (TWEEN 80®)	11,25% khối lượng/thể tích
Dung dịch đệm đẳng trương chứa dinatri và monokali phosphat 0,02M (độ pH=7,8)	85,75% thể tích/thể tích
Natri mercurothiolat (Thionersal®) 1% trong nước	1,5% thể tích/thể tích

Bảng 1.3: Nhũ tương LR4 (tiền nhũ tương được mô tả trong US7,691,368)

Pha dầu (72mL)	
Oleth-2 (BRIJ® 92)	1,8% khối lượng/thể tích
Oleth-5 (VOLPO® N5)	8,2% khối lượng/thể tích
Dầu parafin (MARCOL 82®)	87,5% thể tích/thể tích
Chất bảo quản	2,5% thể tích/thể tích
Pha nước (108mL)	
Poloxame 407 (LUTROL® F127)	0,58% khối lượng/thể tích
Dung dịch đệm đẳng trương chứa dinatri và monokali phosphat 0,02M (độ pH=7,8)	Lượng vừa đủ đến 100,0% thể tích/thể tích

Các vacxin được bảo quản ở nhiệt độ 4°C và 25°C và được thử nghiệm theo thời gian. Các virus trong mỗi vacxin được chuẩn độ theo thử nghiệm chuẩn độ bằng thử nghiệm tạo cụm chuẩn trong đó lượng virus được phát hiện được đọc bằng kháng thể kháng virus adeno đặc hiệu trên lớp đơn tế bào. Các nồng độ chuẩn tương ứng được so sánh. Dữ liệu từ 3 tháng đầu được thể hiện dưới đây, trong bảng 2 và trên các Fig.11 (25°C) và 12 (4°C). Ở nhiệt độ 4°C, hầu hết các kháng nguyên hoặc các virus có mặt trong các vacxin bào chế được là ổn định đến 3 tháng. Ở nhiệt độ 25°C, các kháng nguyên hoặc các virus được bào chế với các chất hỗ trợ axit polyacrylic, LF2 và Carbigen M là tương đối ổn định đến 7 tuần. Độ ổn định của ba sản phẩm này cho thấy mức độ giảm nhẹ ở nhiệt độ 25°C ở thời điểm 3 tháng. Tuy nhiên, mức giảm này là nhỏ khi virus tái tổ hợp được kết hợp với chất hỗ trợ xác nhận tác dụng bảo vệ của chất hỗ trợ. Các kháng nguyên hoặc các virus được bào chế với chất hỗ trợ LR6 đã bị một số cản trở trong thử nghiệm chất hỗ trợ như được chứng tỏ bởi mức dưới mức phát hiện dưới đây ở cả nhiệt độ 4°C và 25°C. Tuy nhiên, sản phẩm được bào chế với chất hỗ trợ LR6 tạo ra hàm lượng virus cụ thể ở 3 tháng và ổn định ở nhiệt độ 25°C.

Bảng 2: Nghiên cứu hoạt tính diệt virus và độ ổn định của năm chất hỗ trợ lên đến 3 tháng

Chất hỗ trợ	T=0	T=24 giờ	T=1 tuần	T=2 tuần	T=4 tuần	T=7 tuần	T=3 tháng
G1 - 4°C	6,94	6,61	6,88	6,90	6,89	6,80	7,21
G1 - 25°C	7,10	6,70	6,76	6,34	5,59	4,24	Dưới mức phát hiện
G2 - 4°C	6,97	6,51	7,04	6,96	6,97	6,90	7,07
G2 - 25°C	6,91	6,40	6,94	6,93	6,69	6,56	5,85
G3 - 4°C	6,68	6,25	6,74	6,80	6,74	6,93	6,92
G3 - 25°C	6,42	6,40	6,71	6,69	6,67	6,63	5,85
G4 - 4°C	6,51	Dưới mức phát hiện*	6,69	5,36	Dưới mức phát hiện*	Dưới mức phát hiện*	6,78
G4 - 25°C	6,52	Dưới mức phát hiện*	6,69	5,44	Dưới mức phát hiện*	Dưới mức phát hiện*	6,21

G5 - 4°C	6,82	6,81	6,91	6,80	6,96	7,17	7,13
G5 - 25 °C	6,87	6,83	6,92	6,51	6,61	6,42	5,85
G6 - 4°C	6,84	6,79	6,95	6,77	6,73	7,11	7,16
G6 - 25 °C	6,84	6,84	6,81	6,72	Dưới mức phát hiện	Dưới mức phát hiện	Dưới mức phát hiện

Dưới mức phát hiện*: sự cản trở thử nghiệm chất bổ trợ

Nghiên cứu huyết thanh học tương ứng được thực hiện ở gia súc. Mỗi nhóm gồm 10 con trên mỗi nhóm thử nghiệm (5 con đối chứng) và được sử dụng một liều 2 ml ở ngày 0 tiếp theo là liều tăng cường ở ngày 21. Các mẫu máu được lấy ở một vài thời điểm trong toàn bộ nghiên cứu và các mẫu huyết thanh được phân tích. Huyết thanh học bằng cách chuẩn độ trung hòa virus được thực hiện. Dữ liệu ban đầu chỉ các đáp ứng huyết thanh ở ngày 14 sau lần chủng ngừa thứ nhất trong một số nhóm. Đồng thời, dữ liệu này chỉ ra rằng các vaccin FMD chứa vector virus adeno bào chế được trong các chất bổ trợ nhất định có thể tạo cơ hội cho sự cải thiện tính bền nhiệt và khả năng đáp ứng với sự thay đổi nhiệt độ. Khi được kết hợp với các dữ liệu ban đầu này, đáp ứng miễn dịch được duy trì hoặc được cải thiện tiềm tàng.

Ví dụ 4: Khả năng sinh miễn dịch huyết thanh của quá trình chủng ngừa hai liều bằng nhiều kháng nguyên FMDV O1M chứa vector virus adeno tái tổ hợp của người ở gia súc

Mục đích của nghiên cứu là đánh giá đáp ứng kháng thể huyết thanh ở gia súc sau khi dùng vaccin FMDV O1Manisa chứa vector adeno được bào chế với và không với các chất bổ trợ khác nhau.

Năm mươi-lăm con bê được nuôi thông thường (khoảng 5 tháng tuổi) được ngẫu nhiên hóa mỗi con vào một trong sáu nhóm điều trị như được thể hiện trong bảng 4 dưới đây.

Bảng 4

Nhóm	Vaccin	Chất bổ trợ	Đường dùng	Tần suất dùng	Số động vật
1	Adt.O1/Manisa	ENABL® C1	IM	Hai lần, cách nhau 21 ngày	10
2	Adt.O1/Manisa	LF	IM	Hai lần, cách nhau 21 ngày	10
3	Adt.O1/Manisa	Axit polyacrylic	IM	Hai lần, cách nhau 21 ngày	10
4	Adt.O1/Manisa	Carbigen M	IM	Hai lần, cách nhau 21 ngày	10
5	Adt.O1/Manisa	Không	IM	Hai lần, cách nhau 21 ngày	10
6	Giả dược FFB	Không	IM	Hai lần, cách nhau 21 ngày	5

Tất cả các con bê ngoại trừ các con bê thuộc nhóm 6 (bê đối chứng) được chủng ngừa bằng cấu trúc O1/Manisa chứa vectơ virus adeno với (các nhóm 1-4) hoặc không chứa chất bổ trợ (nhóm 5), hai lần ở khoảng cách 21 ngày bằng 2 ml vacxin thử nghiệm. Tất cả các lần tiêm được thực hiện thông qua đường trong cơ (IM) ở trên vai một cách luân phiên bên vai phải và vai trái. Bảng 4 trên đây thể hiện tóm tắt việc điều trị đối với mỗi nhóm.

Các con bê được quan sát một cách không liên tục trong ít nhất 1 giờ sau mỗi lần chủng ngừa về các dấu hiệu lâm sàng của các biến cố bất lợi toàn thân cấp tính. Các mẫu máu được lấy từ tất cả các con bê vào các ngày -1 (trước khi chủng ngừa), 7, 15, 21 (trước khi chủng ngừa), 28, và 35. Các mẫu huyết thanh từ tất cả các con bê được kiểm tra về kháng thể FMDV bằng cách trung hòa virus với huyết thanh (Serum Virus Neutralization - SVN). Ngoài ra, các đáp ứng kháng thể với virus adeno (SAV) được xác định trong tất cả các động vật từ tất cả các nhóm trong các mẫu được lấy vào ngày -1 và 35. Các kết quả về SVN và SAV được báo cáo theo Log_{10} và trị số $\leq 0,6 \text{ Log}_{10}$ được coi là âm tính đối với kháng thể huyết thanh.

Các đánh giá độ an toàn sau chủng ngừa bao gồm nhiệt độ trực tràng, kiểm tra thị giác và sờ nắn các vị trí tiêm trong ít nhất 3 ngày sau mỗi lần chủng ngừa. Các con bê có biến cố bất lợi tại vị trí tiêm cục bộ được quan sát một cách không liên tục cho đến khi hết bất thường. Nghiên cứu này được kết thúc vào D35 sau khi lấy máu lần cuối.

Các kết quả của đáp ứng huyết thanh FMDV sử dụng các kháng thể FMDV bằng Log_{10} trung hòa virus với huyết thanh (SVN) được mô tả dưới đây.

Tất cả các con bê từ tất cả các nhóm được kiểm tra là âm tính đối với các kháng thể FMDV trước khi bắt đầu nghiên cứu. Tất cả các con bê đối chứng là âm tính đối với các kháng thể FMDV trong toàn bộ nghiên cứu.

Sự chuyển đổi huyết thanh sau khi chủng ngừa được xác định dưới dạng Log_{10} nồng độ chuẩn tăng $> 0,9$.

Đến ngày 14 (2 tuần sau lần chủng ngừa thứ nhất), 5/10 con bê (50%) trong ENABL® C1 (nhóm 1) có sự chuyển đổi huyết thanh. Các con trong các nhóm còn lại được chủng ngừa (2-5) có mức độ chuyển đổi huyết thanh nằm trong khoảng 20-40%.

Ngoài ra, nồng độ chuẩn kháng thể trung bình trên mỗi nhóm là cao hơn một chút trong nhóm 1 (ENABL® C1) tiếp theo là các nhóm 2 (LF) và 3 (axit polyacrylic) (Fig.13).

Đến ngày 35 (2 tuần sau khi chủng ngừa lần thứ hai), tất cả các con bê đã được chủng ngừa (nhóm 1 [ENABL®], nhóm 2 [LF] và nhóm 5 [không chất bổ trợ]) có sự chuyển đổi huyết thanh tiếp theo là chín mươi và tám mươi phần trăm các con bê lần lượt trong nhóm 3 (axit polyacrylic) và nhóm 4 (Carbigen M).

Các con bê đã được chủng ngừa bằng LF, chất bổ trợ, tiếp theo là các con bê đã được chủng ngừa mà không có chất bổ trợ (nhóm 5) và tiếp theo nữa là các con bê đã được chủng ngừa bằng chất bổ trợ ENABL® C1 (nhóm 1) có đáp ứng kháng thể cao hơn sau chế độ chủng ngừa hai liều (xem Fig.13).

Các kết quả của đáp ứng huyết thanh FMDV sử dụng các kháng thể virus adeno bằng Log₁₀ trung hòa virus với huyết thanh (SVN) được mô tả dưới đây.

Tất cả các con bê đối chứng và các con bê đã được chủng ngừa là âm tính với virus adeno bằng cách chuẩn độ kháng thể SN vào ngày -1 ($\leq 0,6 \text{ Log}_{10}$). Đến ngày 35, tất cả nhưng trừ một con trong số các con bê đã được chủng ngừa (ID:134; nhóm 5) được chuyển đổi huyết thanh với trung bình nhân nồng độ chuẩn tổng thể cao hơn theo nhóm trong các nhóm đã được chủng ngừa bằng vacxin chứa chất bổ trợ (các nhóm 1-4) (xem Fig.14).

Các kết quả biểu thị các đáp ứng huyết thanh ở ngày 14 sau lần chủng ngừa thứ nhất trong một số nhóm. Hai tuần sau khi chủng ngừa lần thứ hai, đáp ứng kháng thể cao hơn được thấy ở các con bê đã được chủng ngừa bằng chất bổ trợ LF tiếp theo là các con bê đã được chủng ngừa mà không có chất bổ trợ và các con bê được chủng ngừa bằng chất bổ trợ Enable C1.

Các kết quả gợi ý rằng đáp ứng kháng thể sau khi chủng ngừa một lần không phụ thuộc vào việc có hay không có chất bổ trợ là nhỏ. Tuy nhiên, bằng cách sử dụng chế độ chủng ngừa hai lần (chủng ngừa nhắc lại), đáp ứng kháng thể tổng thể cao hơn. Không quan sát thấy có các biến cố bất lợi toàn thân khi cấu trúc vacxin được sử dụng hai lần (cách nhau 3 tuần) trong cơ.

Ví dụ 5: Sự đánh giá huyết thanh học của các vacxin FMDV sau khi chủng ngừa ở lợn

Mục đích của nghiên cứu này là đánh giá đáp ứng kháng thể ở lợn con sau khi dùng các sản phẩm vacxin đơn trị chứa FMDV O1 Manisa chứa vector adeno 5 và/hoặc hạt giống virus (Virus Like Particle - VLP) tái tổ hợp FMDV O1 Manisa được biểu hiện bởi baculovirus.

Hai mươi lợn con được nuôi thông thường (khoảng 5 tuần tuổi) được ngẫu nhiên hóa vào hai nhóm điều trị, mỗi nhóm chứa 10 lợn con. Thành phần nhóm được thể hiện trong bảng 5 dưới đây.

Bảng 5

Nhóm	Các vacxin	Liều trên mỗi con; cấu trúc virus adeno (FAID ₅₀ /2ml (log ₁₀))	Tần suất	Số lượng lợn
1	Virut adeno O1M Không chất bổ trợ/ Bac O1M+Chất bổ trợ TS6	10 ⁸	Virut adeno X+5 O1M (Ngày 0) và Bac O1M chất bổ trợ TS6 (Ngày 21)	10
2	Đối chứng (N/A)	N/A	N/A	10

Lợn con trong nhóm 1 được chủng ngừa bằng 2 ml vacxin. Tất cả các lần tiêm được thực hiện thông qua đường trong cơ (IM) ở trên vai một cách luân phiên bên vai phải và vai trái. Lợn con được quan sát trước mỗi lần chủng ngừa về tình trạng sức khỏe tổng thể của chúng. Các mẫu máu được lấy từ tất cả các lợn vào ngày 0 (trước khi chủng ngừa), 7, 14, 21 (trước khi chủng ngừa), 28 và 35. Mẫu huyết thanh ngày 35 từ tất cả các lợn được kiểm tra về kháng thể FMDV bằng cách trung hòa virus với huyết thanh (Serum Virus Neutralization - SVN). Các mẫu từ các lợn trong nhóm 1 được đem thử nghiệm SVN trên tất cả các ngày lấy mẫu do chúng có đáp ứng kháng thể tổng thể cao hơn từ sau ngày 35. Các kết quả được báo cáo theo Log₁₀ và trị số $\leq 0,75 \text{ Log}_{10}$ được coi là âm tính đối với kháng thể huyết thanh. Các đánh giá độ an toàn sau chủng ngừa bao gồm nhiệt độ trực tràng, kiểm tra thị giác và sờ nắn các vị trí tiêm trong 3 ngày sau mỗi lần chủng ngừa.

Các kết quả của đáp ứng huyết thanh FMDV sử dụng các kháng thể FMDV bằng Log₁₀ trung hòa virus với huyết thanh (SVN) được mô tả dưới đây.

Tất cả đối chứng là âm tính đối với các kháng thể FMDV trước và cuối nghiên cứu.

Đến ngày 28 (1 tuần sau khi chủng ngựa lần thứ 2), tất cả lợn từ nhóm 1 được chuyển đổi huyết thanh (nồng độ chuẩn $\geq 1,20 \log_{10}$) (xem FIG.15). Không quan sát thấy các biến cố bất lợi toàn thân và/hoặc tại chỗ do chủng ngựa. Các kết quả cho thấy rõ ràng rằng mặc dù nhóm được chủng ngựa có đáp ứng kháng thể nhỏ sau lần chủng ngựa thứ nhất, đáp ứng kháng thể sau lần chủng ngựa thứ hai (chủng ngựa nhắc lại) là cao đến cuối nghiên cứu.

Ví dụ 6: Đường dùng

Mục đích của nghiên cứu này là đánh giá đáp ứng huyết thanh của việc chủng ngựa hai liều ở gia súc hoặc lợn khi hai vacxin FMDV chứa vector virus adeno tái tổ hợp, một vacxin FMDV chứa vector virus adeno tái tổ hợp và một vacxin hạt giống virus (VLP) FMDV tái tổ hợp được biểu hiện bởi baculovirus, hoặc hai vacxin VLP FMDV được sử dụng, và khi các đường dùng khác nhau (đường dùng qua da, dưới da, hoặc trong da) được áp dụng. Nghiên cứu này còn được thiết kế nhằm vấn đề cản trở khi nhiều vacxin được dùng.

Các chất bổ trợ là axit polyacrylic, nhũ tương LF2, nhũ tương LR6, CARBIGEN™ M và ENABL® C1. Các nhóm điều trị được thể hiện trong bảng 6 dưới đây.

Bảng 6

Nhóm	Vacxin	Đường dùng	Tần suất dùng
1	Adeno FMDV	IM hoặc IM/TD hoặc IM/SQ	Hai lần, cách nhau 21 ngày
2	Adeno FMDV	TD hoặc TD/IM hoặc TD/SQ	Hai lần, cách nhau 21 ngày
3	Adeno FMDV	SQ hoặc SQ/TD hoặc SQ/IM	Hai lần, cách nhau 21 ngày
4	Baculo FMDV VLP	IM hoặc IM/TD hoặc IM/SQ	Hai lần, cách nhau 21 ngày
5	Baculo FMDV VLP	TD hoặc TD/IM hoặc TD/SQ	Hai lần, cách nhau 21 ngày
6	Baculo FMDV VLP	SQ hoặc SQ/TD hoặc SQ/IM	Hai lần, cách nhau 21 ngày
7	Adeno FMDV/Baculo FMDV VLP	IM hoặc IM/TD hoặc IM/SQ	Hai lần, cách nhau 21 ngày
8	Adeno FMDV/Baculo FMDV VLP	TD hoặc TD/IM hoặc TD/SQ	Hai lần, cách nhau 21 ngày
9	Adeno FMDV/Baculo FMDV VLP	SQ hoặc SQ/TD hoặc SQ/IM	Hai lần, cách nhau 21 ngày

Các con bê được quan sát một cách không liên tục trong ít nhất 1 giờ sau mỗi lần chủng ngừa về các dấu hiệu lâm sàng của các biến cố bất lợi toàn thân cấp tính. Các mẫu máu được lấy từ tất cả các con bê vào các ngày -1 (trước khi chủng ngừa), 7, 15, 21 (trước khi chủng ngừa), 28, và 35. Các mẫu huyết thanh từ tất cả các con bê được kiểm tra về kháng thể FMDV bằng cách trung hòa virus với huyết thanh (Serum Virus Neutralization - SVN). Ngoài ra, các đáp ứng kháng thể với virus adeno (SAV) được xác định trong tất cả các động vật từ tất cả các nhóm trong các mẫu được lấy vào ngày -1 và 35.

Các đánh giá độ an toàn sau chủng ngừa bao gồm nhiệt độ trực tràng, kiểm tra thị giác và sờ nắn các vị trí tiêm trong ít nhất 3 ngày sau mỗi lần chủng ngừa. Các con bê có biến cố bất lợi tại vị trí tiêm cục bộ được quan sát một cách không liên tục cho đến khi hết bất thường.

Các kết quả thể hiện ảnh hưởng của việc chủng ngừa nhắc lại đối với tất cả các nhóm nhưng tác dụng chủng ngừa nhắc lại là lớn hơn ở các động vật mà nhận lần chủng ngừa cơ bản bằng vaccin virus adeno tiếp theo là chủng ngừa tăng cường bằng cấu trúc baculovirus-FMD. Hơn thế nữa, đường dùng có ảnh hưởng đến đáp ứng huyết thanh và sự bảo vệ, cũng như thời gian miễn dịch. Các đường dùng cụ thể và/hoặc kết hợp cụ thể của các đường dùng TD, IM và SQ dường như làm tăng đáp ứng miễn dịch, hơn nữa khuếch đại sự bảo vệ, khắc phục sự cản trở, và bảo vệ động vật dương tính với kháng thể thu được từ mẹ (Maternally Derived Antibody-positive - MDA-positive).

Ví dụ 7: Hiệu lực ở lợn

Các lợn được chủng ngừa chống FMDV (chống một số typ huyết thanh) hai lần cách nhau 21 ngày theo chế độ chủng ngừa nhắc lại mà xem xét quy trình chủng ngừa nhắc lại khác loại (chủng ngừa cơ bản bằng adeno tiếp theo chủng ngừa tăng cường bằng baculo) cũng như chủng ngừa nhắc lại tương đồng (adeno-adeno; baculo-baculo), và được gây nhiễm 14 dpv bằng nhiều typ huyết thanh FMDV, như các chủng A24, A12, O1, Asia, Imn, và Iraq.

Trong nghiên cứu chuẩn độ liều, vaccin FMDV chứa vector adeno tái tổ hợp được đánh giá về khả năng đem lại sự bảo vệ khỏi bệnh lan tỏa FMD (tổn thương bàn chân) sau khi gây nhiễm tương đồng và khác loại ở 14 ngày sau chủng ngừa (dpv). Quy trình đã

được mô tả trong ví dụ 2 được sử dụng trong nghiên cứu này để xác định liều bảo vệ tối thiểu trong chế độ dùng chủng ngừa nhắc lại.

Các kết quả chứng tỏ rằng vaccin FMDV chứa vector adeno tái tổ hợp được sử dụng trong quy trình chủng ngừa nhắc lại có tính sinh miễn dịch và có hiệu quả cao đối với việc gây nhiễm FMDV tương đồng và khác loại ở lợn, khắc phục sự cản trở và bảo vệ động vật dương tính với kháng thể thu được từ mẹ (dương tính với MDA).

Ví dụ 8: Hiệu lực ở loài bò

Gia súc đầu tiên được chủng ngừa bằng vaccin FMDV chứa vector virus adeno tái tổ hợp và được tăng cường bằng vaccin FMD chết thông thường hoặc vaccin VLP FMDV được biểu hiện bởi baculovirus cách nhau 21 ngày và được gây nhiễm ở ngày 14 sau lần chủng ngừa thứ hai bằng nhiều typ huyết thanh FMDV, như các chủng A24, A12, O1, Asia, Irn, và Iraq.

Trong nghiên cứu chuẩn độ liều, vaccin FMDV chứa vector adeno tái tổ hợp được đánh giá về khả năng đem lại sự bảo vệ khỏi bệnh lan tỏa FMD (tổn thương bàn chân) sau khi gây nhiễm tương đồng và khác loại trực tiếp ở 14 ngày sau chủng ngừa (dpv). Quy trình đã được mô tả trong ví dụ 2 được sử dụng trong nghiên cứu này để xác định liều bảo vệ tối thiểu trong chế độ dùng chủng ngừa nhắc lại. Các kết quả chứng tỏ rằng chế độ dùng chủng ngừa nhắc lại có tính sinh miễn dịch và có hiệu quả cao đối với việc gây nhiễm FMDV tương đồng và khác loại ở gia súc, và tạo ra sự bảo vệ ở động vật khỏi sự nhiễm FMDV, khắc phục sự cản trở, và bảo vệ động vật dương tính với kháng thể thu được từ mẹ (dương tính với MDA).

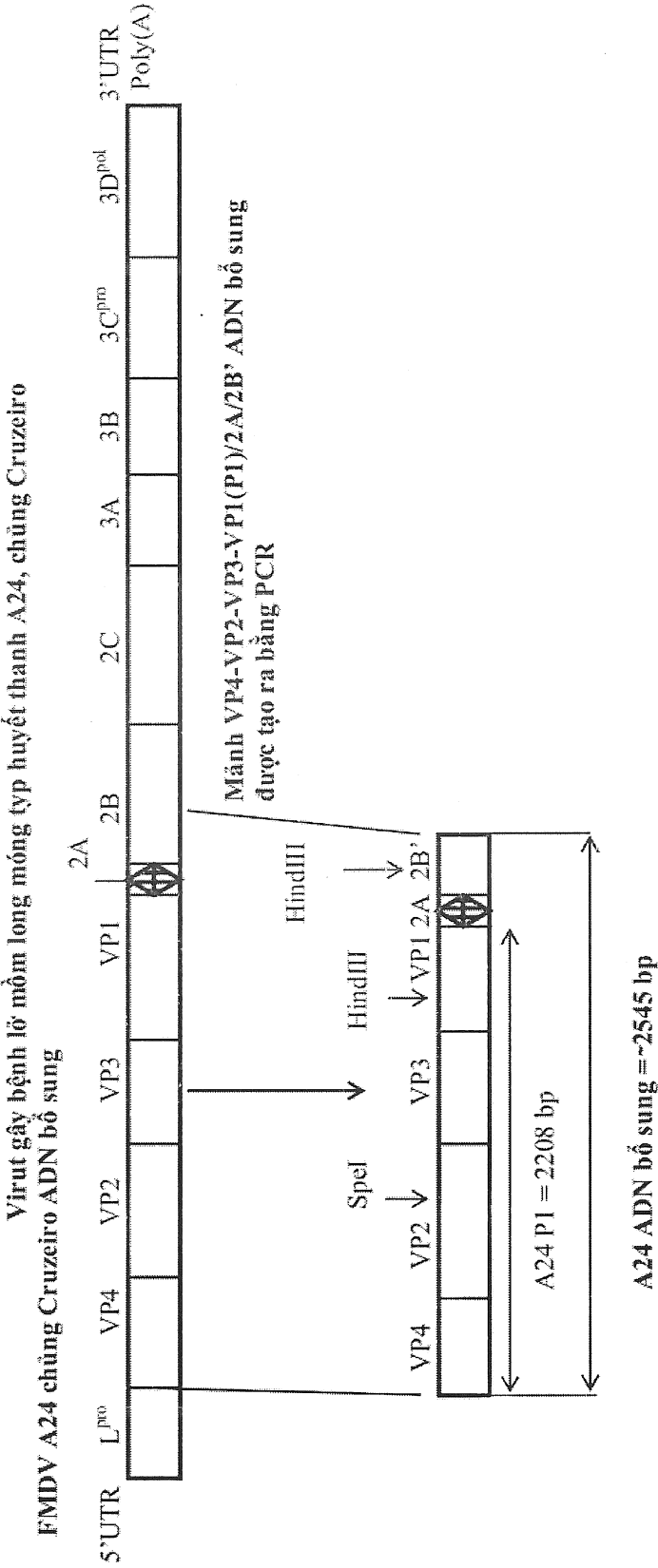
Mặc dù các phương án của sáng chế đã được mô tả chi tiết trên đây, cần phải hiểu rằng sáng chế được mô tả bởi các ví dụ trên không chỉ giới hạn ở các chi tiết cụ thể được nêu trong phần mô tả trên do có thể có nhiều biến thể hiển nhiên của các phương án này mà không vượt quá ý tưởng hoặc phạm vi của sáng chế. Tất cả các tài liệu được trích dẫn hoặc viện dẫn trong bản mô tả (“các tài liệu được trích dẫn trong bản mô tả”), và tất cả các tài liệu được trích dẫn hoặc viện dẫn trong các tài liệu được trích dẫn trong đó, cùng với bất kỳ hướng dẫn của nhà sản xuất, mô tả, đặc điểm kỹ thuật sản phẩm, và tờ rơi sản phẩm đối với các sản phẩm bất kỳ được nêu trong bản mô tả hoặc trong tài liệu bất kỳ được hợp nhất trong đó bằng cách viện dẫn, được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn, và có thể được sử dụng để thực hiện sáng chế này.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm sinh miễn dịch chứa vector virus tái tổ hợp biểu hiện kháng nguyên virus gây bệnh lở mồm long móng (foot and mouth Disease Virus - FMDV), trong đó kháng nguyên FMDV này chứa polypeptit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2, SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.6 hoặc SEQ ID NO.8 hoặc trình tự có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 80% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2, SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.6 hoặc SEQ ID NO.8.
2. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó vector virus là virus adeno.
3. Chế phẩm theo điểm 1 hoặc 2, trong đó kháng nguyên FMDV này được mã hóa bởi polynucleotit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.3, SEQ ID NO.5, hoặc SEQ ID NO.7.
4. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó chế phẩm này còn chứa chất mang, tá dược, chất bổ trợ, hoặc chất dẫn được dụng hoặc được chấp nhận để sử dụng trong thú y.
5. Chế phẩm theo điểm 4, trong đó chất mang, tá dược, chất bổ trợ, hoặc chất dẫn được dụng hoặc được chấp nhận để sử dụng trong thú y được chọn từ nhóm bao gồm axit polyacrylic, nhũ tương LF2, nhũ tương LR6, nhũ tương TS6, nhũ tương LR4, carbome, nhôm hydroxit, nhôm phosphat, saponin, CpG, nhũ tương nước trong dầu, nhũ tương dầu trong nước, và chất bổ trợ trên cơ sở carbome.

SEQ ID NO.	Loại	Mô tả gen
1	ADN	Polynucleotit mã hóa kháng nguyên FMDV A24-A12 thể khảm
2	protein	Kháng nguyên FMDV A24-A12 thể khảm
3	ADN	Polynucleotit mã hóa kháng nguyên FMDV O1M
4	protein	Kháng nguyên FMDV O1M
5	ADN	Polynucleotit mã hóa kháng nguyên FMDV Im
6	protein	Kháng nguyên FMDV Im
7	ADN	Polynucleotit mã hóa kháng nguyên FMDV Asia
8	protein	Kháng nguyên FMDV Asia

Fig.1



Mảnh A24 (P1-2AB') ADN bổ sung được sử dụng để tạo cấu trúc thành phần gen vỏ capsit cấu trúc của vectơ biểu hiện

Fig.2

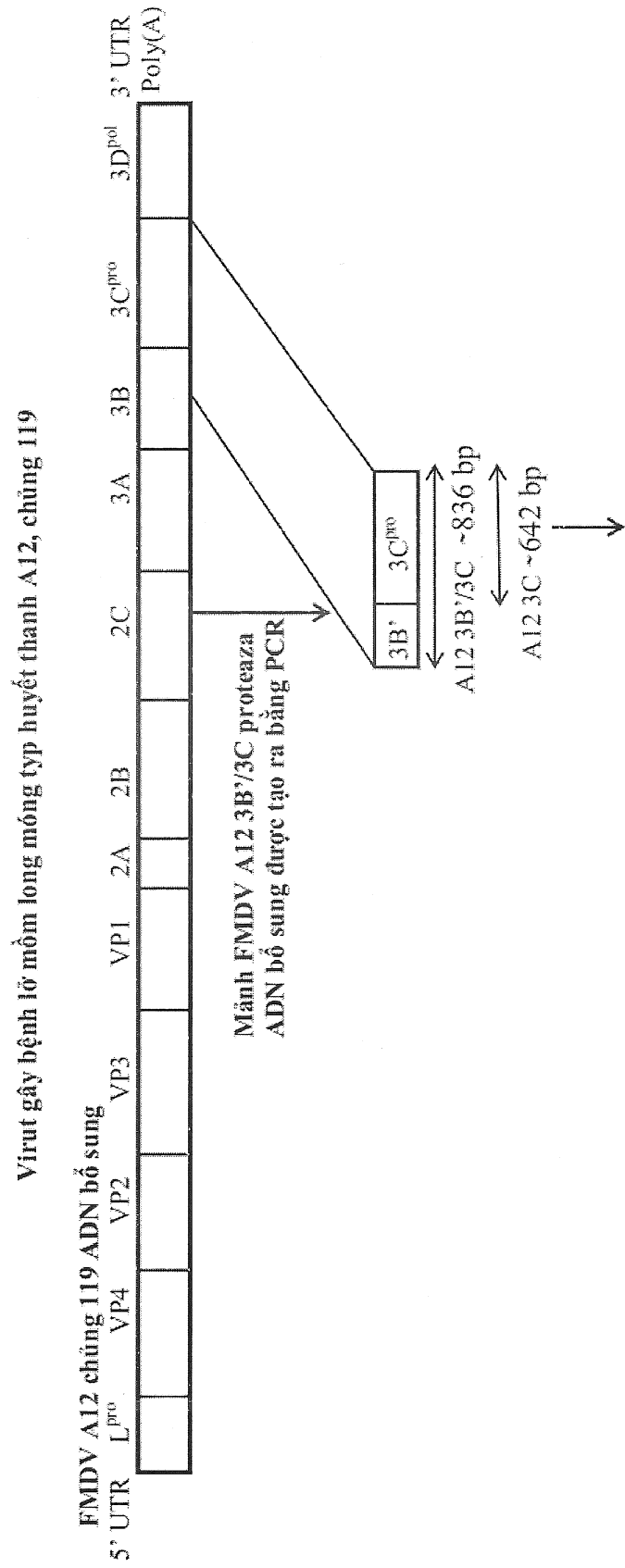
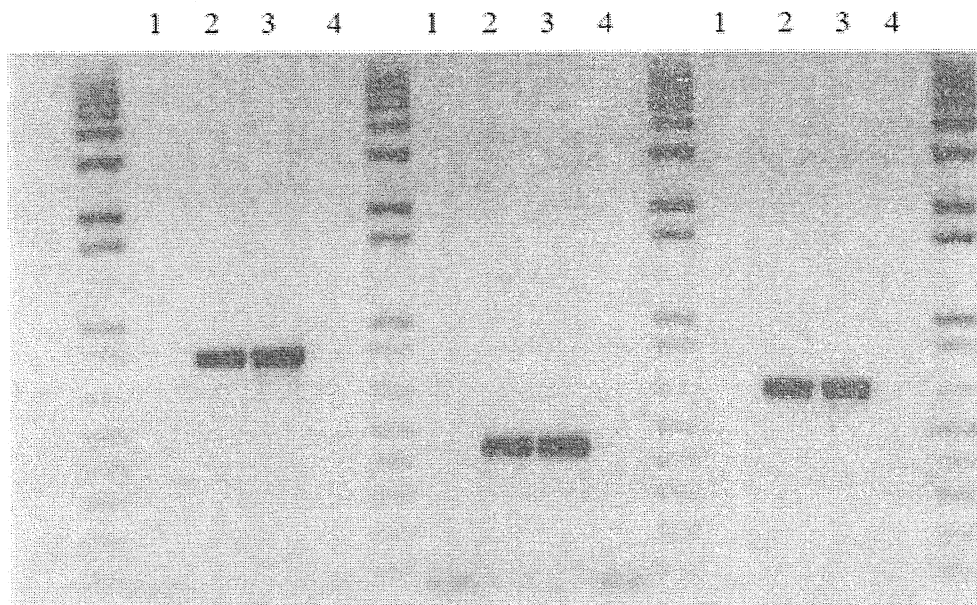


Fig.3

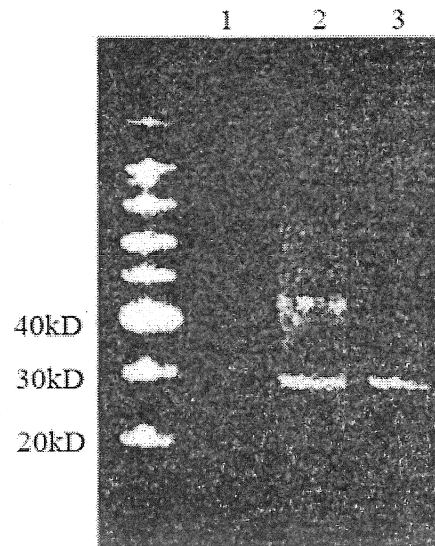
Thử nghiệm nhận diện cấu trúc di truyền của vắc xin FMDV A24-A12 chứa vector
virus adeno tái tổ hợp bằng PCR



Dải 1 : đối chứng âm
Dải 2 : đối chứng dương
Dải 3 : cấu trúc A24-A12
Dải 4 : mẫu trắng

Fig.4

Thẩm tách Western của vắc xin FMDV A24-A12 chứa vector virus adeno tái tổ hợp



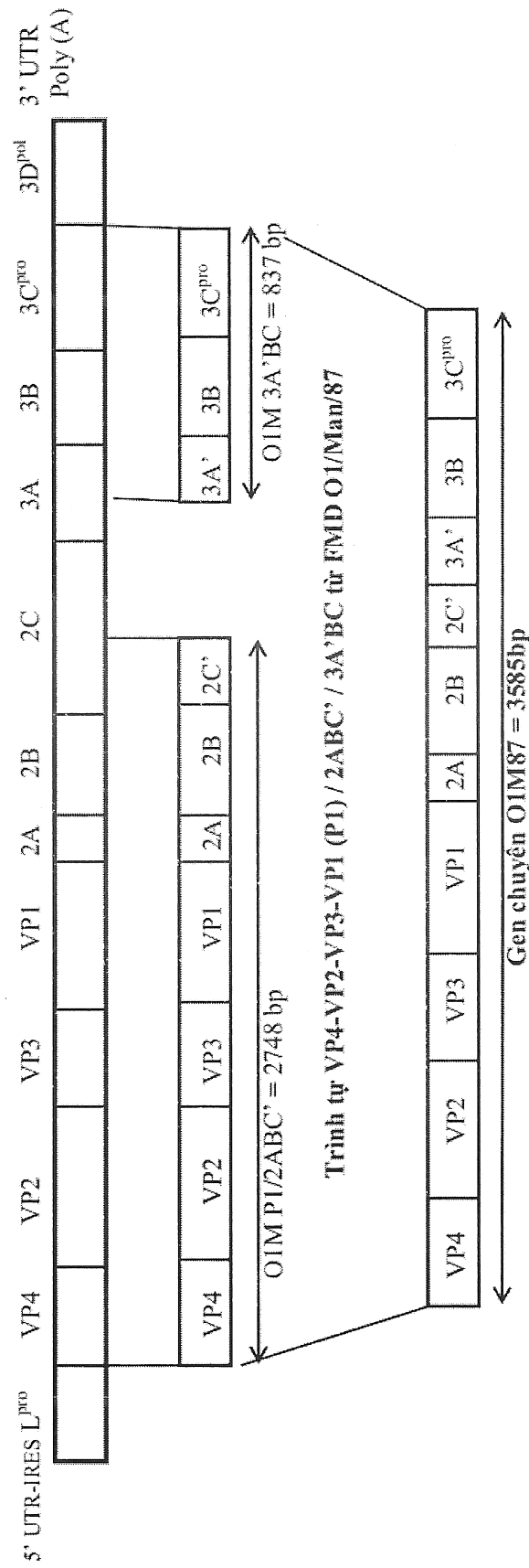
Dải 1: đối chứng âm

Dải 2: đối chứng dương – plasmid vận chuyển

Dải 3: vắc xin FMDV A24-A12 thể khảm chứa vector virus adeno tái tổ hợp

Fig.5

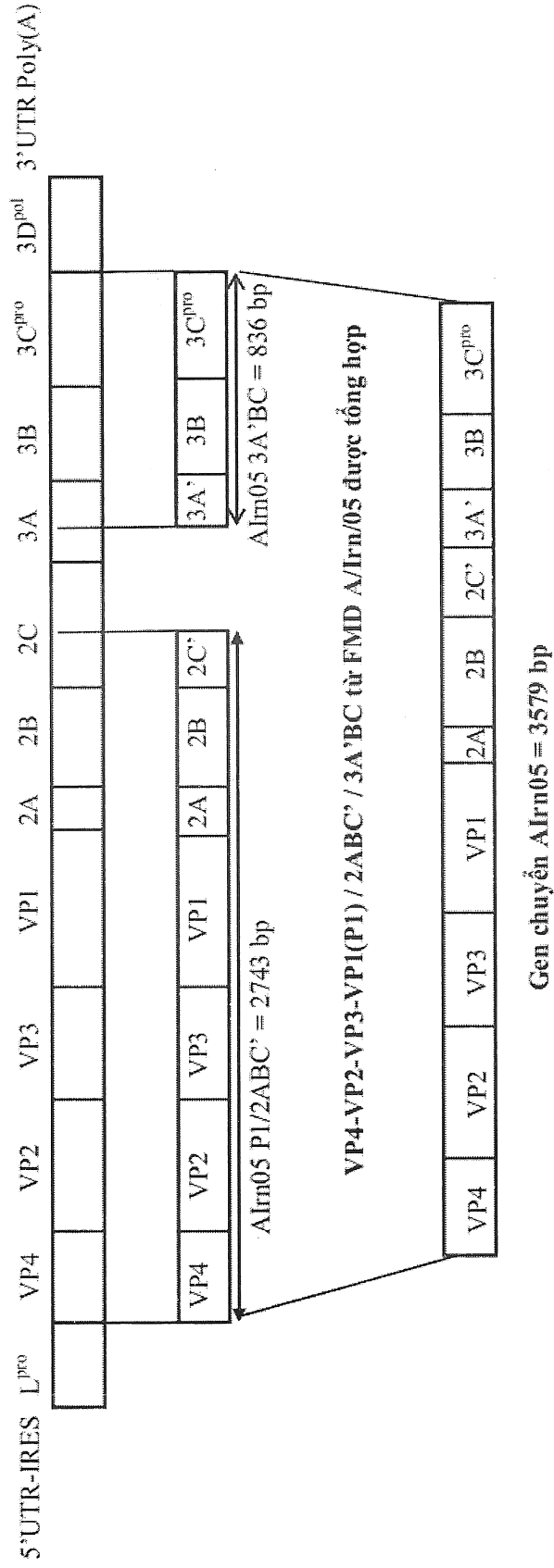
Virus gây bệnh lở mồm long móng typ huyết thanh O1/Man/87



Gen chuyển OIM87 được tách đồng cấp hai vào trong plasmit vận chuyển để biểu hiện các thành phần protein cấu trúc và không cấu trúc của FMD

Fig.6

Virut gây bệnh lở mồm long móng typ huyết thanh A/Irn/05



Gen chuyển A/Irn05 được tách dòng cấp hai vào trong plasmit vận chuyển để biểu hiện các thành phần protein cấu trúc và không cấu trúc của FMD

Fig.7

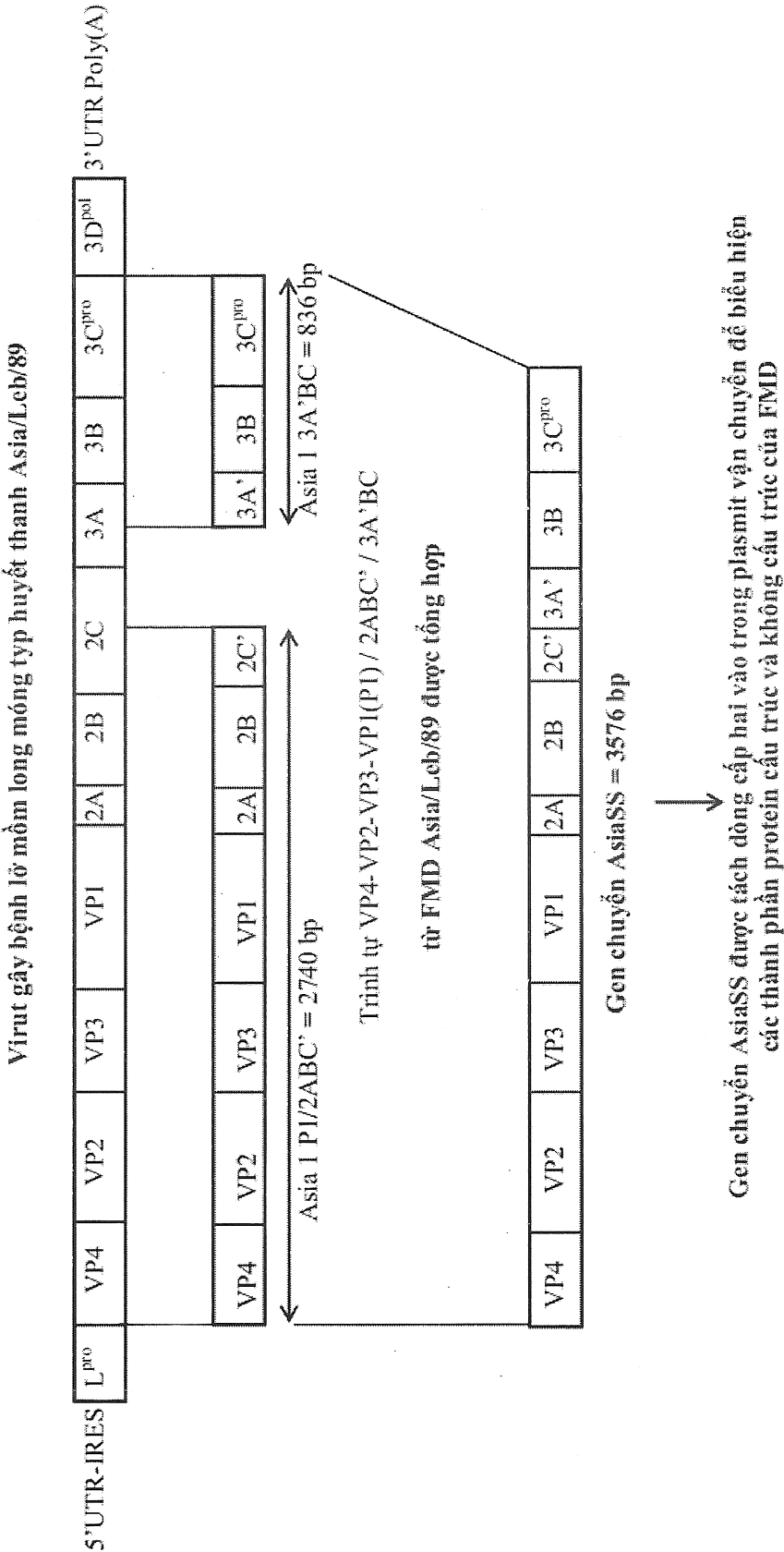


Fig.8

**Tỷ lệ phần trăm bảo vệ bằng vaccin FMDV typ huyết thanh O
với các liều khác nhau**

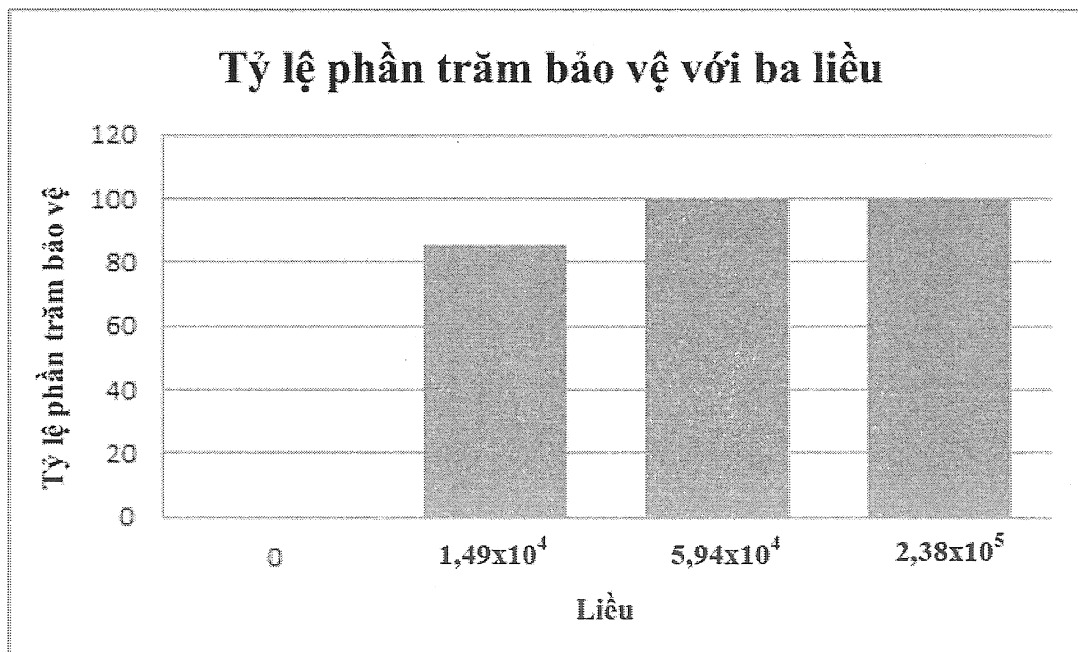


Fig.9

Huyết thanh học của vaccin FMDV typ huyết thanh O với các liều khác nhau

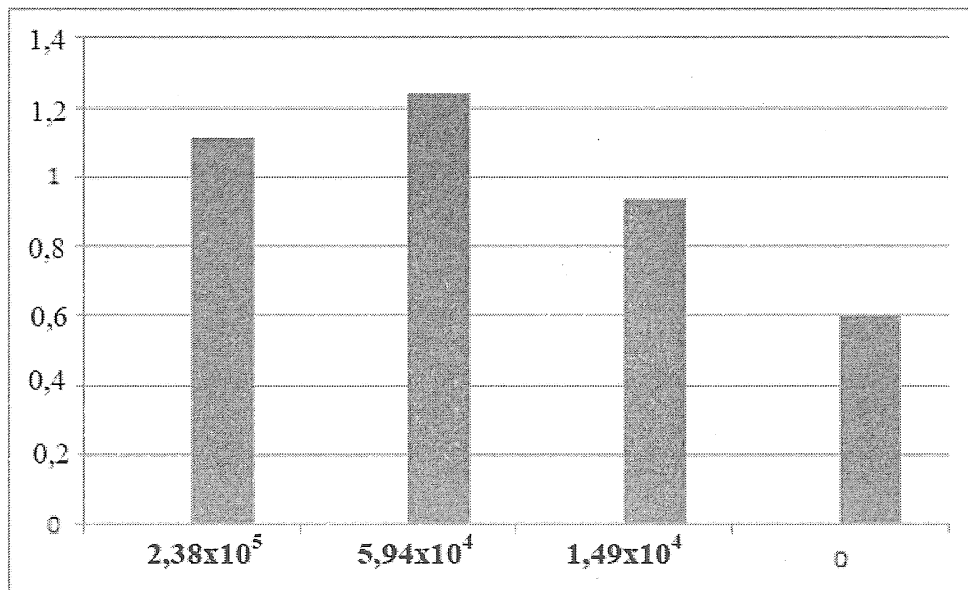


Fig.10

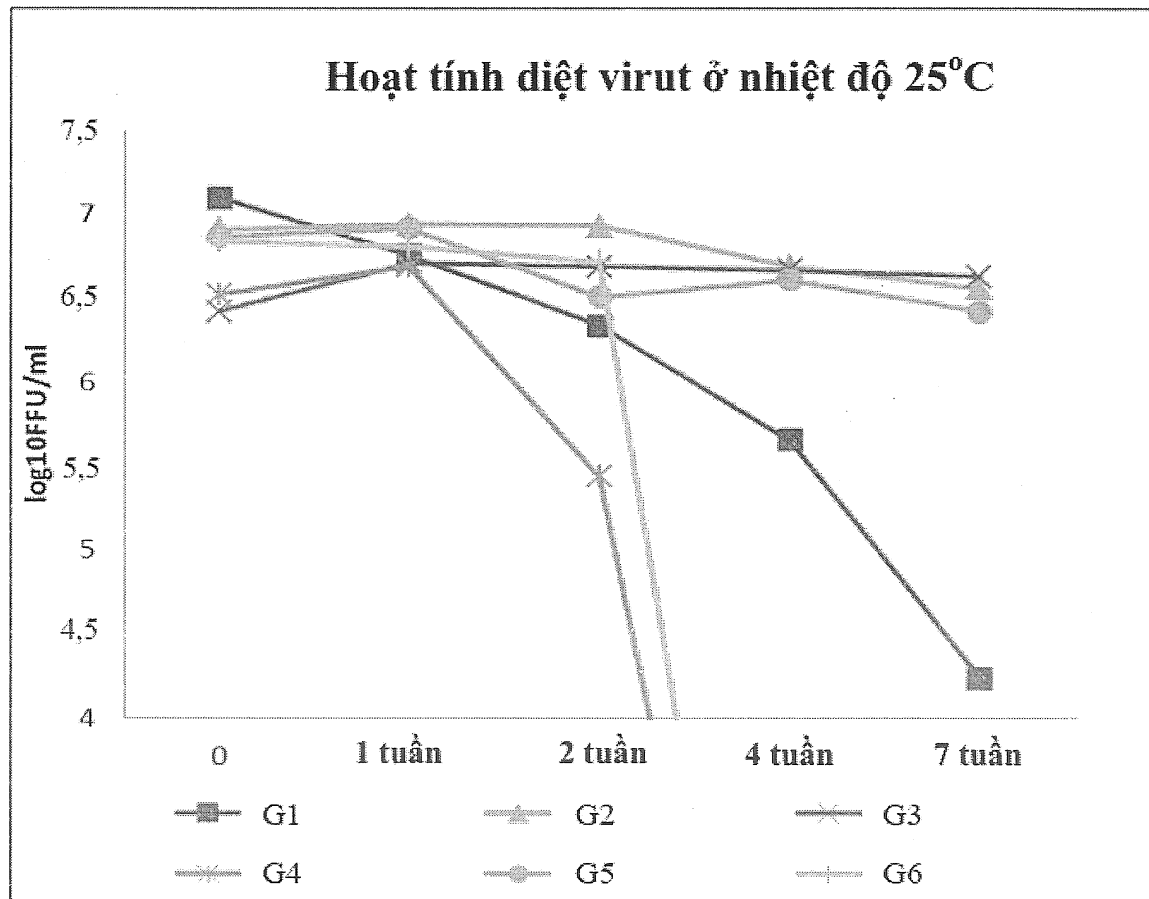


Fig.11

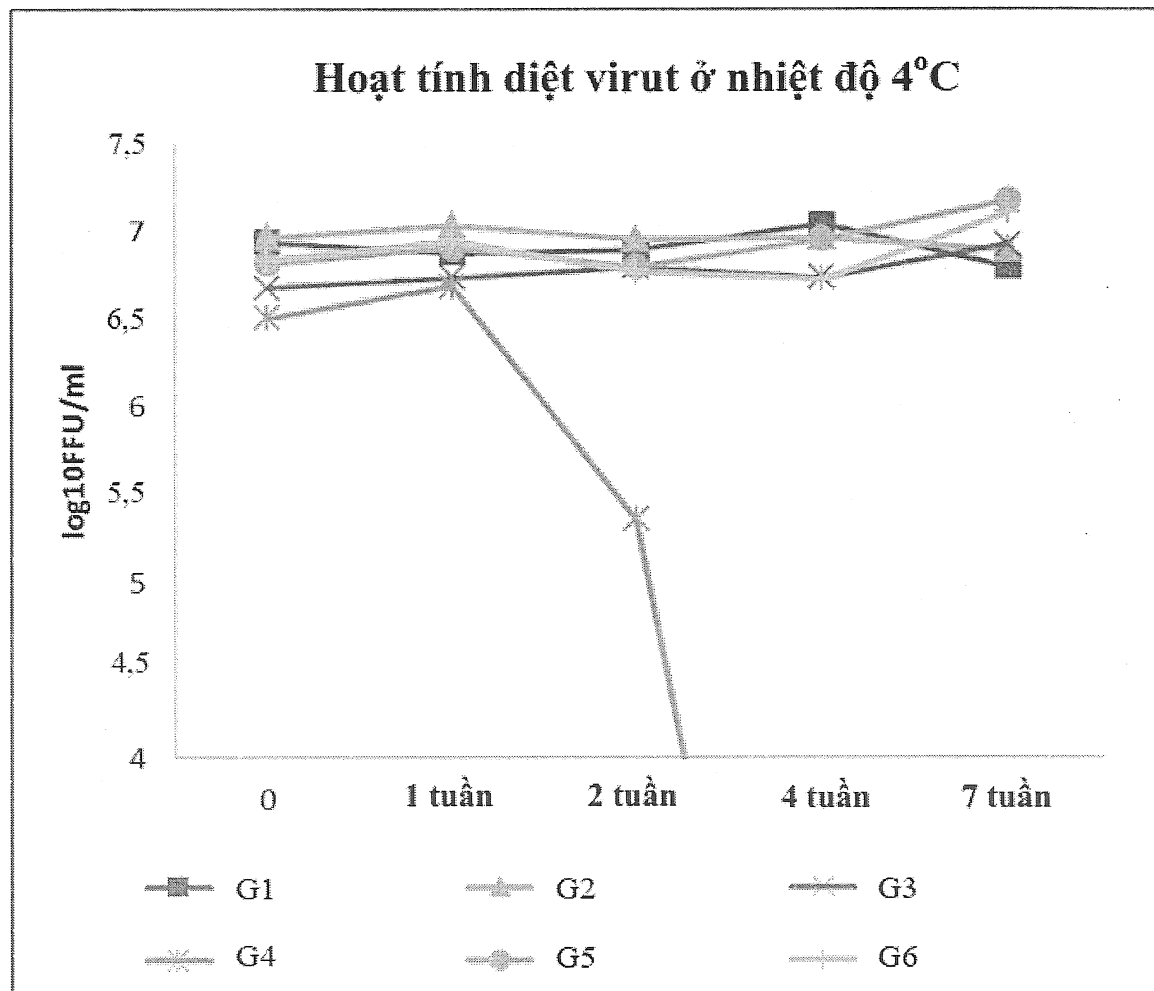


Fig.12

Trung bình nhân nồng độ chuẩn EMDV VN log 10

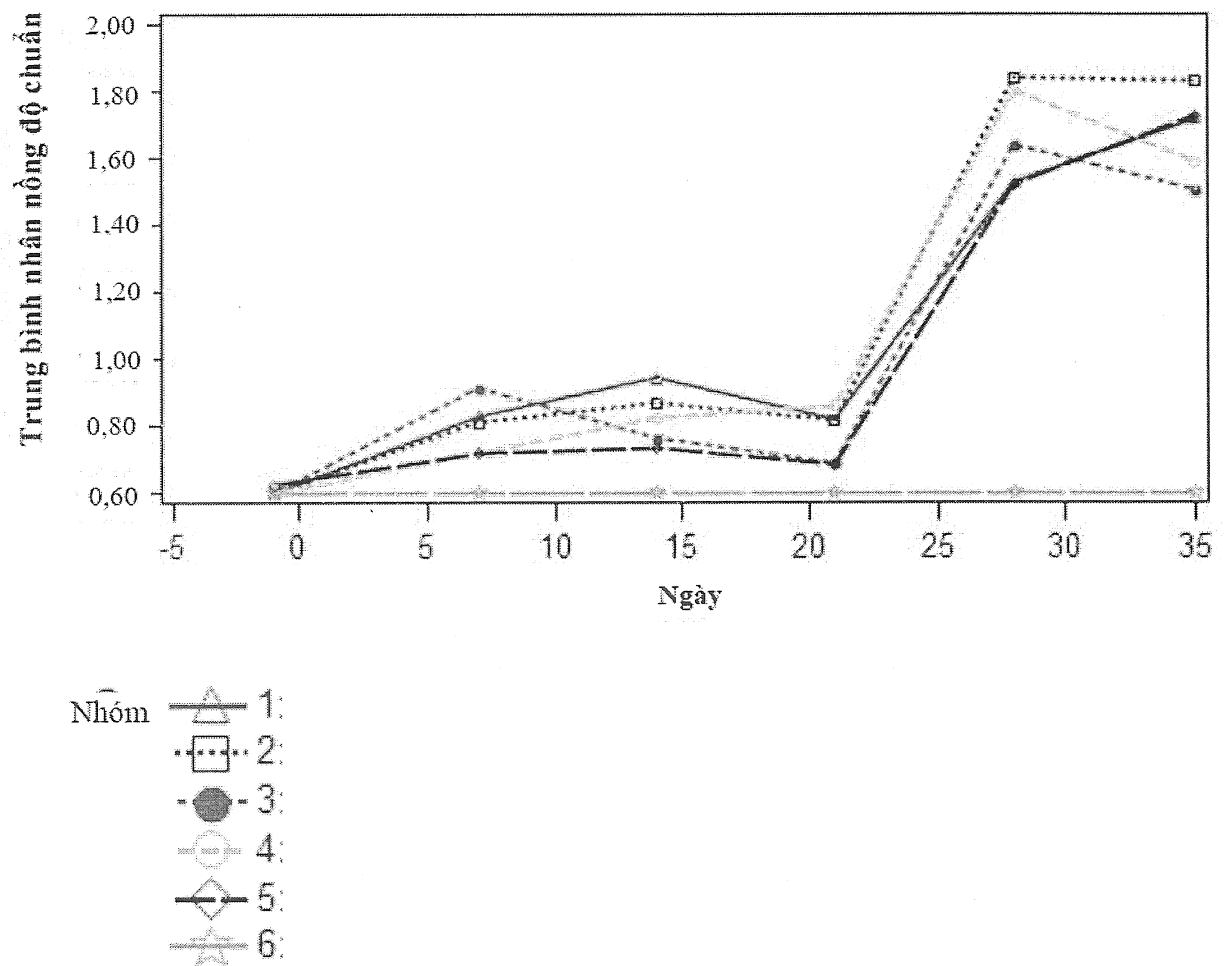
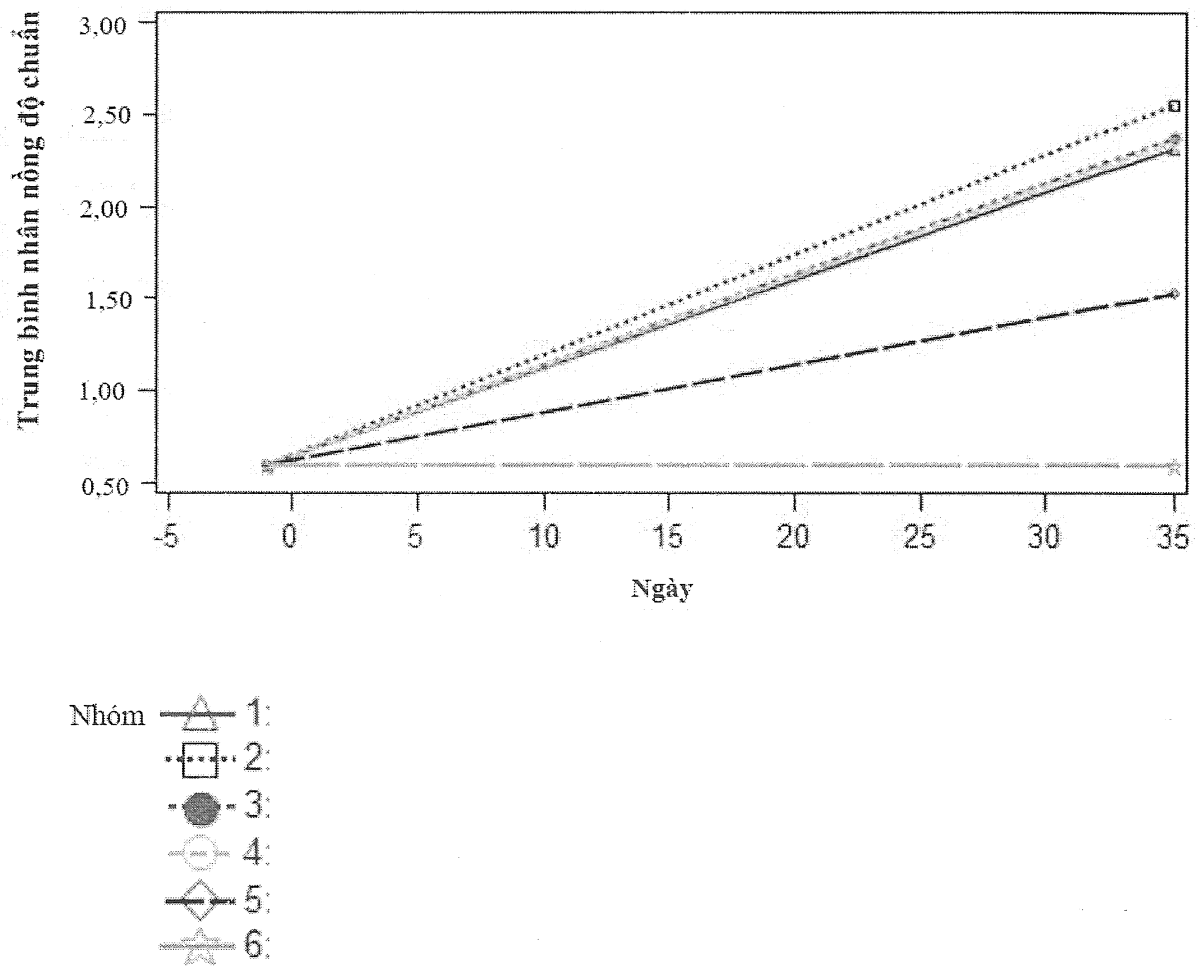
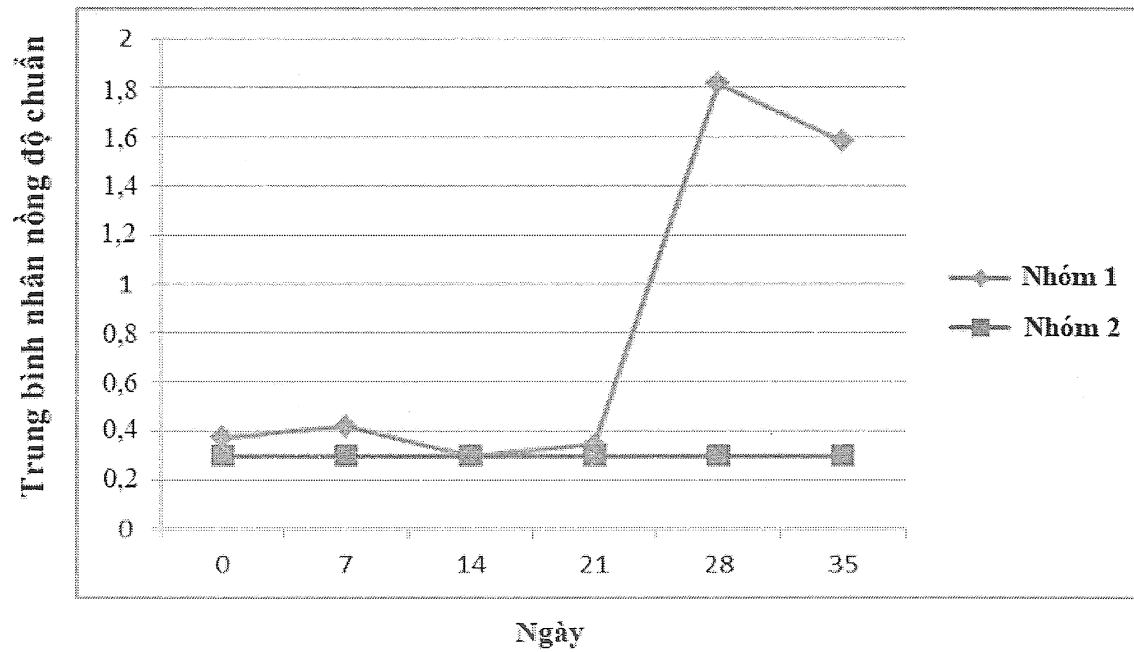


Fig.13

Trung bình nhân nồng độ chuẩn SAV log 10

**Fig.14**

Trung bình nhân nồng độ chuẩn FMDV VN log 10**Fig.15**

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Merial, Inc.
 GENVEC LLC
 THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY OF
 HOMELAND SECURITY
 <120> CHẾ PHẨM SINH MIỄN DỊCH CHỨA VECTO VIRUT TÁI TỔ HỢP
 <130> MER 15-277.PCT
 <150> 62/288,540
 <151> 2016-01-29
 <160> 8
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 3381
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Polynucleotit mã hóa kháng nguyên FMDV A24-A12 thể khảm
 <400> 1
 atgaacacaa ctgactgttt tatcgctttg gtgcacgcaa tcagagagat cagagcactt 60
 ttcttaccac gaaccacagg aaagatggaa ctccacctgt acaacggcga gaaaaagact 120
 ttctactcca gacctaacaa ccacgacaac tgttggttga acactgtcct tcagttgttc 180
 aggtatgtcg atgagccctt ctctgactgg gtctacaact cacctgagaa cctcacgctc 240
 gaagccatcg agcaatttga ggaactcaca ggacttgagc tgcacgaagg tgggccgccc 300
 gccctcgtga tctggaacat caaacacttg ctccacacgg gcacggcac agcctcacga 360
 cccagttagg tgtcctgggt gaacggtacg gacatgtgtc ttgccgactt ccacgcaggc 420
 attttcctga agggacagga acacgcagtc tttgcatgtg tcacctccaa cgggtgtgtac 480
 gcgattgatg atgaggaatt ttaccctcgg acgcctgacc cgtcagacgt cctggtgttt 540
 gtcccatcac accaagagcc actcaacggg gactggaaag cgatgttcca gaggaagcct 600
 aagggcgccg ggcaatccag ccggcgacc ggctctcaga accagtctgg caacactggc 660
 agcataatca ataactacta catgcagcag taccagaact ccatggacac gcagcttggg 720
 gacaatgcc a tcagtgagg ctccaacgaa ggctccacgg acacaacgctc aacacacaca 780
 accaacaccc aaaaacacga ctgggttttcg aaacttgcca gctcagcctt taccggctctg 840
 ttccggccct tgccttgccg caagaagacg gaagagacta cgcttctgga ggaccgcatt 900
 ctcaccaccc gcaacgggca caccatctcg accaccagc cgagtgtggg agtcacctac 960
 ggggtactcca ctggagaaga ccacgttgct gggcccaaca catcgggcct ggagacgcgg 1020
 gtggtgcagg ctgagagatt ttacaaaaag tttttgtttg attggacaac ggataagcct 1080
 tttggacatt tggaaaagtt ggaacttccc accgaccacc acggtgtttt cgggcacttg 1140
 gtggaatcgt atgcctacat gaaaaacggt tgggacgttg aggtgtctgc tgttggcaac 1200
 cagttcaacg gcgggtgtct cctggtggct atggtaccgg agtggaagga gtttgaacaa 1260
 cgtgagaagt accagctcac cctctttccc caccagttca ttagccccag aacaaacatg 1320
 actgccaca tttactgtcc ataccttga gtgaacaggt acgaccagta caagaaacac 1380
 aaaccttga cctggttgt tatggtatg tgcctctta cagttagcag cactgccgcg 1440
 gcacagatta aggtctacgc caacattgct ccaacctacg ttcacgtggc cggggaacta 1500
 ccctcgaagg aggggatttt ccggttgca tgttcggacg gttacggagg actggtgaca 1560
 acagaccga aaacagctga cctgcctac ggcaaggtgt acaaccgcgc caggaataac 1620
 taccgccggc ggttcaccaa ctgttggtac gtggctgaag cgtgtcccac tttcctctgt 1680
 ttcgacgacg ggaaccgta cgtcgttacg cggacagatg acacacgact cttagccaag 1740
 ttcgacgttt cccttgccgc aaaacacatg tccaacacgt acctgtcagg gatagcacag 1800
 tactatacac agtactctgt taccatcaac ttgcacttca tgtttacagg ttcaacagat 1860
 tcaaaaggcc ttactacatg ggctacatc ccgccccggg tgggaagtgc accggacaca 1920
 cctgaaaggg ctgcccactg tatccacgct gaatgggaca caggactgaa ctccaaattc 1980
 actttttcaa tcccgtagct gtccgcccga gattacgctg acaccgcgtc tgacacggca 2040
 gaaacaacca acgtacaggg ctgggtctgc atttaccaga ttacacacgg gaaggccgag 2100
 aacgacacac tagtcgtgtc ggcacgccc ggcaaggact ttgagttgag cctcccagatt 2160
 gaccgcgcag ggcaaacac cgctgttggg gagtccgcag accctgtcac caccacgctg 2220
 gagaactacg gcggtgagac acagaccag aggcgacatc atacagatgt cagtttcac 2280
 atggacagat ttgtgaaaaa aaacagcttg agtcccacac atgtcattga cctcatgcag 2340
 acccaccaac accggctggg gggcgcgctg ctgcgtgcag ccacgtacta cttctccgac 2400
 ttggagattg ttgtgcggca tgacggtaat ttgacttggg tgcccaacgg tgcgcctgaa 2460
 gcagctttgt caaacaccag caacccact gcctacaaca aggcaccggt cacgaggctc 2520
 gctctccctt aactgcgcc acaccggcg tgtaatgacg tgaactccga gcctgcccg 2580
 cccgctgaag agcaaccaca agctgaagga cctataccg ggccactcga gcgtcagaga 2640
 cctctgaaag tgagagctaa gctcccacag caggaaggac cttacgctgg cccgttgag 2700
 agacagaaac cgtgaaagt gaaagcaaaa gccccgctg tcaagggaag accttacgag 2760
 ggaccgggtga agaagcctgt cgttttgaag gtgaaagcta agaacttgat agtactgag 2820
 agtgggtccc caccgaccga cttgcaaaag atggctatgg gcaacacaaa gcctgttgag 2880
 ctcatccttg acgggaagac agtagccatc tgttgtgtca ctggagtggt tggcactgct 2940
 tacctcgtgc ctctcatct tttcgagag aagtatgaca agatcatgct ggatggcaga 3000
 gccatgacag acagtgacta cagagtgttt gagtttgaga ttaaagtaaa aggacaggac 3060
 atgctctcag acgctgcgct catggtgctc caccgtggga accgcgtgag agatatcacg 3120
 aaacactttc gtgatacagc aagaatgaag aaaggcacc ccgtcgtcgg tgtggtcaac 3180
 aacgccgacg ttgggagact gattttctct ggtgaggccc tcacctacaa ggatattgta 3240
 gtgtgcatgg acggagacac catgcctggc ctctttgctt acaaagccgc caccaaggca 3300
 ggctactgtg gaggagccgt tctcgccaag gacggggcgg acactttcat cgtcggcact 3360
 cactccgag gaggcaatgg a
 <210> 2
 <211> 1127

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> kháng nguyên FMDV A24-A12 thể khảm A24 P1-2A2B/A12 3B3C
 <400> 2

Met	Asn	Thr	Thr	Asp	Cys	Phe	Ile	Ala	Leu	Val	His	Ala	Ile	Arg	Glu
1				5					10				15		
Ile	Arg	Ala	Leu	Phe	Leu	Pro	Arg	Thr	Thr	Gly	Lys	Met	Glu	Leu	Thr
		20					25					30			
Leu	Tyr	Asn	Gly	Glu	Lys	Lys	Thr	Phe	Tyr	Ser	Arg	Pro	Asn	Asn	His
	35					40					45				
Asp	Asn	Cys	Trp	Leu	Asn	Thr	Val	Leu	Gln	Leu	Phe	Arg	Tyr	Val	Asp
	50				55				60						
Glu	Pro	Phe	Phe	Asp	Trp	Val	Tyr	Asn	Ser	Pro	Glu	Asn	Leu	Thr	Leu
65				70					75					80	
Glu	Ala	Ile	Glu	Gln	Leu	Glu	Glu	Leu	Thr	Gly	Leu	Glu	Leu	His	Glu
		85					90						95		
Gly	Gly	Pro	Pro	Ala	Leu	Val	Ile	Trp	Asn	Ile	Lys	His	Leu	Leu	His
		100					105						110		
Thr	Gly	Ile	Gly	Thr	Ala	Ser	Arg	Pro	Ser	Glu	Val	Cys	Met	Val	Asp
	115					120					125				
Gly	Thr	Asp	Met	Cys	Leu	Ala	Asp	Phe	His	Ala	Gly	Ile	Phe	Leu	Lys
	130				135						140				
Gly	Gln	Glu	His	Ala	Val	Phe	Ala	Cys	Val	Thr	Ser	Asn	Gly	Trp	Tyr
145				150					155					160	
Ala	Ile	Asp	Asp	Glu	Phe	Tyr	Pro	Trp	Thr	Pro	Asp	Pro	Ser	Ser	Asp
		165					170						175		
Val	Leu	Val	Phe	Val	Pro	Tyr	Asp	Gln	Glu	Pro	Leu	Asn	Gly	Asp	Trp
		180					185						190		
Lys	Ala	Met	Val	Gln	Arg	Lys	Leu	Lys	Gly	Ala	Gly	Gln	Ser	Ser	Pro
	195					200						205			
Ala	Thr	Gly	Ser	Gln	Asn	Gln	Ser	Gly	Asn	Thr	Gly	Ser	Ile	Ile	Asn
	210				215						220				
Asn	Tyr	Tyr	Met	Gln	Gln	Tyr	Gln	Asn	Ser	Met	Asp	Thr	Gln	Leu	Gly
225				230					235					240	
Asp	Asn	Ala	Ile	Ser	Gly	Gly	Ser	Asn	Glu	Gly	Ser	Thr	Asp	Thr	Thr
		245						250					255		
Ser	Thr	His	Thr	Thr	Asn	Thr	Gln	Asn	Asn	Asp	Trp	Phe	Ser	Lys	Leu
		260					265						270		
Ala	Ser	Ser	Ala	Phe	Thr	Gly	Leu	Phe	Gly	Ala	Leu	Leu	Ala	Asp	Lys
		275					280					285			
Lys	Thr	Glu	Glu	Thr	Thr	Leu	Leu	Glu	Asp	Arg	Ile	Leu	Thr	Thr	Arg
	290					295					300				
Asn	Gly	His	Thr	Ile	Ser	Thr	Thr	Gln	Ser	Ser	Val	Gly	Val	Thr	Tyr
305				310					315					320	
Gly	Tyr	Ser	Thr	Gly	Glu	Asp	His	Val	Ala	Gly	Pro	Asn	Thr	Ser	Gly
		325						330					335		
Leu	Glu	Thr	Arg	Val	Val	Gln	Ala	Glu	Arg	Phe	Tyr	Lys	Lys	Phe	Leu
		340					345						350		
Phe	Asp	Trp	Thr	Thr	Asp	Lys	Pro	Phe	Gly	His	Leu	Glu	Lys	Leu	Glu
	355					360					365				
Leu	Pro	Thr	Asp	His	His	Gly	Val	Phe	Gly	His	Leu	Val	Glu	Ser	Tyr
	370				375						380				
Ala	Tyr	Met	Arg	Asn	Gly	Trp	Asp	Val	Glu	Val	Ser	Ala	Val	Gly	Asn
385				390					395					400	
Gln	Phe	Asn	Gly	Gly	Cys	Leu	Leu	Val	Ala	Met	Val	Pro	Glu	Trp	Lys
		405						410					415		
Glu	Phe	Glu	Gln	Arg	Glu	Lys	Tyr	Gln	Leu	Thr	Leu	Phe	Pro	His	Gln
		420						425					430		
Phe	Ile	Ser	Pro	Arg	Thr	Asn	Met	Thr	Ala	His	Ile	Thr	Val	Pro	Tyr
	435					440						445			
Leu	Gly	Val	Asn	Arg	Tyr	Asp	Gln	Tyr	Lys	Lys	His	Lys	Pro	Trp	Thr
	450				455						460				
Leu	Val	Val	Met	Val	Val	Ser	Pro	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Thr	Ala	Ala
465				470					475					480	
Ala	Gln	Ile	Lys	Val	Tyr	Ala	Asn	Ile	Ala	Pro	Thr	Tyr	Val	His	Val
		485						490					495		
Ala	Gly	Glu	Leu	Pro	Ser	Lys	Glu	Gly	Ile	Phe	Pro	Val	Ala	Cys	Ser
		500					505						510		
Asp	Gly	Tyr	Gly	Gly	Leu	Val	Thr	Thr	Asp	Pro	Lys	Thr	Ala	Asp	Pro
	515					520						525			
Ala	Tyr	Gly	Lys	Val	Tyr	Asn	Pro	Pro	Arg	Asn	Asn	Tyr	Pro	Gly	Arg
	530				535							540			
Phe	Thr	Asn	Leu	Leu	Asp	Val	Ala	Glu	Ala	Cys	Pro	Thr	Phe	Leu	Cys
545				550					555					560	
Phe	Asp	Asp	Gly	Lys	Pro	Tyr	Val	Val	Thr	Arg	Thr	Asp	Asp	Thr	Arg
		565						570					575		
Leu	Leu	Ala	Lys	Phe	Asp	Val	Ser	Leu	Ala	Ala	Lys	His	Met	Ser	Asn
		580					585						590		


```

Thr Tyr Leu Ser Gly Ile Ala Gln Tyr Tyr Thr Gln Tyr Ser Gly Thr
595 600 605
Ile Asn Leu His Phe Met Phe Thr Gly Ser Thr Asp Ser Lys Ala Arg
610 615 620
Tyr Met Val Ala Tyr Ile Pro Pro Gly Val Glu Val Pro Pro Asp Thr
625 630 635 640
Pro Glu Arg Ala Ala His Cys Ile His Ala Glu Trp Asp Thr Gly Leu
645 650 655
Asn Ser Lys Phe Thr Phe Ser Ile Pro Tyr Val Ser Ala Ala Asp Tyr
660 665 670
Ala Tyr Thr Ala Ser Asp Thr Ala Glu Thr Thr Asn Val Gln Gly Trp
675 680 685
Val Cys Ile Tyr Gln Ile Thr His Gly Lys Ala Glu Asn Asp Thr Leu
690 695 700
Val Val Ser Ala Ser Ala Gly Lys Asp Phe Glu Leu Arg Leu Pro Ile
705 710 715 720
Asp Pro Arg Arg Gln Thr Thr Ala Val Gly Glu Ser Ala Asp Pro Val
725 730 735
Thr Thr Thr Val Glu Asn Tyr Gly Gly Glu Thr Gln Thr Gln Arg Arg
740 745 750
His His Thr Asp Val Ser Phe Ile Met Asp Arg Phe Val Lys Ile Asn
755 760 765
Ser Leu Ser Pro Thr His Val Ile Asp Leu Met Gln Thr His Gln His
770 775 780
Gly Leu Val Gly Ala Leu Leu Arg Ala Ala Thr Tyr Tyr Phe Ser Asp
785 790 795 800
Leu Glu Ile Val Val Arg His Asp Gly Asn Leu Thr Trp Val Pro Asn
805 810 815
Gly Ala Pro Glu Ala Ala Leu Ser Asn Thr Ser Asn Pro Thr Ala Tyr
820 825 830
Asn Lys Ala Pro Phe Thr Arg Leu Ala Leu Pro Tyr Thr Ala Pro His
835 840 845
Arg Ala Cys Asn Asp Val Asn Ser Glu Pro Ala Arg Pro Ala Glu Glu
850 855 860
Gln Pro Gln Ala Glu Gly Pro Tyr Thr Gly Pro Leu Glu Arg Gln Arg
865 870 875 880
Pro Leu Lys Val Arg Ala Lys Leu Pro Gln Gln Glu Gly Pro Tyr Ala
885 890 895
Gly Pro Leu Glu Arg Gln Lys Pro Leu Lys Val Lys Ala Lys Ala Pro
900 905 910
Val Val Lys Glu Gly Pro Tyr Glu Gly Pro Val Lys Lys Pro Val Ala
915 920 925
Leu Lys Val Lys Ala Lys Asn Leu Ile Val Thr Glu Ser Gly Ala Pro
930 935 940
Pro Thr Asp Leu Gln Lys Met Val Met Gly Asn Thr Lys Pro Val Glu
945 950 955 960
Leu Ile Leu Asp Gly Lys Thr Val Ala Ile Cys Cys Ala Thr Gly Val
965 970 975
Phe Gly Thr Ala Tyr Leu Val Pro Arg His Leu Phe Ala Glu Lys Tyr
980 985 990
Asp Lys Ile Met Leu Asp Gly Arg Ala Met Thr Asp Ser Asp Tyr Arg
995 1000 1005
Val Phe Glu Phe Glu Ile Lys Val Lys Gly Gln Asp Met Leu Ser
1010 1015 1020
Asp Ala Ala Leu Met Val Leu His Arg Gly Asn Arg Val Arg Asp
1025 1030 1035
Ile Thr Lys His Phe Arg Asp Thr Ala Arg Met Lys Lys Gly Thr
1040 1045 1050
Pro Val Val Gly Val Val Asn Asn Ala Asp Val Gly Arg Leu Ile
1055 1060 1065
Phe Ser Gly Glu Ala Leu Thr Tyr Lys Asp Ile Val Val Cys Met
1070 1075 1080
Asp Gly Asp Thr Met Pro Gly Leu Phe Ala Tyr Lys Ala Ala Thr
1085 1090 1095
Lys Ala Gly Tyr Cys Gly Gly Ala Val Leu Ala Lys Asp Gly Ala
1100 1105 1110
Asp Thr Phe Ile Val Gly Thr His Ser Ala Gly Gly Asn Gly
1115 1120 1125

```

<210> 3

<211> 3585

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Polynucleotit tổng hợp mã hóa kháng nguyên FMDV O1M87

<400> 3

```

atgggagccg ggcaatccag cccggcaacc gggtcacaga accaatcagg caacactggg 60
agcatcatca acaattacta catgcagcag taccaaaact ccatggacac acaacttggt 120
gacaacgcta caagcggagg ctcaaacgag gggtccacgg acacaacctc caccacaca 180
accaaacctc agaacaacga ctggttctcg aagctggcca gttccgcttt cagcgggtctt 240

```

```

ttcggcgctc ttctcgccga caagaaaacc gaggagacca ctcttctcga ggaccgcac 300
ctcactactc gtaacgggaca caccacctcg acaacccagt cgagcggttg agtcacgtac 360
gggtatgcaa cagctgagga tttcgtgagc gggccaaaca cctctggtct cgagaccagg 420
gttggccagg cagagcggtt ctttaaaacc cactgttcg actgggtcac cagtgaccgc 480
ttcggacggt gccacctgct ggaacttcca actgaccaca aaggtgtcta cggcagcctg 540
accgactcgt atgcttatat gaggaacggc tgggatgttg aagtcaactgc agtgggaaac 600
cagttcaatg gaggtatgct gttggtggcc atggtgccag aactttgtct catacagaag 660
agggagctgt accagctcac gctctttcct caccagttca tcaaccctcg gacgaacatg 720
acagcacaca tcaactgtgcc ctttgttggt gtcaaccgtt atgaccagta caaggtacac 780
aaaccttgga ccctcgtggt tatggttgta gccccctga ccgtcaacag tgaaggtgcc 840
ccgcaaatca aggtgtatgc caacatcgca cctaccaacg tacacgtcgc ggggtgagttc 900
ccttccaaag aggggatctt ccctgtggct tgcagcgatg gttatggcgg tctggtgacc 960
actgacccca aaacggctga ccccgcttac gggaaagtgt ttaaccccc ccgcaacatg 1020
ttgcgggggc ggttcaccaa ttttcttgac gtgctgagg cgtgccccac gtttctccac 1080
ttcgaggggt acgtgccata cgtgaccacg aagacggatt cagacagggt gctcgctcag 1140
ttcgacttgt ctttggcagc aaagcacatg tcgaacacct tccttgagg tctcgcccag 1200
tactacacac agtacagcgg caccatcaac ctgcacttca tgttcacagg gcctactgac 1260
gcgaaggcgc gttacatgat tgcgtatgct cctcctggca tggaaaccac taaaacgcca 1320
gaggcggtgc cccactgcat tcatgctgaa tgggacacag ggttgaactc aaaattcaca 1380
ttttcaatcc cttacttttc ggcggctgat tacgcttaca cagcgtctga cactgctgag 1440
accacaaatg tacagggatg ggtttgcctg tttcaataaa cacacgggaa agctgacggc 1500
gacgcactgg tcgttttggc tagcgccgga aaggacttgc agctgcccct gccggtggat 1560
gctcgcacac agactacctc cgcgggcgag tcagctgacc ccgtgaccgc caccgttgag 1620
aattacgggt gcgagacaca ggtccagagg cgcaacaca cggacgtctc atttatatta 1680
gacagatttg tgaagtgac accaaaagac caaatatag tattggacct gatgcaaacc 1740
cctgctcaca ctttgggtgg agcactcctt cgtactgcca cttactattt cgctgactta 1800
gaggtggcga tgaagcacga gggaaacctc acctgggtcc cgaacggggc gcctgaagcg 1860
gcgttggaac acaccaccaa cccaacagct taccacaagg caccactcac ccgacttgca 1920
ctgccttaca cggcgccaca ccgcgtgttg gctactgttt acaacgggaa cagcaagtat 1980
ggtgacggca cgggtggcaa tgtgagaggt gacctgcaag tgttggcca gaaggcggcg 2040
agagcgctgc ctactcctt caactacggt gccattaaag ctactcgggt gactgaactg 2100
ctttacgcga tgaagagggc tgagacatac tgtccccggc ctcttttggc cattcacccg 2160
gaccaggcta gacacaagca gaagattgtg gcaccgggtg aacagcttct aaattttgac 2220
ctgctcaaat tggcgggaga tgtggagtcc aacctgggc ccttcttctt ctccgacgtc 2280
aggtcaaat tctcaaaact ggtagaaacc atcaatcaga tgcaggagga catgtcaaca 2340
aaacacgggc ctgactttaa ccggttggtg tccgcatttg aggaattggc cactggagtg 2400
aaggctatca gggcggttct cgacgaggcc aaacctggtt acaaaactcat caagctcctg 2460
agcgcgttgc catgcatggc cgctgtagca gcacggtcaa aggaccagc ccttgtggcc 2520
atcatgctgg ctgacacggc tcttgagatt ctggacagca cctttgtcgt gaagaagatc 2580
tccgactcgc tctccagtct ctttcacgtg ccggcccccg tcttcagttt cggagccccg 2640
attctgttgg ccgggttggt caaagtcgcc tcgagtttct tccggtccac acccgaagac 2700
cttgagagag cagaaaaaca gctcaaagca cgtgacatta acgacatact tgagcgtcag 2760
aaacctctga gagtgaaaac caagttgcca caacaggagg gacctacgc tggcccgatg 2820
gatagacaga aaccgttgaa agtgagagca agagccccgg tctgtaagga gggaccctac 2880
gagggaccgg tgaagaagcc tgtcgctttg aaagtgaag ccaagaactt gattgtcact 2940
gagagtgggt cccccaccgc cgacttgca aagatggtca tgggcaacac taagcctgtt 3000
gagctcatcc tcgacgggaa atctgctgtg ctaccggagt gtttggcact 3060
gcctacctcg tacctcgtca cctcttcgag gagaagtacg acaagataat gttggacggt 3120
agagccatga cagacagtga ctacagagt tttgagtttg agattaaagt aaaaggacag 3180
gacatgctct cagacgtcgc actcatggtg cttcaccgtg ggaaccgcgt gagagacatc 3240
acgaaacatt ttcgtgacac agcaagaatg aagaaaggca cccccgttgc cgtgtgtatc 3300
aacaacgcgc acgttgggag actgattttc tctggagagg cccttaccta caaagacatt 3360
gtagtgtgca tggatggaga caccatgccg ggctgtttg cctacagagc cgccaccaag 3420
gctggttact gcggggggag cgttctcgcc aaggacggag ccgacacatt catcgttggc 3480
actcactccg caggtggtga cggagttgga tactgctcgt gcgtgtccag gtccatgctc 3540
ctgaaaaatga aggcacacat tgacctgaa ccacaccacg agtag 3585

```

<210> 4

<211> 1194

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> kháng nguyên FMDV O1M87

<400> 4

```

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

```

Val	Ser	Gly	Pro	Asn	Thr	Ser	Gly	Leu	Glu	Thr	Arg	Val	Ala	Gln	Ala
130						135					140				
Glu	Arg	Phe	Phe	Lys	Thr	His	Leu	Phe	Asp	Trp	Val	Thr	Ser	Asp	Pro
145					150					155					160
Phe	Gly	Arg	Cys	His	Leu	Leu	Glu	Leu	Pro	Thr	Asp	His	Lys	Gly	Val
			165						170					175	
Tyr	Gly	Ser	Leu	Thr	Asp	Ser	Tyr	Ala	Tyr	Met	Arg	Asn	Gly	Trp	Asp
		180						185					190		
Val	Glu	Val	Thr	Ala	Val	Gly	Asn	Gln	Phe	Asn	Gly	Gly	Cys	Leu	Leu
	195						200					205			
Val	Ala	Met	Val	Pro	Glu	Leu	Cys	Ser	Ile	Gln	Lys	Arg	Glu	Leu	Tyr
	210				215						220				
Gln	Leu	Thr	Leu	Phe	Pro	His	Gln	Phe	Ile	Asn	Pro	Arg	Thr	Asn	Met
225					230						235				240
Thr	Ala	His	Ile	Thr	Val	Pro	Phe	Val	Gly	Val	Asn	Arg	Tyr	Asp	Gln
			245						250					255	
Tyr	Lys	Val	His	Lys	Pro	Trp	Thr	Leu	Val	Val	Met	Val	Val	Ala	Pro
		260						265						270	
Leu	Thr	Val	Asn	Ser	Glu	Gly	Ala	Pro	Gln	Ile	Lys	Val	Tyr	Ala	Asn
	275						280					285			
Ile	Ala	Pro	Thr	Asn	Val	His	Val	Ala	Gly	Glu	Phe	Pro	Ser	Lys	Glu
	290					295					300				
Gly	Ile	Phe	Pro	Val	Ala	Cys	Ser	Asp	Gly	Tyr	Gly	Gly	Leu	Val	Thr
305					310					315					320
Thr	Asp	Pro	Lys	Thr	Ala	Asp	Pro	Ala	Tyr	Gly	Lys	Val	Phe	Asn	Pro
			325						330					335	
Pro	Arg	Asn	Met	Leu	Pro	Gly	Arg	Phe	Thr	Asn	Phe	Leu	Asp	Val	Ala
		340						345					350		
Glu	Ala	Cys	Pro	Thr	Phe	Leu	His	Phe	Glu	Gly	Asp	Val	Pro	Tyr	Val
	355						360					365			
Thr	Thr	Lys	Thr	Asp	Ser	Asp	Arg	Val	Leu	Ala	Gln	Phe	Asp	Leu	Ser
	370					375					380				
Leu	Ala	Ala	Lys	His	Met	Ser	Asn	Thr	Phe	Leu	Ala	Gly	Leu	Ala	Gln
385					390					395					400
Tyr	Tyr	Thr	Gln	Tyr	Ser	Gly	Thr	Ile	Asn	Leu	His	Phe	Met	Phe	Thr
			405					410						415	
Gly	Pro	Thr	Asp	Ala	Lys	Ala	Arg	Tyr	Met	Ile	Ala	Tyr	Ala	Pro	Pro
		420						425					430		
Gly	Met	Glu	Pro	Pro	Lys	Thr	Pro	Glu	Ala	Ala	Ala	His	Cys	Ile	His
	435						440					445			
Ala	Glu	Trp	Asp	Thr	Gly	Leu	Asn	Ser	Lys	Phe	Thr	Phe	Ser	Ile	Pro
	450					455					460				
Tyr	Leu	Ser	Ala	Ala	Asp	Tyr	Ala	Tyr	Thr	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Glu
465					470					475					480
Thr	Thr	Asn	Val	Gln	Gly	Trp	Val	Cys	Leu	Phe	Gln	Ile	Thr	His	Gly
			485					490					495		
Lys	Ala	Asp	Gly	Asp	Ala	Leu	Val	Val	Leu	Ala	Ser	Ala	Gly	Lys	Asp
		500						505					510		
Phe	Glu	Leu	Arg	Leu	Pro	Val	Asp	Ala	Arg	Thr	Gln	Thr	Thr	Ser	Ala
	515						520					525			
Gly	Glu	Ser	Ala	Asp	Pro	Val	Thr	Ala	Thr	Val	Glu	Asn	Tyr	Gly	Gly
	530					535					540				
Glu	Thr	Gln	Val	Gln	Arg	Gln	His	Thr	Asp	Val	Ser	Phe	Ile	Leu	
545					550					555					560
Asp	Arg	Phe	Val	Lys	Val	Thr	Pro	Lys	Asp	Gln	Ile	Asn	Val	Leu	Asp
			565						570					575	
Leu	Met	Gln	Thr	Pro	Ala	His	Thr	Leu	Val	Gly	Ala	Leu	Leu	Arg	Thr
		580						585					590		
Ala	Thr	Tyr	Tyr	Phe	Ala	Asp	Leu	Glu	Val	Ala	Val	Lys	His	Glu	Gly
	595						600					605			
Asn	Leu	Thr	Trp	Val	Pro	Asn	Gly	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Leu	Asp	Asn
	610					615					620				
Thr	Thr	Asn	Pro	Thr	Ala	Tyr	His	Lys	Ala	Pro	Leu	Thr	Arg	Leu	Ala
625					630					635					640
Leu	Pro	Tyr	Thr	Ala	Pro	His	Arg	Val	Leu	Ala	Thr	Val	Tyr	Asn	Gly
			645						650					655	
Asn	Ser	Lys	Tyr	Gly	Asp	Gly	Thr	Val	Ala	Asn	Val	Arg	Gly	Asp	Leu
		660						665					670		
Gln	Val	Leu	Ala	Gln	Lys	Ala	Ala	Arg	Ala	Leu	Pro	Thr	Ser	Phe	Asn
	675						680					685			
Tyr	Gly	Ala	Ile	Lys	Ala	Thr	Arg	Val	Thr	Glu	Leu	Leu	Tyr	Arg	Met
	690					695					700				
Lys	Arg	Ala	Glu	Thr	Tyr	Cys	Pro	Arg	Pro	Leu	Leu	Ala	Ile	His	Pro
705					710					715					720
Asp	Gln	Ala	Arg	His	Lys	Gln	Lys	Ile	Val	Ala	Pro	Val	Lys	Gln	Leu
			725						730					735	
Leu	Asn	Phe	Asp	Leu	Leu	Lys	Leu	Ala	Gly	Asp	Val	Glu	Ser	Asn	Pro
		740						745				750			
Gly	Pro	Phe	Phe	Phe	Ser	Asp	Val	Arg	Ser	Asn	Phe	Ser	Lys	Leu	Val

```

      755              760              765
Glu Thr Ile Asn Gln Met Gln Glu Asp Met Ser Thr Lys His Gly Pro
770              775              780
Asp Phe Asn Arg Leu Val Ser Ala Phe Glu Glu Leu Ala Thr Gly Val
785              790              795              800
Lys Ala Ile Arg Ala Gly Leu Asp Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Lys Leu
      805              810              815
Ile Lys Leu Leu Ser Arg Leu Ser Cys Met Ala Ala Val Ala Ala Arg
      820              825              830
Ser Lys Asp Pro Val Leu Val Ala Ile Met Leu Ala Asp Thr Gly Leu
      835              840              845
Glu Ile Leu Asp Ser Thr Phe Val Val Lys Lys Ile Ser Asp Ser Leu
850              855              860
Ser Ser Leu Phe His Val Pro Ala Pro Val Phe Ser Phe Gly Ala Pro
865              870              875              880
Ile Leu Leu Ala Gly Leu Val Lys Val Ala Ser Ser Phe Phe Arg Ser
      885              890              895
Thr Pro Glu Asp Leu Glu Arg Ala Glu Lys Gln Leu Lys Ala Arg Asp
      900              905              910
Ile Asn Asp Ile Leu Glu Arg Gln Lys Pro Leu Arg Val Lys Thr Lys
      915              920              925
Leu Pro Gln Gln Glu Gly Pro Tyr Ala Gly Pro Met Asp Arg Gln Lys
      930              935              940
Pro Leu Lys Val Arg Ala Arg Ala Pro Val Val Lys Glu Gly Pro Tyr
945              950              955              960
Glu Gly Pro Val Lys Lys Pro Val Ala Leu Lys Val Lys Ala Lys Asn
      965              970              975
Leu Ile Val Thr Glu Ser Gly Ala Pro Pro Thr Asp Leu Gln Lys Met
      980              985              990
Val Met Gly Asn Thr Lys Pro Val Glu Leu Ile Leu Asp Gly Lys Thr
      995              1000              1005
Val Ala Ile Cys Cys Ala Thr Gly Val Phe Gly Thr Ala Tyr Leu
      1010              1015              1020
Val Pro Arg His Leu Phe Ala Glu Lys Tyr Asp Lys Ile Met Leu
      1025              1030              1035
Asp Gly Arg Ala Met Thr Asp Ser Asp Tyr Arg Val Phe Glu Phe
      1040              1045              1050
Glu Ile Lys Val Lys Gly Gln Asp Met Leu Ser Asp Ala Ala Leu
      1055              1060              1065
Met Val Leu His Arg Gly Asn Arg Val Arg Asp Ile Thr Lys His
      1070              1075              1080
Phe Arg Asp Thr Ala Arg Met Lys Lys Gly Thr Pro Val Val Gly
      1085              1090              1095
Val Ile Asn Asn Ala Asp Val Gly Arg Leu Ile Phe Ser Gly Glu
      1100              1105              1110
Ala Leu Thr Tyr Lys Asp Ile Val Val Cys Met Asp Gly Asp Thr
      1115              1120              1125
Met Pro Gly Leu Phe Ala Tyr Arg Ala Ala Thr Lys Ala Gly Tyr
      1130              1135              1140
Cys Gly Gly Ala Val Leu Ala Lys Asp Gly Ala Asp Thr Phe Ile
      1145              1150              1155
Val Gly Thr His Ser Ala Gly Gly Asn Gly Val Gly Tyr Cys Ser
      1160              1165              1170
Cys Val Ser Arg Ser Met Leu Leu Lys Met Lys Ala His Ile Asp
      1175              1180              1185
Pro Glu Pro His His Glu
      1190

```

<210> 5

<211> 3579

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Polynucleotit mã hóa kháng nguyên FMDV Irn

<400> 5

```

atgggagccg ggcaatccag tccggcaacc gggtcacaaa accaatcagg taacactggg      60
agtatcatca acaactacta catgcagcag taccagaact ccatggacac acaacttgge      120
gacaaacgcca ttacggtggg ttccaacgag ggctccactg acactacctc cacacacaca      180
accaacacac agaacaatga ttggttttca aaattggcca gttctgcctt cagcgggtctc      240
ttcggcgctc ttctcgctga caaaaagaca gaggagacta ccctcctgga agaccgcatc      300
ctcaccaccc gcaacggaca caccacctcg acaacacagt cgagtgtggg agtcacctac      360
gggtactcca ctggggaaga ccagctctct ggacctaa caatctggcct ggagacgcga      420
gtggtacagg cagagagatt cttcaagaaa cacttgtttg attggacaac cgataaagct      480
tttggaacac tggaaaaact ggaactcccc actgaacaca aggggtgtcta cgggcacttg      540
gtggactctt tcgcatacat gagaaatggc tgggacgtgg aggtgaccgc cgttggcaac      600
cagttcaacg gtgggtgtct cctgggtggc atggtacctg agtggaaga gtttaccctt      660
cgtgagaaat accagctcac cctgtttcca caccaattta tcaaccccag aaccaacatg      720
acagcccaca tcacggtccc gtaccttggt gtcaataggt atgaccagta caaacagcac      780
aaaccctgga cactggctgt gatgggtggt tcgccactga ccaccagcag cattggagct      840
tcacagatca aggtctaagc caacattgcc ccaaccttcg ttcacgtggc cggcgagctc      900

```

```

ccatcgaagg aagggatcgt gccgggttget tgttcagacg ggtacgggtgg cctgggtgaca 960
acagaccgga aaacagctga ccctgtttat ggtatggtct acaaccgccc cagaaccaac 1020
taccctgggc gctttacaaa cttgttggac gtggccgagg cttgcccggac cttcctctgt 1080
tttgacgacg ggaaccgta cgttgtgaca aggacggacg accaacgtct cctggccaag 1140
tttgacgttt ctcttgetgc aaagcacatg tcaaacacct acctctcagg gatagcacag 1200
tactacacac agtactctgg cactatcaat ctgcacttca tgttcaactg cttacttgaa 1260
tcaaaaggccc ggtacatggt ggcgtacatt ccacctggca tggacacgcc accggacaca 1320
cctgagaagg ctgcacattg catccacgcc gagtgggaca ccgggctgaa ctccaaat 1380
actttttcta tcccgtagct gtctgtgca gactacgcat acactgcgtc tgacgtggca 1440
gaaacaacaa acgtacaggg gtgggtctgc atatacaaaa tcaccacagg gaaggctgag 1500
caggacactc tggctgtgtc ggtcagcgcc ggcaaggact ttgaactgag cctcccaatt 1560
gacccccgca cgaaaccac cactgcccgg gagtccgagg accctgtcac caccaccgtt 1620
gagaactacg gtggtgagac acaggctcag cgacgccagc acactgacgt cggcttcac 1680
atggacaggt ttgtgaaaat cgaaacgag agcccccacg acgtcattga cttcatgcaa 1740
acacaccaac acgctgttgt ggtgtccctt ttgctgtcag ccacgtacta cttctccgat 1800
ctggagatcg tgggtcgtca tgatgtaaac ttgacgtggg tgcccaatgg agcacctgta 1860
gaagccttgg ccaacacaag caaccccacc gcctaccaca agcagccatt tacgagactt 1920
gcgtccctt acagacacaa gcaacgagtg ttggcaacag tgtataacg agtaagcaag 1980
tactctacaa ctggtaatgg tagaaggggt gacctggggc ctcttgcggc gcgggtcgcc 2040
gcacagctcc ccagctcttt caacttttgt gcaattcggg ccacgaccat ccacgagctt 2100
ctcgtgcgca tgaacgtgc cgagctctac tgtcccaggc ctctgctggc agtggagtg 2160
ttgtcgcagt ttgtgaaaat cgaaacgag attgcaccta caaagcaact cctgaacttc 2220
gacctgtctc agttggcggg agacgtcgag tccaaccctg ggcccttctt cttctctgac 2280
gtcaggacga acttttctaa gctggttgac accatcaacc agatgcagga ggacatgtca 2340
acaaaacacg ggcccgaact taaccggttg gtgtctgcgt ttgaggaatt ggccgctgga 2400
gtgaaagata tcaggacggg tctcgacgag gccaaagcct ggtacaagct cattaagctc 2460
ctgagccgcc tgtcatgcat ggcgctgta gcagcacggt caaaggaccc agtccttggt 2520
gccatcatgc tagctgacac cgtctcagag attctggaca gcacctttgt cgtgaagaag 2580
atctccgact cgctctccag tctctttcac gtgccggccc ccgtcttcag cttcggagcc 2640
ccgattctgc tggccgggtt ggtcaaatg gcctcgagtt tcttccgggt cacaccgaa 2700
gaccttgaga gagcagagaa acagctcaaa gcacgtgaca tcatcgagcg tcagaaacct 2760
ctgaaagtga gagccaagct ccacacgacg gaggggccc acgctggtcc gatggagaga 2820
caaaagcccc tgaaagtga agcaaaagcc ccggtcgtaa aggaaggacc ttacgagggg 2880
cttgtgaaga aacctgtcgc ttgaaagtg aaagccaaaa atttgattgt cactgagagt 2940
ggtgcccccc cgaccgactt gcaaaagatg gtcattggga acaccaagcc tgttgagctc 3000
atcctcgacg ggaagacggt agccatctgt tgcgctaccg gagtgtttgg cactgcttac 3060
cttgtagcac gtcatctttt cgcggagaag tatgacaaga tcatgctgga cggcagagcc 3120
atgacagaca gtgactacag agtgtttgag tttagatta aagtaaaagg acaggacatg 3180
ctttcagatg ccgcgctcat ggtgctccac cgtgggaatc gcgtgagaga tatcacgaaa 3240
cactttcgtg acacagcaag aatgaagaag ggcacccccg ttgtcgggtg tatcaacaac 3300
gccgatgtcg ggagactgat tttctctggt gagggcctta cctacaagga cattgtagt 3360
tgtatggatg gagacaccat gccctggctc ttgacctaca gagccgccac caaggctggc 3420
tattgtggag gagctgttct tgcaaaagac ggagccgaga ctttcatcgt cggcactcac 3480
tccgcaggcg gtaatggagt tggatactgt tcatgcgttt ccaggtccat gctgctaaag 3540
atgaaggcac acattgaccc tgagccacac cactgagtaa 3579

```

<210> 6

<211> 1192

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> kháng nguyên FMDV Irn

<400> 6

```

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

```

210						215					220				
Gln	Leu	Thr	Leu	Phe	Pro	His	Gln	Phe	Ile	Asn	Pro	Arg	Thr	Asn	Met
225					230					235					240
Thr	Ala	His	Ile	Thr	Val	Pro	Tyr	Leu	Gly	Val	Asn	Arg	Tyr	Asp	Gln
				245					250						255
Tyr	Lys	Gln	His	Lys	Pro	Trp	Thr	Leu	Val	Val	Met	Val	Val	Ser	Pro
			260					265					270		
Leu	Thr	Thr	Ser	Ser	Ile	Gly	Ala	Ser	Gln	Ile	Lys	Val	Tyr	Ala	Asn
		275					280					285			
Ile	Ala	Pro	Thr	Phe	Val	His	Val	Ala	Gly	Glu	Leu	Pro	Ser	Lys	Glu
	290				295					300					
Gly	Ile	Val	Pro	Val	Ala	Cys	Ser	Asp	Gly	Tyr	Gly	Gly	Leu	Val	Thr
305					310					315					320
Thr	Asp	Pro	Lys	Thr	Ala	Asp	Pro	Val	Tyr	Gly	Met	Val	Tyr	Asn	Pro
				325					330					335	
Pro	Arg	Thr	Asn	Tyr	Pro	Gly	Arg	Phe	Thr	Asn	Leu	Leu	Asp	Val	Ala
		340					345						350		
Glu	Ala	Cys	Pro	Thr	Phe	Leu	Cys	Phe	Asp	Asp	Gly	Lys	Pro	Tyr	Val
		355				360					365				
Val	Thr	Arg	Thr	Asp	Asp	Gln	Arg	Leu	Leu	Ala	Lys	Phe	Asp	Val	Ser
	370				375				380						
Leu	Ala	Ala	Lys	His	Met	Ser	Asn	Thr	Tyr	Leu	Ser	Gly	Ile	Ala	Gln
385					390					395					400
Tyr	Tyr	Thr	Gln	Tyr	Ser	Gly	Thr	Ile	Asn	Leu	His	Phe	Met	Phe	Thr
			405					410						415	
Gly	Ser	Thr	Glu	Ser	Lys	Ala	Arg	Tyr	Met	Val	Ala	Tyr	Ile	Pro	Pro
		420					425						430		
Gly	Met	Asp	Thr	Pro	Pro	Asp	Thr	Pro	Glu	Lys	Ala	Ala	His	Cys	Ile
	435						440				445				
His	Ala	Glu	Trp	Asp	Thr	Gly	Leu	Asn	Ser	Lys	Phe	Thr	Phe	Ser	Ile
	450				455					460					
Pro	Tyr	Val	Ser	Ala	Ala	Asp	Tyr	Ala	Tyr	Thr	Ala	Ser	Asp	Val	Ala
465					470				475						480
Glu	Thr	Thr	Asn	Val	Gln	Gly	Trp	Val	Cys	Ile	Tyr	Gln	Ile	Thr	His
			485				490						495		
Gly	Lys	Ala	Glu	Gln	Asp	Thr	Leu	Val	Val	Ser	Val	Ser	Ala	Gly	Lys
	500						505					510			
Asp	Phe	Glu	Leu	Arg	Leu	Pro	Ile	Asp	Pro	Arg	Thr	Gln	Thr	Thr	Thr
	515						520					525			
Ala	Gly	Glu	Ser	Ala	Asp	Pro	Val	Thr	Thr	Thr	Val	Glu	Asn	Tyr	Gly
	530				535						540				
Gly	Glu	Thr	Gln	Ala	Gln	Arg	Arg	Gln	His	Thr	Asp	Val	Gly	Phe	Ile
545					550					555					560
Met	Asp	Arg	Phe	Val	Lys	Ile	Ser	Pro	Val	Ser	Pro	Thr	His	Val	Ile
			565				570						575		
Asp	Leu	Met	Gln	Thr	His	Gln	His	Ala	Leu	Val	Gly	Ala	Leu	Leu	Arg
	580						585					590			
Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Phe	Ser	Asp	Leu	Glu	Ile	Val	Val	Arg	His	Asp
	595					600					605				
Gly	Asn	Leu	Thr	Trp	Val	Pro	Asn	Gly	Ala	Pro	Val	Glu	Ala	Leu	Ala
	610				615					620					
Asn	Thr	Ser	Asn	Pro	Thr	Ala	Tyr	His	Lys	Gln	Pro	Phe	Thr	Arg	Leu
625					630					635					640
Ala	Leu	Pro	Tyr	Thr	Ala	Pro	His	Arg	Val	Leu	Ala	Thr	Val	Tyr	Asn
			645					650					655		
Gly	Val	Ser	Lys	Tyr	Ser	Thr	Thr	Gly	Asn	Gly	Arg	Arg	Gly	Asp	Leu
	660						665					670			
Gly	Pro	Leu	Ala	Ala	Arg	Val	Ala	Ala	Gln	Leu	Pro	Ser	Ser	Phe	Asn
	675					680						685			
Phe	Gly	Ala	Ile	Arg	Ala	Thr	Thr	Ile	His	Glu	Leu	Leu	Val	Arg	Met
	690				695					700					
Lys	Arg	Ala	Glu	Leu	Tyr	Cys	Pro	Arg	Pro	Leu	Leu	Ala	Val	Glu	Val
705					710					715					720
Leu	Ser	Gln	Asp	Arg	His	Lys	Gln	Lys	Ile	Ile	Ala	Pro	Thr	Lys	Gln
		725					730						735		
Leu	Leu	Asn	Phe	Asp	Leu	Leu	Lys	Leu	Ala	Gly	Asp	Val	Glu	Ser	Asn
	740					745						750			
Pro	Gly	Pro	Phe	Phe	Phe	Ser	Asp	Val	Arg	Thr	Asn	Phe	Ser	Lys	Leu
	755					760					765				
Val	Asp	Thr	Ile	Asn	Gln	Met	Gln	Glu	Asp	Met	Ser	Thr	Lys	His	Gly
	770				775					780					
Pro	Asp	Phe	Asn	Arg	Leu	Val	Ser	Ala	Phe	Glu	Glu	Leu	Ala	Ala	Gly
785					790				795						800
Val	Lys	Ala	Ile	Arg	Thr	Gly	Leu	Asp	Glu	Ala	Lys	Pro	Trp	Tyr	Lys
		805						810					815		
Leu	Ile	Lys	Leu	Leu	Ser	Arg	Leu	Ser	Cys	Met	Ala	Ala	Val	Ala	Ala
	820					825					830				
Arg	Ser	Lys	Asp	Pro	Val	Leu	Val	Ala	Ile	Met	Leu	Ala	Asp	Thr	Gly
	835					840					845				

Leu Glu Ile Leu Asp Ser Thr Phe Val Val Lys Lys Ile Ser Asp Ser
 850 855 860
 Leu Ser Ser Leu Phe His Val Pro Ala Pro Val Phe Ser Phe Gly Ala
 865 870 875 880
 Pro Ile Leu Leu Ala Gly Leu Val Lys Val Ala Ser Ser Phe Phe Arg
 885 890 895
 Ser Thr Pro Glu Asp Leu Glu Arg Ala Glu Lys Gln Leu Lys Ala Arg
 900 905 910
 Asp Ile Ile Glu Arg Gln Lys Pro Leu Lys Val Arg Ala Lys Leu Pro
 915 920 925
 Gln Gln Glu Gly Pro Tyr Ala Gly Pro Met Glu Arg Gln Lys Pro Leu
 930 935 940
 Lys Val Lys Ala Lys Ala Pro Val Val Lys Glu Gly Pro Tyr Glu Gly
 945 950 955 960
 Leu Val Lys Lys Pro Val Ala Leu Lys Val Lys Ala Lys Asn Leu Ile
 965 970 975
 Val Thr Glu Ser Gly Ala Pro Pro Thr Asp Leu Gln Lys Met Val Met
 980 985 990
 Gly Asn Thr Lys Pro Val Glu Leu Ile Leu Asp Gly Lys Thr Val Ala
 995 1000 1005
 Ile Cys Cys Ala Thr Gly Val Phe Gly Thr Ala Tyr Leu Val Pro
 1010 1015 1020
 Arg His Leu Phe Ala Glu Lys Tyr Asp Lys Ile Met Leu Asp Gly
 1025 1030 1035
 Arg Ala Met Thr Asp Ser Asp Tyr Arg Val Phe Glu Phe Glu Ile
 1040 1045 1050
 Lys Val Lys Gly Gln Asp Met Leu Ser Asp Ala Ala Leu Met Val
 1055 1060 1065
 Leu His Arg Gly Asn Arg Val Arg Asp Ile Thr Lys His Phe Arg
 1070 1075 1080
 Asp Thr Ala Arg Met Lys Lys Gly Thr Pro Val Val Gly Val Ile
 1085 1090 1095
 Asn Asn Ala Asp Val Gly Arg Leu Ile Phe Ser Gly Glu Ala Leu
 1100 1105 1110
 Thr Tyr Lys Asp Ile Val Val Cys Met Asp Gly Asp Thr Met Pro
 1115 1120 1125
 Gly Leu Phe Ala Tyr Arg Ala Ala Thr Lys Ala Gly Tyr Cys Gly
 1130 1135 1140
 Gly Ala Val Leu Ala Lys Asp Gly Ala Glu Thr Phe Ile Val Gly
 1145 1150 1155
 Thr His Ser Ala Gly Gly Asn Gly Val Gly Tyr Cys Ser Cys Val
 1160 1165 1170
 Ser Arg Ser Met Leu Leu Lys Met Lys Ala His Ile Asp Pro Glu
 1175 1180 1185
 Pro His His Glu
 1190
 <210> 7
 <211> 3576
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Polynucleotit mã hóa kháng nguyên FMDV Asia
 <400> 7
 atgggagccg gtcaatccag tccggcaacc gggtcacaga accaatctgg caaacttgga 60
 agcatcatta acaactacta catgcaacag taccagaatt ccatggacac acagcttggt 120
 gacaacgcta ttagcggagg ttccaacgaa ggttccacgg ataccacttc cacacacaca 180
 aacaacaccc aaaacaacga ctgggttctcg cgcctggcta gctctgcatt cagtggcttc 240
 tttggtgcac ttttggctga caagaagaca gaagagacaa ctctgcttga agaccgcatt 300
 ctcaccacca ggaacggcca cacaacatcg agacacagtg cgagcgttgg cgtaacatac 360
 gggttacgctg tggccgagga cgcggtgtct ggacccaata cctcgggtct agagactcgt 420
 gttcaacagg cagaacggtt tttcaagaaa cacctgtttg actggacacc gaacttggca 480
 tttggacact gttactacct ggaacttccc actgaacaca aaggcgtgta cggcagttctc 540
 atgggctcgt acgcctacat gagaaatgga tgggacatag aggtgactgc tggttggaac 600
 caattcaacg gtggttgtct ccttgtcgcg ctctgtccag agctgaagga actcgacacg 660
 cgacagaagt accagctgac cctctttccc caccagttca tcaaccacag caccaacatg 720
 acggcccaca tcaacgtgcc gtacgtgggt atcaacaggt acgaccagta cgccctccac 780
 aagccgtgga cgcttgttgt gatgggtgta gccccactca cgtcaaaaac tgggtggtctc 840
 gaacagatca aggtttacat gaatgcagcg ccaacctacg tgcattgtggc gggagagctg 900
 ccctcgaaag agggaatagt tcccgctcgc tgtgcggacg gttacggcaa catgtgacc 960
 acggaccgga agacggccga tccagtttac gggaaagtgt tcaaccccc caggacaaac 1020
 ctccctgggc gcttcacgaa cttccttgat gttgcggagg catgtccaac tttcctccgc 1080
 tttggagaag taccatttgt gaagacggtg aactctggtg accgcttgct ggccaagttc 1140
 gacgtgtccc tcgtgcagg gcacatgtcc aacacctact tggctggcct ggcgcagtac 1200
 tacacacagt acagcggcac catgaacgtc cacttcatgt tcaccgggcc cacggatgct 1260
 aaagccgat acatggtggc ttatgtcccc cctggcatga caccgcccac ggaccctgag 1320
 caccgcccac actgcattca ctctgagtg gatactggtc ttaactctaa gtttaccttt 1380
 tccatacctt acctctctgc tgctgactat gcctacactg cttctgacgt ggcggagacc 1440
 acgagtgtgc agggatgggt gtgtatctat cagatcacc acggcaaggc tgaggggagac 1500
 gcactggtcg tttctgtcag cgcggcaaa gactttgagt ttcgcttgcc tggtagcga 1560

```

cgccagcaaaa ccaccaccac tggcgaatca gcagatccag tcacaaccac gggttgagaac 1620
tatggaggag agactcagac agccagacgg cttcacactg acgtcgectt cattcttgac 1680
aggttttgtga aactcactgc tcccaagaac atccaaaccc tcgatctcat gcagatcccc 1740
tcacacacgc tgggtggagc actacttcgt tctgcgacgt actacttctc agacctggag 1800
gtcgcgcttg tccacacagg cccggtcacc tgggtgcoca acggcgcgcc caaggatgct 1860
ctaaacaacc agaccaaccc aactgcctat cagaagcaac ccatcacccg cctggcactc 1920
ccctacaccg cccccatcg tgtgctggca acagtgtaca acgggaagac ggcgtacggg 1980
gaaacgacct caaggcgcgg cgacatggcg gccctcgcac aaaggttgag cgctcggtg 2040
cccacctctt tcaactacgg cgcgtgaag gcgcacacca tcactgagct tttgatccgc 2100
atgaagcgcg cggagacata ttgccctagg cctttactag cccttgacac cactcaggac 2160
cgccgcaaac aggagatcat tgcacctgag aagcaggttt tgaactttga cctactcaag 2220
ttggcaggag acgttgagtc caacctggg cctttcttct tctccgacgt taggtcgaac 2280
ttctccaaac tggtcgagac catcaaccag atgcaggagg acatgtcaac aaagcacgga 2340
cccgacttca accggttggt ttccgctgtt gaggaattgg ccacaggagt aaaggccatc 2400
aggaacggtc tcgatgaggc caagccctgg tacaagctca tcaaaactcct aagccgcctg 2460
tcgtgcatgg ccgctgtagc agcacggtcc aaggaccag tccttggtggc catcatgctg 2520
gctgacacgg agcttgtagc tctggacagc acgttcgtcg tgaagaagat ctccgactcg 2580
ctctccagtc tctttcacgt gccggccccc gtcttcagtt tcggagctcc gattctgttg 2640
gctgggttgg tcaaatgcgc ctcgagtttc ttccggtcca cccccgaaga ccttgagaga 2700
gcagagaaac agctcaaagc acgtgacatc aacgacatac tcgagcgtca gaaacccctg 2760
aaagtgaagc taaagctgcc acaacatgag ggaccttacg ctggcccgat ggagagacag 2820
aaaccactga aagtgaagc aaaagcccg gtcgttaagg aaggacctta cgagggaccg 2880
gtgaagaagc ctgctgcttt gaaagtgaag gctaagaact tgattgtcac tgagagtgg 2940
gccccaccga ccgacttgca aaagatggtc atgagcaaca ctaagcctgt tgagctcatc 3000
cttgacggta agacgtgagc catctgctgc gccaccggag tgtttggtac tgcctacctc 3060
gtgcctcgtc accttttgc agaaaagtac gacaggatca tgttgagcgg cagggccatg 3120
acagacagtg actacagagt gtttgagttt gagattaaag taaaaggaca ggacatgctc 3180
tcagacgctg cgctcatggt gctccaccgt ggcaaccgtg tgagagacat cacgaaacac 3240
tttctgtgata cagcaagagt gaagaaaggc acccccggtg tcggcggtgat caacaacgcc 3300
gacgttgga gactgtttt ctccggtgag gccctcacct acaaggacat tgtagtgtgc 3360
atggatggag acaccatgcc gggcctatct gcctacagag ccgctaccaa ggctggctac 3420
tgtggaggag ccgttcttgc caaggacgga gctgacacat ttatcgctcg cactcactcc 3480
gcaggaggca atggagtcgg gtactgctca tgcgtatcta ggtccatgct cttgaagatg 3540
aaggcacaca ttgacccgca accacaccac gagtag 3576

```

<210> 8

<211> 1191

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> kháng nguyên FMDV Asia

<400> 8

```

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

```


Gly Ile Val Pro Val Ala Cys Ala Asp Gly Tyr Gly Asn Met Val Thr
 305 310 315 320
 Thr Asp Pro Lys Thr Ala Asp Pro Val Tyr Gly Lys Val Phe Asn Pro
 325 330 335
 Pro Arg Thr Asn Leu Pro Gly Arg Phe Thr Asn Phe Leu Asp Val Ala
 340 345 350
 Glu Ala Cys Pro Thr Phe Leu Arg Phe Gly Glu Val Pro Phe Val Lys
 355 360 365
 Thr Val Asn Ser Gly Asp Arg Leu Leu Ala Lys Phe Asp Val Ser Leu
 370 375 380
 Ala Ala Gly His Met Ser Asn Thr Tyr Leu Ala Gly Leu Ala Gln Tyr
 385 390 395 400
 Tyr Thr Gln Tyr Ser Gly Thr Met Asn Val His Phe Met Phe Thr Gly
 405 410 415
 Pro Thr Asp Ala Lys Ala Arg Tyr Met Val Ala Tyr Val Pro Pro Gly
 420 425 430
 Met Thr Pro Pro Thr Asp Pro Glu His Ala Ala His Cys Ile His Ser
 435 440 445
 Glu Trp Asp Thr Gly Leu Asn Ser Lys Phe Thr Phe Ser Ile Pro Tyr
 450 455 460
 Leu Ser Ala Ala Asp Tyr Ala Tyr Thr Ala Ser Asp Val Ala Glu Thr
 465 470 475 480
 Thr Ser Val Gln Gly Trp Val Cys Ile Tyr Gln Ile Thr His Gly Lys
 485 490 495
 Ala Glu Gly Asp Ala Leu Val Val Ser Val Ser Ala Gly Lys Asp Phe
 500 505 510
 Glu Phe Arg Leu Pro Val Asp Ala Arg Gln Gln Thr Thr Thr Thr Gly
 515 520 525
 Glu Ser Ala Asp Pro Val Thr Thr Thr Val Glu Asn Tyr Gly Gly Glu
 530 535 540
 Thr Gln Thr Ala Arg Arg Leu His Thr Asp Val Ala Phe Ile Leu Asp
 545 550 555 560
 Arg Phe Val Lys Leu Thr Ala Pro Lys Asn Ile Gln Thr Leu Asp Leu
 565 570 575
 Met Gln Ile Pro Ser His Thr Leu Val Gly Ala Leu Leu Arg Ser Ala
 580 585 590
 Thr Tyr Tyr Phe Ser Asp Leu Glu Val Ala Leu Val His Thr Gly Pro
 595 600 605
 Val Thr Trp Val Pro Asn Gly Ala Pro Lys Asp Ala Leu Asn Asn Gln
 610 615 620
 Thr Asn Pro Thr Ala Tyr Gln Lys Gln Pro Ile Thr Arg Leu Ala Leu
 625 630 635 640
 Pro Tyr Thr Ala Pro His Arg Val Leu Ala Thr Val Tyr Asn Gly Lys
 645 650 655
 Thr Ala Tyr Gly Glu Thr Thr Ser Arg Arg Gly Asp Met Ala Ala Leu
 660 665 670
 Ala Gln Arg Leu Ser Ala Arg Leu Pro Thr Ser Phe Asn Tyr Gly Ala
 675 680 685
 Val Lys Ala Asp Thr Ile Thr Glu Leu Leu Ile Arg Met Lys Arg Ala
 690 695 700
 Glu Thr Tyr Cys Pro Arg Pro Leu Leu Ala Leu Asp Thr Thr Gln Asp
 705 710 715 720
 Arg Arg Lys Gln Glu Ile Ile Ala Pro Glu Lys Gln Val Leu Asn Phe
 725 730 735
 Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro Phe
 740 745 750
 Phe Phe Ser Asp Val Arg Ser Asn Phe Ser Lys Leu Val Glu Thr Ile
 755 760 765
 Asn Gln Met Gln Glu Asp Met Ser Thr Lys His Gly Pro Asp Phe Asn
 770 775 780
 Arg Leu Val Ser Ala Phe Glu Glu Leu Ala Thr Gly Val Lys Ala Ile
 785 790 795 800
 Arg Asn Gly Leu Asp Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Lys Leu Ile Lys Leu
 805 810 815
 Leu Ser Arg Leu Ser Cys Met Ala Ala Val Ala Ala Arg Ser Lys Asp
 820 825 830
 Pro Val Leu Val Ala Ile Met Leu Ala Asp Thr Gly Leu Glu Ile Leu
 835 840 845
 Asp Ser Thr Phe Val Val Lys Lys Ile Ser Asp Ser Leu Ser Ser Leu
 850 855 860
 Phe His Val Pro Ala Pro Val Phe Ser Phe Gly Ala Pro Ile Leu Leu
 865 870 875 880
 Ala Gly Leu Val Lys Val Ala Ser Ser Phe Phe Arg Ser Thr Pro Glu
 885 890 895
 Asp Leu Glu Arg Ala Glu Lys Gln Leu Lys Ala Arg Asp Ile Asn Asp
 900 905 910
 Ile Leu Glu Arg Gln Lys Pro Leu Lys Val Arg Ala Lys Leu Pro Gln
 915 920 925
 His Glu Gly Pro Tyr Ala Gly Pro Met Glu Arg Gln Lys Pro Leu Lys

```

      930              935              940
Val Lys Ala Lys Ala Pro Val Val Lys Glu Gly Pro Tyr Glu Gly Pro
945              950              955              960
Val Lys Lys Pro Val Ala Leu Lys Val Lys Ala Lys Asn Leu Ile Val
      965              970              975
Thr Glu Ser Gly Ala Pro Pro Thr Asp Leu Gln Lys Met Val Met Ser
      980              985              990
Asn Thr Lys Pro Val Glu Leu Ile Leu Asp Gly Lys Thr Val Ala Ile
      995              1000              1005
Cys Cys Ala Thr Gly Val Phe Gly Thr Ala Tyr Leu Val Pro Arg
      1010              1015              1020
His Leu Phe Ala Glu Lys Tyr Asp Arg Ile Met Leu Asp Gly Arg
      1025              1030              1035
Ala Met Thr Asp Ser Asp Tyr Arg Val Phe Glu Phe Glu Ile Lys
      1040              1045              1050
Val Lys Gly Gln Asp Met Leu Ser Asp Ala Ala Leu Met Val Leu
      1055              1060              1065
His Arg Gly Asn Arg Val Arg Asp Ile Thr Lys His Phe Arg Asp
      1070              1075              1080
Thr Ala Arg Met Lys Lys Gly Thr Pro Val Val Gly Val Ile Asn
      1085              1090              1095
Asn Ala Asp Val Gly Arg Leu Ile Phe Ser Gly Glu Ala Leu Thr
      1100              1105              1110
Tyr Lys Asp Ile Val Val Cys Met Asp Gly Asp Thr Met Pro Gly
      1115              1120              1125
Leu Phe Ala Tyr Arg Ala Ala Thr Lys Ala Gly Tyr Cys Gly Gly
      1130              1135              1140
Ala Val Leu Ala Lys Asp Gly Ala Asp Thr Phe Ile Val Gly Thr
      1145              1150              1155
His Ser Ala Gly Gly Asn Gly Val Gly Tyr Cys Ser Cys Val Ser
      1160              1165              1170
Arg Ser Met Leu Leu Lys Met Lys Ala His Ile Asp Pro Glu Pro
      1175              1180              1185
His His Glu
      1190

```