



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

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

(11)



1-0034074

(51)⁷ A61K 39/255

(13) B

(21) 1-2014-03447

(22) 15/03/2013

(86) PCT/US2013/032539 15/03/2013

(87) WO2013/142377 26/09/2013

(30) 61/614,142 22/03/2012 US

(45) 25/11/2022 416

(43) 25/12/2014 321A

(73) Boehringer Ingelheim Animal Health USA Inc. (US)

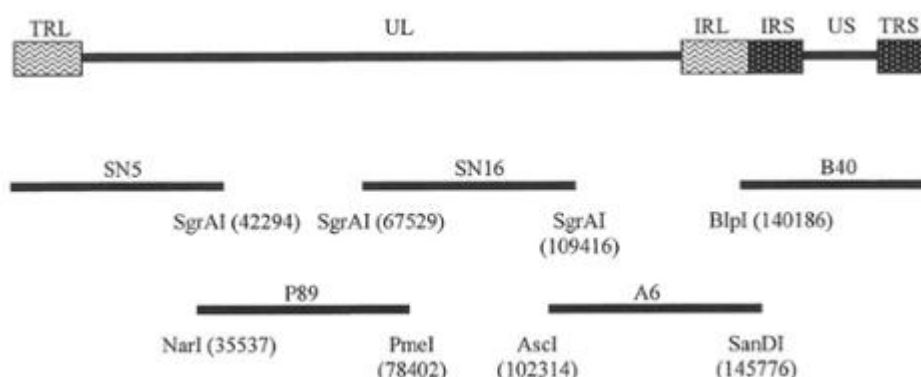
3239 Satellite Blvd. Duluth, GA 30096, United States of America

(72) PRITCHARD, Joyce (US); MEBATSION, Teshome (US); BUBLOT, Michel (FR).

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

(54) VIRUT GÂY BỆNH MAREK (MDV) ĐÃ BIẾN NẠP ỔN ĐỊNH VỚI CẤU TRÚC ADN NGOẠI LAI, CHẾ PHẨM CHỨA VIRUT GÂY BỆNH MAREK (MDV) TÁI TỔ HỢP ĐƯỢC BIẾN NẠP ỔN ĐỊNH VỚI CẤU TRÚC ADN NGOẠI LAI VÀ PHƯƠNG PHÁP TẠO RA TÁC NHÂN VIRUT CÓ TÁC DỤNG BẢO VỆ GIA CẦM CHỐNG LẠI BỆNH MAREK

(57) Sáng chế đề cập đến vaccin có tác dụng hiệu quả đối với bệnh Marek, có thể được bào chế bằng cách sử dụng virus gây bệnh Marek tái tổ hợp (MDV), chủng CVI988, đã được biến nạp với cấu trúc ADN ngoại lai gồm cả trình tự đoạn lặp ở đầu cuối của virus gây bệnh lưới nội mô không tăng bạch cầu. Tác nhân virus an toàn này tạo ra đáp ứng miễn dịch bảo vệ mức cao ở gà chống lại MDV thử nghiệm có độc tính mà không gây ra tình trạng bệnh lý nghiêm trọng. Các thành phần thích hợp của vaccin để dùng cho gà bao gồm liều tạo miễn dịch hữu hiệu của tác nhân virus mới này, cùng với chất mang hoặc chất pha loãng được dùng.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến vaccin chứa virus và các phương pháp sử dụng chúng. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến các vaccin mới có khả năng bảo vệ gà chống lại sự nhiễm virus gây bệnh Marek, có độ an toàn và hiệu quả cải thiện hơn so với các loại vaccin hiện có.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh Marek (MD), là bệnh tăng sinh cao độ tế bào lympho rất phổ biến ở gà, được phòng ngừa cho gà bán trên thị trường bằng các vaccin chứa virus sống là các virus herpes gây bệnh MD đã được làm suy yếu hoặc vô hại trong tự nhiên. Mặc dù các chương trình tiêm chủng được xem là có hiệu quả tổng thể, nhưng ngành chăn nuôi gia cầm vẫn liên tục bị tổn thất do bệnh MD. Do virus MD có xu hướng gây độc ngày càng mạnh hơn theo thời gian (ví dụ, bằng cách chuyển sang dạng độc tính hơn), cùng với áp lực kinh tế đối với ngành chăn nuôi gia cầm, nên vẫn cần khuyến khích phát triển mạnh các sản phẩm hữu hiệu và an toàn hơn để bảo vệ tốt hơn chống các chủng có độc tính rất mạnh mà không gây ra các tác dụng phụ (ví dụ, loạn dưỡng tuyến ức).

Có ba kiểu huyết thanh riêng biệt của virus MD đã tìm thấy ở gà: (1) kiểu huyết thanh 1 - dạng sinh khối u gây bệnh này, bao gồm cả virus MD có độc tính cao và thấp và các biến thể đã được làm suy yếu của chúng; (2) kiểu huyết thanh 2 - virus MD không sinh khối u; và (3) kiểu huyết thanh 3 - virus herpes ở gà tây (herpesvirus of turkey - HVT). Trước đây, vaccin MD cấu thành từ virus có kiểu huyết thanh 3 ban đầu được phân lập từ gà tây như đã nêu trong Witter et al. [Am. J. vet. Res.31:525-538 (1970)] và Okazaki et al. [Patent Mỹ số 3,642,574]. Do không có khả năng sinh khối u, khả năng nhiễm có tính tự giới hạn, có khả năng sao chép tốt *in vivo* và *in vitro*, có thể ở dạng chế phẩm vô bào và có thành phần tế bào, và có hiệu quả bảo vệ cao, nên HVT được coi là vaccin tiêu chuẩn cho các vaccin WID trên toàn thế giới. Chủng HVT sử dụng phổ biến là FC126.

Vaccin tạo ra từ chủng SB-1 vô hại trong tự nhiên [Schat et al., J. Natl. Cancer inst.60:1075-1082 (1978) và Patent Mỹ số 4,160,0241, dạng phân lập của kiểu huyết thanh virus 2 MD] đã được cấp phép ở Mỹ từ năm 1984. Chủng SB-1

này có khả năng bảo vệ kém đối với các chủng MDV có độc tính mạnh. Nó thường được sử dụng kết hợp với HVT ở dạng vaccin nhị giá do hai virus này tạo ra khả năng bảo vệ cộng hợp tốt hơn so với khi dùng một virus đơn lẻ [Schat et al., *Avian Pathol.* 11:593-606 (1982); Witter, *Avian Pathol.* 11:49-62 (1982), nội dung của tài liệu này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn]. Tác dụng này được gọi là "bảo vệ hiệp đồng". Hiện nay, vaccin nhị giá SB-1 + HVT chiếm hơn 50% trên thị trường vaccin MD ở Mỹ và được xem là có hiệu lực mạnh nhất trong số các sản phẩm MD khác nhau. Tuy nhiên, đôi khi nó cũng không có hiệu quả.

Vaccin MD khác tạo ra từ chủng CVI988 dòng vô tính C (CVI988/C) được cấp phép sử dụng trên thị trường Mỹ. Vaccin này có nguồn gốc từ virus MD kiểu huyết thanh 1 có độc tính yếu đã được làm suy yếu bằng cách cấy chuyển nối tiếp trong môi trường nuôi cấy mô và được công bố bởi De Boer et al. [*Avian Dis.* 30:276-283 (1986)]. Các dẫn xuất khác nữa của CVI988/C, được xác định là CVI988/C/R6, cũng được mô tả bởi De Boer et al. [*Advances in Disease Marek Research*, pp.405-43 (1988)]. Gần đây, một chủng nguyên gốc có số lần cấy chuyển thấp, được ký hiệu là CVI988/Rispens, và đã được sử dụng trên thị trường ở các nước khác trong nhiều năm, có hiệu lực mạnh kháng lại một số chủng virus MD có độc tính rất mạnh, đã được Witter et al. công bố trong [4th Intl. Symp. Marek's Disease, pp. 315-319 (1992)].

Vaccin thử nghiệm có nguồn gốc từ Md11, là thể phân lập dài MD kiểu huyết thanh 1 có độc tính rất mạnh, đã được Witter công bố trong tài liệu nêu trên. Md11 được làm suy yếu qua 75 lần cấy chuyển trong môi trường nuôi cấy tế bào, và vaccin thu được được ký hiệu là Md11/75C. Nhận thấy rằng vaccin này có khả năng bảo vệ tốt chống nhiễm Md5 và hầu hết các virus MD có độc tính mạnh khác đã thử nghiệm; nhưng nó lại kém hiệu quả đối với chủng JM/102W, một virus MD kiểu gốc được bảo vệ một cách hữu hiệu bởi các vaccin HVT và SB-1. Hơn nữa, hiệu lực của nó đều kém hơn ở các loài gà con ở kháng thể HVT.

Trong Patent Mỹ số 4,895,717, Witter đã bộc lộ một dẫn xuất thể hồi biến của Mdn/75C, được gọi là Md11/75C/R2. Nhận thấy rằng Md11/75C/R2 này có hiệu quả vượt trội so với một số vaccin đơn giá khác và có hiệu quả tương đương với vaccin nhị giá (HVT + SB-1) [Witter, *Avian Dis.* 31:752-765 (1987)]. Tuy nhiên, đặc tính gây bệnh vốn có của các virus kiểu huyết thanh 1 và khả năng của các chủng suy yếu hồi biến sang đặc tính gây bệnh nặng hơn [Witter et al., *Avian Pathol.* 13:75-92 (1984)] là các yếu tố cần được xem xét khi xét cấp phép cho các sản phẩm này. Dòng vô tính thu được bằng cách cấy chuyển tiếp chủng Mdn/75C/R2, được ký hiệu là Md11/75C/R2/23 (hoặc R2/23), được tìm thấy bởi

Witter et al. [Avian Dis., 35:877-891 (1991)], có khả năng bảo vệ ở mức cao của chủng bố mẹ mà không có đặc tính gây bệnh của nó.

Witter cũng mô tả vaccin MD khác có nguồn gốc từ 301 B/1 - thể phân lập kiểu huyết thanh 2 không gây bệnh, trong Patent Mỹ số 4,895,718, nội dung của tài liệu này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn Chủng 301 B/1 này có khả năng sao chép vượt trội thành SB-1, cũng như khả năng bảo vệ chống virus tốt hơn.

Cũng đã biết virus gây bệnh Marek tái tổ hợp, được gọi là RM1, có đoạn lặp dài ở đầu cuối của virus gây bệnh lưới nội mô không tăng bạch cầu được hợp nhất ổn định vào vùng đoạn lặp ngắn (repeat short - RS) của bộ gen của nó. Chủng này được tạo ra ở USDA-ARS-ADOL từ chủng JM của virus gây bệnh Marek kiểu huyết thanh 1 [Witter et al., 1997, Avian Dis., 41:407-421, and Jones et al., 1996, J. Virology, 70(4):2460-2467i]. Tuy nhiên, nhận thấy rằng tuy chủng RM1 tạo ra mức bảo vệ tương đương hoặc vượt trội hơn so với CVI988, nhưng nó cũng có liên quan tới tính sinh bệnh dư, tức là gây ra chứng loạn dưỡng tuyến ức ở gia cầm đã được điều trị.

Do đó, tuy các vaccin HVT, SB-1, CVI988, CVI988/C, Md11/75C, Md11/75C/R2 và 301 B/1 hiện có thể gây đáp ứng miễn dịch chống lại một số virus MD nhất định, nhưng không có vaccin nào trong số các vaccin này có khả năng bảo vệ tối ưu chống lại toàn bộ các virus MD thử nghiệm ở tất cả các loài gà. Hơn nữa, các vaccin này kém hiệu lực chống lại một số chủng virus MD có độc tính rất mạnh mới được phân lập. Để ngăn ngừa sự bùng phát của bệnh MD ở phạm vi rộng trong tương lai, vẫn cần nghiên cứu phát triển các vaccin an toàn hơn, có hiệu lực cao hơn chống lại các chủng virus MD có độc tính mạnh.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế dựa một phần vào quá trình sản xuất và sử dụng các vaccin bao gồm virus gây bệnh Marek (MDV) đã được bộc lộ ban đầu trong đơn số USSN 10/623,891 (số công bố đơn US2005/0019348A1, của Reddy et al.), nội dung của nó, cũng như toàn bộ tiến trình của đơn này, đều được kết hợp toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn. Đặc biệt, sáng chế này dựa trên phát hiện đáng ngạc nhiên và bất ngờ rằng trên thực tế “virus” CVRM2 (chủng “CVI988” của MDV được biến nạp với cấu trúc ADN ngoại lai; đã được bộc lộ, ví dụ, trong Bảng 1 của Reddy et al.) không phải là virus gây bệnh Marek (MDV) đã được làm suy yếu tái tổ hợp đơn lẻ, khác biệt về mặt dòng vô tính. Thay vào đó, người nộp đơn đã xác định được rằng CVRM2 là tổ hợp không đồng nhất của MDV tái tổ hợp và bố mẹ, và khi người nộp đơn phân lập được dòng vô tính tinh khiết CVRM2 (dưới đây được gọi là “RN1250”) và sau đó đưa chủng vào các loài gia cầm, thì thu được độ an toàn và

hiệu quả vượt trội mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực không dự đoán được trong Reddy et al.

Dựa trên phát hiện này, mục đích của sáng chế là nhằm tạo ra vacxin mới, có khả năng bảo vệ cao chống lại MD ở các loài gia cầm, kể cả gà. Ngoài ra, mục đích của sáng chế là nhằm tạo ra vacxin có khả năng bảo vệ mạnh hơn chống lại các chủng có độc tính mạnh của virus gây bệnh Marek so với các vacxin hiện đang có trên thị trường.

Mục đích khác của sáng chế là nhằm cải thiện khả năng sống và khả năng sinh sản của gà, đặc biệt là gà giò và gà đẻ trứng, và nhằm làm giảm tổn thất kinh tế do bệnh Marek gây ra cho ngành chăn nuôi gia cầm.

Các phương án này và phương án khác được bộc lộ hoặc là hiển nhiên từ, và bao hàm trong, phần mô tả chi tiết sáng chế dưới đây.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG. 1 là sơ đồ của bộ gen MDV, chứa một vùng đơn vị dài (UL) được chặn bởi đoạn lặp đảo ngược (IRS), đoạn lặp dài ở đầu cuối (TRL), đoạn lặp dài bên trong (IRL), và một vùng đơn vị ngắn (US) được chặn bởi hai đoạn lặp đảo ngược là đoạn lặp ngắn bên trong (IRS) và đoạn lặp ngắn tận cùng (TRS). Fig này cũng thể hiện sơ đồ của các dòng vô tính cosmit chồng lặp được tạo ra để giải cứu virus nhiễm bệnh ra khỏi chủng có độc tính mạnh của MDV;

FIG. 2 mô tả quy trình tạo ra cosmit B40-Pac được dùng để tạo ra vacxin CVRM;

FIG. 3 minh họa việc chẩn đoán dựa trên PCR của MDV tái tổ hợp; được thể hiện bởi các đoạn mồi PCR, kích cỡ sản phẩm mong muốn, và ảnh chụp của gel agarosa, từ đó chứng tỏ rằng CVRM2 không phải là dòng vô tính, mà trên thực tế là tổ hợp kép của MDV tái tổ hợp và bố mẹ. Các dải: 1) dạng bậc thang; 2) âm tính; 3) Rispens; 4) GA 22; 5) Rismavac; 6) RB1B; 7) RN1250; 8) dương tính (tổ hợp kết hợp ban đầu);

FIG. 4 là xác nhận bằng PCR của RN1250 MSV, RN1250 x+5, và BP5. Các dải: không có khuôn mẫu (1), RN1250 MSV (2), RN1250 x+5 (3), RN1250 BP5 (4). Các phản ứng PCR với toàn bộ các cặp đoạn mồi tạo ra sản phẩm PCR mong muốn và mẫu dạng dải băng, từ đó chứng tỏ rằng không có bằng chứng về sự có mặt của virus Rispens bố mẹ trong số các thể phân lập RN1250 MSV, RN1250 x+5, và BP5.

Mô tả chi tiết sáng chế

Định nghĩa

"Đáp ứng miễn dịch" với chế phẩm hoặc vaccin là quá trình diễn biến của đáp ứng miễn dịch qua tế bào và/hoặc qua kháng thể trong vật chủ với chế phẩm hoặc vaccin 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 hỗ trợ T, và/hoặc tế bào gây độc T, đặc biệt hướng tới kháng nguyên hoặc các kháng nguyên nằm trong chế phẩm hoặc vaccin quan tâm. Tốt hơn nếu vật chủ sẽ biểu hiện đáp ứng miễn dịch trị liệu hay đáp ứng miễn dịch bảo vệ sao cho tính kháng với việc nhiễm mới được tăng lên và/hoặc mức độ trầm trọng của bệnh trên lâm sàng được giảm xuống. Khả năng bảo vệ như vậy sẽ được chứng minh bởi việc giảm hoặc không có triệu chứng và/hoặc dấu hiệu bệnh trên lâm sàng được biểu hiện thông thường bởi vật chủ đã nhiễm virus, thời gian phục hồi nhanh hơn và/hoặc nồng độ virus giảm xuống trong vật chủ đã nhiễm virus.

"Động vật" có nghĩa là động vật có vú, chim, và các loài tương tự. Động vật hoặc vật chủ được sử dụng trong bản mô tả bao gồm động vật có vú và người. Động vật có thể được chọn từ nhóm gồm giống ngựa (ví dụ, ngựa), giống chó (ví dụ, chó nhà, chó sói, cáo, chó sói đồng cỏ, chó rừng), giống mèo (ví dụ, sư tử, hổ, mèo nhà, mèo hoang, các loài mèo lớn khác, và các giống mèo khác bao gồm báo gêpa và linh miêu), giống cừu (ví dụ, cừu), giống bò (ví dụ, bò), giống lợn (ví dụ, lợn), gia cầm (ví dụ, gà, vịt, ngỗng, gà tây, chim cút, gà lôi, vịt, chim bảy màu finch, diều hâu, quạ, đà điểu châu Phi, đà điểu sa mạc Úc và đà điểu Úc đầu mèo), loài linh trưởng (ví dụ, bộ bán hầu, khỉ nhỏ culi, khỉ, vượn, khỉ không đuôi), chồn sương, chó biển, và cá. Thuật ngữ "động vật" cũng bao gồm các cá thể động vật ở tất cả các giai đoạn phát triển, bao gồm giai đoạn sơ sinh, phôi và bào thai.

Trừ khi có chỉ dẫn khác, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và thuật ngữ khoa học sử dụng trong bản mô tả có nghĩa tương đương như được hiểu thông thường bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật mà bản mô tả đã bộc lộ. Các thuật ngữ số ít "một" bao gồm cả các từ số nhiều nếu không được chỉ ra một cách rõ ràng theo cách khác. Tương tự, từ "hoặc" được dự định bao hàm "và" nếu không được chỉ ra một cách rõ ràng theo cách khác.

Cần lưu ý rằng phần mô tả này và cụ thể là phần yêu cầu bảo hộ và/hoặc các đoạn, thuật ngữ như "bao gồm", "được bao gồm", "gồm" và các thuật ngữ tương tự có thể có nghĩa liên quan tới Luật Sáng chế Mỹ; ví dụ, chúng có thể có nghĩa "bao hàm", "được bao hàm", "kể cả", và các thuật ngữ tương tự; và thuật ngữ như "về cơ bản cấu thành từ" và "về cơ bản được cấu thành từ" có nghĩa liên quan tới Luật Sáng chế Mỹ, ví dụ, chúng cho phép các yếu tố không được đề cập rõ ràng, nhưng các yếu tố loại trừ được tìm thấy trong tình trạng kỹ thuật đã biết hoặc có ảnh hưởng tới đặc tính cơ bản hoặc mới theo sáng chế.

Tạo dòng vô tính. Việc lựa chọn và nhân giống (a) vật liệu di truyền từ cá thể riêng biệt, (b) vector chứa một gen hoặc đoạn gen, hoặc (c) một sinh vật chứa một gen hoặc đoạn gen này.

Vector tạo dòng vô tính. Trình tự plasmid, virus, retrovirus, thể thực khuẩn, cosmit, nhiễm sắc thể nhân tạo (vi khuẩn hoặc nấm men), hoặc axit nucleic có thể được sao mã ở tế bào vật chủ, được đặc trưng bởi một hoặc một số ít vị trí nhận diện endonucleaza hạn chế, tại đó trình tự này có thể bị cắt theo cách đã xác định trước, và có thể chứa chất đánh dấu tùy ý thích hợp để sử dụng trong việc nhận diện các tế bào đã chuyển nhiễm, ví dụ, chất kháng tetracyclin hoặc chất kháng ampicilin. Vector tạo dòng vô tính có thể hoặc không thể có các đặc tính cần thiết để điều khiển vector biểu hiện.

Biểu hiện. Quá trình này được thực hiện bởi gen cấu trúc để tạo ra polypeptit. Việc biểu hiện đòi hỏi quá trình phiên mã ADN, cải biến sau phiên mã của sản phẩm phiên mã ARN ban đầu, và dịch mã ARN.

Cat-xét biểu hiện. Trình tự axit nucleic trong vector cần được phiên mã, và gen khởi đầu để điều khiển quá trình phiên mã. Cat-xét biểu hiện có thể chứa một hoặc nhiều trình tự ADN không liên quan mã hóa một hoặc nhiều peptit quan tâm.

Trình tự đối chứng biểu hiện. Trình tự đối chứng biểu hiện là các trình tự ADN bao hàm theo cách bất kỳ trong việc kiểm soát quá trình phiên mã hoặc dịch mã và cần bao hàm cả gen khởi đầu. Các trình tự đối chứng biểu hiện thích hợp và phương pháp tạo ra và sử dụng chúng là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật.

Vector biểu hiện. Đơn vị sao chép như plasmid, virus, retrovirus, thể thực khuẩn, cosmit, nhiễm sắc thể nhân tạo (vi khuẩn hoặc nấm men), hoặc trình tự axit nucleic có thể sao chép trong tế bào vật chủ, được đặc trưng bởi vị trí nhận diện endonucleaza hạn chế mà tại đó trình tự này có thể được cắt theo cách đã định trước để cài xen trình tự ADN khác loại. Vector biểu hiện có gen khởi đầu nằm ngược chiều với vị trí tại đó trình tự này bị cắt để xen cài trình tự ADN khác loại vào, vị trí nhận diện được lựa chọn sao cho gen khởi đầu được liên kết điều khiển với trình tự ADN khác loại. Trình tự ADN khác loại "được liên kết điều khiển" với gen khởi đầu trong tế bào khi ARN polymeraza gắn kết trình tự gen khởi đầu phiên mã trình tự mã hóa trong mRNA, tiếp đó dịch mã vào protein đã được mã hóa bởi trình tự mã hóa.

Thuật ngữ "axit nucleic" và "polynucleotit" dùng để chỉ ARN hoặc ADN là mạch thẳng hoặc mạch nhánh, sợi đơn hoặc kép, hoặc dạng lai của chúng. Thuật ngữ này cũng bao gồm cả các dạng lai ARN/ADN. Ví dụ không hạn chế dưới đây về polynucleotit: gen hoặc mảnh gen, exon, intron, mRNA, tRNA, rRNA, ribozym, cADN, polynucleotit tái tổ hợp, polynucleotit mạch nhánh, plasmid, vector, ADN

phân lập của trình tự bất kỳ, ARN phân lập của trình tự bất kỳ, đoạn dò và đoạn môi axit nucleic. Polynucleotit có thể bao gồm nucleotit cải biến, như nucleotit được metyl hóa và các gen tương tự nucleotit, uraxyl, các đường khác và các nhóm liên kết như flororiboza và thiolat, và các nhánh nucleotit. Trình tự nucleotit có thể còn được cải biến sau khi polyme hoá, như bằng cách tiếp hợp, với thành phần đánh dấu. Các loại cải biến khác bao hàm trong định nghĩa này là dạng mũ, thể một hoặc nhiều nucleotit xuất hiện trong tự nhiên bằng gen tương tự, và đưa ra các phương pháp gắn kết polynucleotit với protein, ion kim loại, thành phần đánh dấu, polynucleotit hoặc chất mang rắn khác. Polynucleotit có thể thu được bằng cách tổng hợp hóa học hoặc có nguồn gốc từ vi sinh vật.

Thuật ngữ “gen” được sử dụng rộng rãi để chỉ phân đoạn bất kỳ của polynucleotit liên quan tới chức năng sinh học. Do đó, các gen bao gồm intron và exon như trong trình tự bộ gen, hoặc chỉ là các trình tự mã hóa như trong cADN và/hoặc trình tự điều hòa cần để biểu hiện. Ví dụ, gen cũng dùng để chỉ mảnh axit nucleic biểu hiện mRNA hoặc ARN chức năng, hoặc mã hóa protein đặc hiệu, và bao hàm cả trình tự điều hòa.

Thành phần sinh học “được phân lập” (như axit nucleic hoặc protein hoặc bào quan) dùng để chỉ thành phần về cơ bản được tách riêng hoặc tinh chế ra khỏi các thành phần sinh học khác trong tế bào của vi sinh vật trong đó thành phần này xuất hiện trong tự nhiên, chẳng hạn, ADN và ARN nhiễm sắc thể và ngoài nhiễm sắc thể, protein, và bào quan khác. Axit nucleic và protein đã “được phân lập” bao gồm axit nucleic và protein được tinh chế bằng các phương pháp tinh chế tiêu chuẩn. Thuật ngữ này cũng bao gồm axit nucleic và protein đã được điều chế bằng kỹ thuật tái tổ hợp cũng như tổng hợp hóa học.

Thuật ngữ “tinh chế” được sử dụng trong bản mô tả không yêu cầu độ tinh khiết tuyệt đối; tốt hơn là dự định được dùng là thuật ngữ tương đối. Do đó, ví dụ, chế phẩm polypeptit tinh chế một phần là chế phẩm trong đó polypeptit được làm giàu hơn so với polypeptit ở trong môi trường tự nhiên của nó. Đây là polypeptit được tách riêng từ các thành phần tế bào. “về cơ bản được tinh chế” có nghĩa là ít nhất 60%, ít nhất 70%, ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc ít nhất 98%, hoặc nhiều thành phần hoặc vật liệu tế bào đã được loại bỏ. Tương tự, polypeptit có thể tinh chế một phần. “Tinh chế một phần” có nghĩa là ít hơn 60% thành phần hoặc vật liệu tế bào đã được loại bỏ. Thuật ngữ này cũng được áp dụng cho polynucleotit. Polypeptit nêu trong bản mô tả có thể được tinh chế bằng cách bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật.

Các biến thể bao gồm các biến thể alen. Thuật ngữ “biến thể alen” dùng để chỉ polynucleotit hoặc polypeptit chứa các dạng đa hình, làm thay đổi trình tự axit

amin của protein và tồn tại trong quần thể tự nhiên (ví dụ, loài hoặc thứ của virus). Các dạng biến đổi alen tự nhiên như vậy có thể thường làm biến đổi 1-5% trong polynucleotit hoặc polypeptit. Các biến thể alen có thể được xác định bằng cách tạo trình tự axit nucleic quan tâm ở nhiều loài khác nhau, có thể được thực hiện một cách dễ dàng bằng cách sử dụng đoạn dò lai hóa để xác định locut di truyền của cùng một gen trong các loài này. Các dạng biến đổi axit nucleic bất kỳ và toàn bộ các dạng biến đổi axit nucleic như vậy và các dạng đa hình hoặc biến đổi axit amin thu được là kết quả của quá trình biến đổi alen tự nhiên và không làm thay đổi hoạt tính chức năng của gen quan tâm, được dự định nằm trong phạm vi của sáng chế.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "dẫn xuất" hoặc "biến thể" dùng để chỉ polypeptit, hoặc axit nucleic mã hóa polypeptit, có một hoặc nhiều dạng biến đổi axit amin bảo toàn hoặc các cải biến không đáng kể khác sao cho (1) polypeptit tương ứng về cơ bản có chức năng tương đương so với polypeptit kiểu hoang hoặc (2) kháng thể được tạo ra để kháng polypeptit, phản ứng miễn dịch với polypeptit kiểu hoang. Các biến thể hoặc dẫn xuất này bao gồm polypeptit có các cải biến không đáng kể của trình tự axit amin sơ cấp của polypeptit rotavirus, từ đó tạo ra các peptit về cơ bản có hoạt tính tương đương so với polypeptit đối chiếu không được cải biến. Các cải biến như vậy có thể được tính toán cẩn thận, như bằng cách tạo đột biến trực tiếp tại vị trí, hoặc có thể diễn ra tự phát. Thuật ngữ "biến thể" còn bao hàm đoạn khuyết, đoạn bổ sung và đoạn thể vào trình tự, với điều kiện các chức năng polypeptit để tạo ra đáp ứng miễn dịch như được xác định trong bản mô tả.

Thuật ngữ "biến đổi bảo toàn" dùng để chỉ việc thế gốc axit amin bằng gốc sinh học tương tự khác, hoặc việc thế nucleotit trong trình tự axit nucleic sao cho gốc axit amin đã mã hóa không bị biến đổi hoặc là gốc sinh học tương tự khác. Về vấn đề này, cụ thể là các đoạn thể thường được bảo toàn trong tự nhiên, như đã nêu trên.

"Vector" dùng để chỉ plasmit hoặc virus chứa ADN hoặc ARN tái tổ hợp bao gồm polynucleotit khác loại được đưa tới tế bào đích, ở *in vitro* hoặc *in vivo*. Polynucleotit khác loại có thể bao gồm trình tự quan tâm nhằm mục đích phòng ngừa hoặc trị liệu, và tùy ý có thể ở dạng cat-xét biểu hiện. Như được sử dụng trong bản mô tả, vector không cần có khả năng sao chép trong tế bào đích hoặc đối tượng cuối cùng. Thuật ngữ này bao hàm cả vector tạo dòng và vector virus.

Thuật ngữ "tái tổ hợp" có nghĩa là polynucleotit có nguồn gốc bán tổng hợp, hoặc tổng hợp, không có trong tự nhiên hoặc được liên kết với polynucleotit khác với cách sắp xếp không tìm thấy được trong tự nhiên.

"Khác loại" có nghĩa là có nguồn gốc từ thực thể khác biệt về mặt di truyền

so với phần thực thể mà nó cần được so sánh. Ví dụ, bằng công nghệ di truyền, polynucleotit có thể được đưa vào plasmid hoặc vectơ có nguồn gốc từ nguồn khác nhau, và là polynucleotit khác loại. Gen khởi đầu được loại ra khỏi trình tự mã hóa tự nhiên của nó và được liên kết điều khiển với trình tự mã hóa khác so với trình tự tự nhiên, là gen khởi đầu khác loại.

Polynucleotit theo sáng chế có thể bao gồm các trình tự bổ sung, như trình tự mã hóa bổ sung nằm trong cùng đơn vị phiên mã, các yếu tố kiểm soát như gen khởi đầu, vị trí gắn kết ribosom, 5'UTR, 3'UTR, gen kết thúc phiên mã, vị trí polyadenyl hóa, đơn vị phiên mã bổ sung trong quá trình kiểm soát cùng một gen khởi đầu hoặc gen khởi đầu khác nhau, các trình tự cho phép tạo dòng, biểu hiện, tái tổ hợp tương đồng, và biến nạp tế bào vật chủ, và cấu trúc bất kỳ như vậy là có thể mong muốn để tạo ra các phương án theo sáng chế.

Mã hóa hoặc liên kết điều khiển. Mã hóa điều khiển hoặc liên kết điều khiển dùng để chỉ liên kết chức năng giữa gen khởi đầu và trình tự axit nucleic, trong đó gen khởi đầu bắt đầu quá trình phiên mã ARN tương ứng với trình tự ADN. Trình tự ADN khác loại "được liên kết điều khiển" với gen khởi đầu trong tế bào khi ARN polymeraza gắn kết với trình tự gen khởi đầu phiên mã trình tự mã hóa vào mRNA, tiếp đó được dịch mã thành protein đã mã hóa bởi trình tự mã hóa này.

Gen khởi đầu. Trình tự ADN nằm trong trình tự ADN lớn hơn xác định vị trí để which ARN polymeraza có thể gắn kết và bắt đầu quá trình phiên mã. Gen khởi đầu có thể gồm cả gen tăng cường ngoại biên tùy ý hoặc các yếu tố kìm hãm. Gen khởi đầu có thể là tương đồng, tức là xuất hiện một cách tự nhiên nhằm hướng tới việc biểu hiện axit nucleic mong muốn, hoặc các khác loại, tức là xuất hiện một cách tự nhiên nhằm hướng tới việc biểu hiện axit nucleic có nguồn gốc từ gen không phải axit nucleic mong muốn. Gen khởi đầu có thể là yếu tố cơ bản chủ yếu hoặc cảm ứng.

Vacxin. Vacxin được xác định theo nghĩa rộng trong bản mô tả này dùng để chỉ loại chất sinh học bất kỳ ở dạng dùng được có khả năng kích thích đáp ứng miễn dịch bảo vệ ở động vật đã được chủng ngừa bởi vacxin.

Các phương án thực hiện sáng chế

Sáng chế đề xuất virus gây bệnh Marek (MDV) tái tổ hợp, trong đó nó được cài xen vào thông qua đoạn lặp dài ở đầu cuối (LTR), tái tổ hợp tương đồng có nguồn gốc từ virus gây bệnh lưới nội mô không tăng bạch cầu (REV). Các đoạn tái tổ hợp này có khả năng tạo ra đáp ứng miễn dịch ở gia cầm đối với virus gây bệnh Marek nhưng không gây ra tình trạng bệnh lý nghiêm trọng cho gia cầm. Như được dùng trong bản mô tả, "không gây ra tình trạng bệnh lý nghiêm trọng" được xác

định là không quan sát thấy có tổn thương MD đặc hiệu bằng mắt thường ở các loài gia cầm đã được tiêm chủng/thử nghiệm, ngay cả ở các loài gia cầm rất dễ mắc. Theo các phương án cụ thể, các loài gia cầm này là gà.

CVRM-2 được tạo ra bởi các tác giả Reddy và cộng sự, như được mô tả trong tài liệu của họ, và như được tóm tắt trong các FIG.1 và 2 của sáng chế này. Trong quá trình nhận mẫu CVRM2, Người nộp đơn tiến hành phân tích ngay dựa trên PCR một cách cẩn thận để khẳng định tính đồng nhất/tính toàn vẹn của thể phân lập virus (FIG.3 thể hiện quá trình dung giải gel agarosa của các sản phẩm đã khuếch đại). Người nộp đơn bất ngờ phát hiện ra mẫu này không phải là thể phân lập dòng vô tính, mà trên thực tế là tổ hợp của CVRM2 tái tổ hợp và chủng MDV bố mẹ. Sau đó, Người nộp đơn tiến hành tinh chế mẫn cần thiết để thu được thể phân lập tinh khiết chỉ cấu thành từ CVRM2 (và không gồm chủng MDV Rispens bố mẹ). Để cho rõ ràng, thể phân lập dòng đơn tính, mới được gọi là “RN1250” trong bản mô tả này.

MDV tái tổ hợp theo sáng chế này có thể được tạo ra bằng cách cải biến MDV kiểu huyết thanh 1 chủng CVI988, hoặc dòng vô tính của nó hoặc chủng đã xử lý bằng cách cấy chuyển liên tiếp, được gọi chung là chủng “CVI988/X”. Do đó, như được dùng trong bản mô tả CVI988/X bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chủng cấy chuyển thấp đã nêu trước đây, CVI988/Rispens (Rispens et al., 1972, Avian Dis., 16:106-125 and 126-138), chủng CVI988 dòng vô tính C (CVI988/C) (De Boer, Patent Mỹ số 4,673,572, và De Boer et al., 1986, Avian Dis. 30:276-283), và CVI988/C/R6 (De Boer et al., 1988, Advances in Marek's Disease Research, pp. 405-413). Nội dung của mỗi đơn sáng chế/patent nêu trên được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến chủng MDV mới, tái tổ hợp, đã được làm suy yếu, được tạo ra để thay thế cho một phần trình tự CVI988/X tự nhiên với ADN ngoại sinh, bao gồm trình tự đoạn lặp ở đầu cuối (LTR) từ virus gây bệnh lưới nội mô không tăng bạch cầu (REV).

Theo một phương án, quá trình tái tổ hợp chủng CVI988 đạt hiệu quả bằng cách sử dụng chủng RM1 của MDV kiểu huyết thanh 1 làm nguồn LTR ngoại sinh (RM1 là MDV tái tổ hợp mà REV LTR được hợp nhất vào). Như đã thể hiện ở FIG. 2, REV LTR được cắt ra khỏi ADN virus của RM1 đã tinh chế bằng cách tiêu Pac 1 và được cài xen vào vectơ con thoi, B40, được điều chế từ chủng virus gây bệnh Marek rất độc Md5. Vectơ tái tổ hợp thu được B40-Pac, được sử dụng để cài xen LTR vào chủng virus gây bệnh Marek CVI988. Để tạo ra MDV tái tổ hợp với LTR, ADN virus đã tinh chế của chủng CVI988 của MDV được đồng biến nạp vào các tế bào nguyên bào sợi phôi gà hoặc vịt (CEF hoặc DEF) với vectơ tái tổ hợp đã

tiêu Not I. Các virus tái tổ hợp có RM1 LTR đã hợp nhất vào bộ gen của chúng được sao chép nhanh hơn so với chủng CVI988 bố mẹ. Không gắn kết với giả thuyết nào, tin rằng tốc độ sao chép tăng lên là kết quả của quá trình cài xen virus gây bệnh lưới nội mô không tăng bạch cầu LTR vào bộ gen của MDV ngược của gen ICP4.

Theo phương án khác, MDV CVI988/X có thể được cải biến bằng cách bổ sung virus gây bệnh lưới nội mô không tăng bạch cầu LTR đã phân lập từ các nguồn không phải là chủng RM1. Chẳng hạn, vị trí cài xen của LTR trong chủng RM1 của MDV được chỉ ra là cần nằm giữa IRL và IRS của bộ gen (Jones et al., 1996, Retroviral insertional activation in a herpesvirus: transcriptional activation of US genes by an integrated long terminal repeat in a MDV clone, J. Virology, 70(4):2460-2467). Vị trí này gần như tương ứng với vị trí 152,745 của các chủng virus gây bệnh Marek Md5. Vùng này nằm trong đoạn dài EcoRI gồm 1.704 cặp bazơ (các nucleotit 152, 198-153, 902) của Md5 kiểu huyết thanh 1 (Tulman et al., 2000, The genome of a very virulent Marek's disease virus, J. Virology, 74d7):7980-7988). Đoạn EcoRI dài 1.704 bp này có thể được tạo dòng vô tính vào plasmid vector không chứa vị trí DraIII endonuclease giới hạn và được sử dụng làm vector dịch chuyển để đưa LTR bất kỳ vào bộ gen MDV. Đoạn EcoRI này có một vị trí giới hạn DraIII duy nhất nằm ngược chiều cách vùng LTR ở RM1 10 bp. Các LTR có thể được cài xen vào vị trí DraIII của đoạn EcoRI gồm 1.704 cặp bazơ để tạo ra vector dịch chuyển LTR, từ đó tạo ra MDV tái tổ hợp với đoạn cài xen LTR, vector dịch chuyển này cần tạo tuyến tính với EcoRI, được chiết bằng phenol và cloroform và được kết tủa bằng ethanol. Quá trình đồng biến nạp của vector dịch chuyển tuyến tính cùng với ADN từ chủng MDV kiểu huyết thanh 1 bất kỳ vào các tế bào chấp nhận trong môi trường nuôi cấy sẽ đưa trình tự LTR vào bộ gen MDV bằng cách tái tổ hợp tương đồng.

Tài liệu Reddy et al. nêu trên chỉ ra rằng virus tái tổ hợp thu được (tức là MDV với LTR gây bệnh lưới nội mô không tăng bạch cầu) cần “phát triển nhanh hơn so với chủng MDV bố mẹ tương ứng của nó, và từ đó không cần tinh chế mẫn”. Tuy nhiên, Người nộp đơn bất ngờ phát hiện ra rằng mẫu CVRM-2 trên thực tế là dạng kết hợp của MDV tái tổ hợp cộng với MDV bố mẹ tương ứng của nó, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật cần tinh chế mẫn của toàn bộ MDV tái tổ hợp như đã nêu trong bản mô tả này. Đây là điều đặc biệt quan trọng do người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật có thể hỗ trợ sai để loại bỏ MDV tái tổ hợp hữu ích sau khi thu được các kết quả chứng tỏ rằng quá trình tạo miễn dịch bằng virus không tạo ra tác dụng bảo vệ đủ để chống lại việc thử

nghiệm MDV gây độc tính sau này (xem Bảng 1 của Reddy et al., trong đó CVRM-2 tạo ra khả năng bảo vệ nhỏ hơn 80%).

Theo phương án khác, MDV tái tổ hợp có RETV LTR có thể được điều chế từ MDV bất kỳ, bao gồm cả các chủng CVI988/X khác, bằng cách sử dụng CVRM-2 đã lưu giữ, với điều kiện là CVRM-2 là mảnh đã được tinh chế để đảm bảo rằng virus này là RN1250, chứ không phải dạng kết hợp của RN1250 và chủng MDV bố mẹ.

Nhiều REV LTR là thích hợp để sử dụng trong bản mô tả này. Nhiều LTR virus gây bệnh lưới nội mô không tăng bạch cầu thích hợp được phân lập và mô tả, và bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở các loại LTR đã được mô tả bởi Kost et al. (1993, Retrovirus insertion into herpesvirus: characterization of a virus gây bệnh Marek harboring a solo LTR, *Virology*, 192:161-169), Ridgway (1992, REV LTR elements are efficient promoters in cells of various species and tissue origin, including human lymphoid cells, *Gene*, 121:213-218), Boerkoel và Kung [1992, Transcriptional interaction between retroviral long terminal repeats (LTRs): mechanism of 5' LTR suppression and 3' LTR promoter activation of c-myc in avian B-cell lymphomas, *J. Virol.*, 66:4814-4823], Hippenmeyer và Krivi (1991, Gene expression from heterologous promoters in a replication -defective avian retrovirus vector in quail cells, *Poult. Sci.*, 70:982-92), Ridgway et al. (1989, Transient expression analysis of the reticuloendotheliosis virus long terminal repeat element, *Nucleic Acids Res.*, 17:3199-3215), Embretson và Temin (1987, Transcription from a spleen necrosis virus 5' long terminal repeat is suppressed in mouse cells, *J. Virol.*, 61:3454-3462), Notani và Sauerbier (1987, Sequence instability in the long terminal repeats of avian spleen necrosis virus and reticuloendotheliosis virus, *J. Mol. Evol.*, 25:241-247), Robinson và Gagnon (1986, Patterns of proviral insertion and deletion in avian leukosis virus-induced lymphomas, *J. Virol.*, 57:28-36), và Ridgway et al., (1985, In vitro transcription analysis of the viral promoter involved in c-myc activation in chicken B lymphomas: detection and mapping of two RNA initiation sites within the reticuloendotheliosis virus long terminal repeat, *J. Virol.*, 54:161-170). Nội dung của mỗi tài liệu công bố này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn, ngoài ra, nhiều trình tự LTR là có sẵn trong Ngân hàng gen và các dữ liệu về bộ gen khác và có thể được tổng hợp bởi PCR bằng cách sử dụng các đoạn môi đặc hiệu LTR. Sau đó, các trình tự đã khuếch đại PCR có thể được cài xen vào vector dịch chuyển bất kỳ trong số hai vector dịch chuyển như đã nêu trên.

Các trình tự axit nucleic REV LTR đã nêu trong bản mô tả, hoặc các dạng tương đương về chức năng sinh học của chúng, có thể được sử dụng theo sáng chế.

Cụm từ "dạng tương đương về chức năng sinh học" như được dùng trong bản mô tả, dùng để chỉ các trình tự axit nucleic có hoạt tính sinh học/bảo vệ miễn dịch như nhau hoặc tương đương như trình tự axit nucleic LTR virus gây bệnh lưới nội mô không tăng bạch cầu nêu trên (tức là khi đưa vào vật chủ CVI988 MDV theo cách điều khiển chức năng, chúng sẽ tạo ra đáp ứng miễn dịch bảo vệ mà không gây ra tình trạng bệnh lý nghiêm trọng ở gà).

Ví dụ, các trình tự axit nucleic đã nêu trong bản mô tả có thể được thay đổi bằng cách thế, cài xen, bổ sung, hoặc khuyết bazơ, để tạo ra các axit nucleic tương đương về mặt chức năng sinh học mà vẫn giữ được hoạt tính của gen khởi đầu hoặc gen tăng cường.

Các biến thể của ADN hoặc cADN của bộ gen (nếu thu được bằng RT-PCR từ ARN), dự định trong bản mô tả này cần có mức tương đồng lớn hơn 75%, tốt hơn là lớn hơn 85%, và tốt nhất là lớn hơn 95%, so với REV LTR xuất hiện trong tự nhiên đã nêu trong bản mô tả này.

Vaccine chứa virus gây bệnh Marek tái tổ hợp theo sáng chế có thể được bào chế ở dạng chế phẩm vô bào, hoặc theo phương án ưu tiên, ở dạng chế phẩm liên kết tế bào. Vaccine liên kết tế bào có thể được bào chế trực tiếp từ môi trường nuôi cấy in vitro chứa các tác nhân virus sống trong môi trường nuôi cấy thích hợp, như nguyên bào sợi phôi gà như được mô tả bởi Witter (US4,895,718, nội dung của tài liệu này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn). Theo cách khác, để bào chế chất chủng ngừa virus vô bào, các tế bào từ mô vật chủ hoặc môi trường nuôi cấy tế bào đã nhiễm được siêu âm hoặc theo cách khác được phá vỡ như đã mô tả nêu trên. Mảnh vụn tế bào được loại bỏ bằng cách ly tâm và dịch ly tâm đã thu hồi được làm chất chủng ngừa. Hơn nữa, khi vaccine được ưu tiên là virus sống, thì cũng nhận thấy rằng vaccine này có thể được bào chế từ virus đã chết hoặc từ các thành phần miễn dịch đã tách riêng khỏi virus, mặc dù quy trình xử lý này cần chi phí khá lớn. Ví dụ, vaccine tiểu phần có thể được bào chế bằng cách tách riêng ra khỏi virus đã chết, một hoặc nhiều protein virus đã tinh chế được xác định là có đặc tính gây miễn dịch.

Tác nhân virus được điều chế để dùng bằng cách tạo ra với liều tạo miễn dịch hữu hiệu với chất mang hoặc chất pha loãng được dùng, như nước muối sinh lý hoặc môi trường nuôi cấy mô. Thuật ngữ "liều tạo miễn dịch hữu hiệu" được xác định là lượng sẽ tạo ra tính miễn dịch ở gà chống lại việc thử nghiệm bởi chủng gây độc chứa virus gây bệnh Marek, tính miễn dịch này được xem là được cảm ứng trong quần thể gà khi mức độ bảo vệ đối với quần thể này là cao hơn đáng kể so với mức độ bảo vệ của nhóm đối chứng không được chủng ngừa (đã xác định với độ tin cậy ít nhất bằng 80%, tốt hơn nếu được xác định với độ tin cậy bằng 95%). Một

cách xác định mức độ bảo vệ là chỉ số bảo vệ (Pi), được tính toán bởi tỷ lệ mắc phải của MD ở các nhóm đối chứng không được chủng ngừa, đã thử nghiệm MDV trừ đi tỷ lệ mắc phải của MD ở các nhóm được chủng ngừa, đã thử nghiệm MDV, và hiệu số này được chia cho tỷ lệ phần trăm mắc bệnh Marek ở nhóm không được chủng ngừa, đã thử nghiệm MDV, sau đó nhân với 100.

Thông thường, vaccin chứa ít nhất khoảng 200 PFU (plaque-forming units - đơn vị tạo mảng) của virus, và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 2000 đến 5000 PFU. Vaccin có thể được dùng thích hợp vào thời điểm bất kỳ sau khi gà đã có khả năng miễn dịch, tức là vào khoảng ngày thứ 18 sau khi ủ bệnh (3 ngày trước khi nở trứng); nhưng nó thường được dùng bằng cách chủng ngừa trong vòng 24-48 giờ sau khi nở trứng. Theo cách khác, ADN virus tái tổ hợp có thể được dùng ở dạng vaccin ADN như được mô tả bởi Tischer et al. (2002, J. Gen. Virology, 83:2367-2376, nội dung của tài liệu này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn).

Các chất bổ trợ thích hợp như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật cũng có thể bao gồm trong chế phẩm vaccin. Trong nhiều trường hợp, hiệu lực của vaccin có thể được tăng lên bằng cách kết hợp các virus gây bệnh Marek tái tổ hợp theo sáng chế với các tác nhân virus khác vào vaccin nhị giá hoặc đa giá.

Theo phương án khác, chất mang, tá dược hoặc tá dược lỏng được dùng hoặc dùng được trong thú y có thể là nhũ tương nước trong dầu. Vẫn theo phương án khác, nhũ tương nước trong dầu này có thể là nhũ tương 3 thành phần nước/dầu/nước (W/O/W). Vẫn theo phương án khác, chất mang, tá dược hoặc tá dược lỏng được dùng hoặc dùng được trong thú y có thể là nhũ tương dầu trong nước.

Phương pháp dùng và vật phẩm sản xuất

Sáng chế bao gồm cả các phương án về phương pháp dưới đây. Theo một phương án, phương pháp chủng ngừa cho gia cầm bao gồm bước dùng chế phẩm bao gồm virus gây bệnh Marek (MDV).

Theo một phương án của sáng chế, phác đồ dùng liều tăng cường có thể được áp dụng, bao gồm ít nhất một liều dùng chủ yếu và ít nhất một liều dùng tăng cường bằng cách sử dụng ít nhất một polypeptit, kháng nguyên, epitop hoặc chất sinh miễn dịch thông thường. Thông thường, chế phẩm miễn dịch hoặc vaccin sử dụng trong liều dùng chủ yếu là khác về bản chất so với chế phẩm miễn dịch hoặc vaccin sử dụng ở liều dùng tăng cường. Tuy nhiên, cần lưu ý rằng cùng một loại chế phẩm có thể được sử dụng làm liều dùng chủ yếu và liều dùng tăng cường. Tiến trình dùng liều này được gọi là “chủ yếu-tăng cường”.

Phác đồ dùng liều tăng cường bao gồm ít nhất một liều dùng chủ yếu và ít nhất một liều dùng tăng cường bằng cách sử dụng ít nhất một polypeptit thông

thường và/hoặc các biến thể hoặc mảnh của nó. Vacxin sử dụng trong liều dùng chủ yếu có thể khác về bản chất so với vacxin sử dụng làm vacxin tăng cường sau. Liều dùng chủ yếu có thể bao gồm một hoặc nhiều liều dùng. Tương tự, liều dùng tăng cường có thể bao gồm một hoặc nhiều liều dùng.

Thể tích liều của chế phẩm thường nằm trong khoảng từ 0,1 đến 2,0 ml, nằm trong khoảng từ 0,1 đến 1,0 ml, và nằm trong khoảng từ 0,5 ml đến 1,0 ml.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này cần hiểu rằng sáng chế được tạo ra bằng cách ví dụ và sáng chế không bị giới hạn bởi các ví dụ này. Từ phần bộc lộ dưới đây và kiến thức đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật có thể xác định được số lần dùng, đường dùng, và liều cần dùng với mỗi liệu trình tiêm, mà không cần bất kỳ thử nghiệm quá mức nào.

Sáng chế bao hàm ít nhất một liều dùng cho động vật với lượng hữu hiệu của chế phẩm điều trị đã được bào chế theo sáng chế. Động vật có thể là con đực, con cái, con cái mang 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 qua mũi hoặc đường miệng. Chế phẩm điều trị theo sáng chế cũng có thể được dùng bằng các thiết bị không cần kim tiêm (ví dụ, bằng Pigjet, Dermojet, Biojector, Avijet (Merial, GA, USA), thiết bị Vetjet hoặc Vitajet (Bioject, Oregon, USA)). Phương pháp khác để dùng chế phẩm plasmit là sử dụng xung điện (xem, ví dụ, Tollefsen et al., 2002; Tollefsen et al., 2003; Babiuk et al., 2002; PCT Application No. WO99/01158). Theo phương án khác, chế phẩm điều trị được phân phối cho động vật bằng súng bắn gen hoặc bắn hạt vàng. Theo phương án có lợi, động vật là lợn, chó nhà, chồn sương hoặc hải cẩu.

Phương án khác theo sáng chế đề xuất kit để tiến hành phương pháp gây ra hoặc cảm ứng đáp ứng miễn dịch hoặc đáp ứng bảo vệ kháng MDV ở động vật bao gồm chế phẩm miễn dịch hoặc vacxin chứa MDV tái tổ hợp và hướng dẫn sử dụng để tiến hành phương pháp phân phối lượng hữu hiệu để gây ra đáp ứng miễn dịch ở động vật.

Phương án khác theo sáng chế là đề xuất kit để tiến hành phương pháp cảm ứng đáp ứng miễn dịch hoặc đáp ứng miễn dịch mà có thể bao gồm một chế phẩm hoặc vacxin chứa MDV tái tổ hợp bất kỳ và hướng dẫn sử dụng để tiến hành phương pháp này.

Các xytokin khác có thể được sử dụng trong sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, yếu tố kích thích khuẩn lạc tạo bạch cầu hạt (G-CSF), yếu tố kích thích khuẩn lạc bạch cầu hạt/đại thực (GM-CSF), interferon α (IFN γ), 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 gây chết hoại khối u α (TNF α), yếu tố gây chết hoại khối u β (TNF β), và yếu tố tăng trưởng biến nạp β (TGF β). Cần hiểu rằng các xytokin có thể được dùng đồng thời và/hoặc dùng liên tiếp với chế phẩm miễn dịch hoặc chế phẩm vacxin theo sáng chế. Do đó, chẳng hạn, vacxin theo sáng chế cũng có thể chứa phân tử axit nucleic ngoại sinh biểu hiện xytokin thích hợp *in vivo*, ví dụ, xytokin tương xứng với vật chủ này cần được chủng ngừa hoặc trong đó đáp ứng miễn dịch cần được tạo ra (chẳng hạn, xytokin của gia cầm đối với chế phẩm cần được dùng cho gia cầm).

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế được mô tả tiếp bằng các Ví dụ không hạn chế dưới đây.

Ví dụ 1 - Hiệu lực của virut gây bệnh Marek (MDV), các chủng SR-1, CVRM-2 RN1250 và RMI CN32399, và Rispens CN32553

Khía cạnh quan trọng của sáng chế này là sau khi hoàn thành nghiên cứu đưa ra trong Ví dụ này, các tác giả sáng chế sau đó sẽ xác định được rằng CVRM-2 MDV không phải là MDV tái tổ hợp tạo dòng vô tính, nhưng trên thực tế là tập hợp gồm RN1250 MDV tái tổ hợp và Rispens MDV bố mẹ. Do đó, các tác giả sáng chế đã tạo ra RN1250 MDV tạo dòng vô tính thích hợp, mà hiệu lực mạnh của virut ở dạng vacxin đã được chứng minh trong các Ví dụ sau, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật không hề ngạc nhiên về khoảng bảo vệ rộng (và không chấp nhận) (37-86%) dường như đã được tạo ra bởi CVRM-2 MDV trong nghiên cứu sơ bộ này.

Mục đích. Nhằm đánh giá và so sánh hiệu lực của ba chủng MDV SR-1 và Rispens thử nghiệm với sản phẩm vacxin thương mại (Rismavac®-Intervet, Inc.) ở gà SPF bằng cách sử dụng thử nghiệm miễn dịch sớm với MDV T. King.

Vật liệu/Phương pháp. Một trăm năm mươi con gà con một ngày tuổi SPF (đàn SPAFAS W-42) được chia ngẫu nhiên vào năm nhóm khác nhau, mỗi nhóm gồm ba mươi con (Các nhóm 1-5). Mỗi nhóm điều trị sau đó được chia ngẫu nhiên vào các đơn vị phân lập. Các con gà con ở Nhóm 1 được sử dụng làm nhóm đối chứng đã thử nghiệm, không được chủng ngừa trước tiên được đặt vào đơn vị phân lập áp lực âm, mười lăm con trong một đơn vị. Các nhóm còn lại (Các nhóm 2-5) tiếp đó được chủng ngừa dưới da (SQ) bằng 0,2ml trên một con với Intervet Rispens Rismavac®; MDV SR-1 RMI CN32399 P₄; MDV SR-1 CVRM-2 RN1250 P₄; hoặc MDV Rispens CN32553 P₄. Các con gà con đã chủng ngừa SQ ở các Nhóm 2-5 cũng được đặt vào đơn vị phân lập áp lực âm, 15 con trong một đơn vị.

Bốn này sau vào ngày nghiên cứu thứ 4, các con gà ở các Nhóm 1-5 được thử nghiệm riêng lẻ bằng MDV T. King, đã pha loãng theo tỷ lệ 1:500 (tiền trình 02-085 02 tháng 1, 03). Các con gà được thử nghiệm theo đường trong màng bụng (IP), với 0,2ml trên một con. Các con vật này được quan sát 49 ngày sau khi thử nghiệm. Con gà bất kỳ mà chết trước ngày nghiên cứu thứ 53 được mổ xác và được thử nghiệm về các tổn thương do MDV. Vào ngày thứ 53, các con gà còn lại được đem giết, được mổ xác và được thử nghiệm về các tổn thương do MDV.

Kết quả. Các chủng MDV SR-1 và Rispens thử nghiệm tạo ra mức độ bảo vệ bằng 37-86% đối với thử nghiệm MDV T. King sớm. Intervet's Rismavac® có mức độ bảo vệ bằng 83%. Thử nghiệm đạt được hiệu lực ở các con gà đối chứng đã thử nghiệm, không được chủng ngừa chỉ ra rằng tỷ lệ mắc phải MD bằng 97%.

Ví dụ 2 – Hiệu lực của vacxin MDV, SR-1, RN1250 ở gà giò thương mại bằng cách sử dụng mô hình thử nghiệm Shedder

Nguyên liệu & Phương pháp: Bảy mươi sáu (76) gà giò thương mại một ngày tuổi lấy từ đàn gia cầm Harrison 1-1 được chia ngẫu nhiên vào ba chuồng khác nhau và bốn nhóm khác nhau như sau: Nhóm 1: 13 con; Nhóm 2: 13 con; Nhóm 3: 25 con; và Nhóm 4: 25 con (một chuồng được chia thành hai phần để tạo ra vòng quay một và vòng quay hai). Sau khi chia ngẫu nhiên, các con gà được kẹp vào phần gáy cổ để nhận diện và tiếp đó cho tiêm chủng 0,2 ml vvMDV T cho một con theo đường trong màng bụng (IP). Thử nghiệm King, đã pha loãng theo tỷ lệ 1:500. Sau khi thử nghiệm, các con gà này được cho vào các chuồng tương ứng của chúng, mỗi chuồng chứa 25-26 con. Các con gà này được nhốt trong chuồng trong 14 ngày trước khi thay bằng các con gà con đối chứng tiếp xúc, đã chủng ngừa MDV và không được chủng ngừa. Mười bốn ngày sau khi thay thế bằng các con mất sức, 304 gà giò thương mại một ngày tuổi được chia ngẫu nhiên như sau: hai nhóm với mỗi nhóm gồm 75 con (Các nhóm 3 và 4) và hai nhóm với mỗi nhóm gồm 38 và 40 con (Các nhóm 1 và 2), để tiến hành chủng ngừa; ngoài ra, hai nhóm gồm 25 con và hai nhóm gồm 13 con được sử dụng mà không được chủng ngừa, các con đối chứng tiếp xúc đối với các nhóm 1-4 (Nhóm 1: 13 con; Nhóm 2: 13 con; Nhóm 3: 25 con; và Nhóm 4: 25 con). Các con đối chứng tiếp xúc này được kẹp vào phần gáy cổ để nhận diện và được nhốt trong chuồng. Các con cho chủng ngừa được tiêm chủng được thực hiện theo đường dưới cơ (SQ) (0,2 ml trên một con) như sau: Nhóm 1 được chủng ngừa bằng RN1250 pre MSV, P6 (thể phân lập I); Nhóm 2 được chủng ngừa bằng RN1250 pre MSV, P7 (thể phân lập U); Nhóm 3 được chủng ngừa bằng RN1250 pre MSV, P7 (thể phân lập F); và Nhóm 4 được chủng ngừa bằng Rismavac® dãy 02760010, ngoại trừ 15 APR 2012. Sau khi

chủng ngừa, các con đã chủng ngừa được nhốt vào các chuồng như nhau trong đó các con đối chứng tiếp xúc, không được chủng ngừa, và các con mất sức được nhốt trước. Năm mươi (50) con gà giò thương mại khác không được tiêm chủng một ngày tuổi được cho vào chuồng trong các đơn vị phân lập, và được giữ trong 49 ngày để đảm bảo rằng nhóm thứ hai chứa các con đối chứng tiếp xúc ở ngày tiếp theo. Tất cả các con đã chủng ngừa được kẹp vào phần gáy cổ tám ngày sau bằng dải màu, có đánh số. Các con mất sức còn lại trong chuồng trong năm mươi ngày, và sau đó toàn bộ các con này được đem giết và mổ xác.

Bệnh và tỷ lệ tử vong trên lâm sàng được kiểm soát hàng ngày trong 49 ngày sau khi chủng ngừa. Các phần lá lách thu được từ con đối chứng tiếp xúc bất kỳ đã chết được thu gom để phân lập virus. Vào ngày thử nghiệm thứ 53, bốn mươi con gà giò thương mại không được tiêm chủng được nhốt trong các đơn vị phân lập, sao cho nhóm thứ hai gồm các con đối chứng tiếp xúc, được nhốt trong chuồng, các nhóm 1-4, theo danh mục ngẫu nhiên, 10 con trong một nhóm. Các con này được kẹp bằng các dải có đánh số trước khi thay thế để nhận diện. Các phần lá lách thu được từ các con này cũng được thu thập để phân lập virus trong trường hợp có con bị chết. Các con đã tiêm chủng ngừa còn lại và không được chủng ngừa ban đầu, các con đối chứng tiếp xúc được đem giết và mổ xác vào giai đoạn cuối của giai đoạn quan sát 49 ngày vào ngày thử nghiệm thứ 63. Các lá lách và ít nhất hai nang lông trên một con được thu gom từ 10 con đối chứng tiếp xúc để phân lập virus. Các con thử nghiệm được xác định bởi danh mục ngẫu nhiên. Vào ngày thử nghiệm thứ 83, các con đối chứng tiếp xúc còn lại được bổ sung vào các nhóm vào ngày thử nghiệm thứ 53 (nhóm thứ hai), được đem giết. Các lá lách và ít nhất hai nang lông trên một con được thu gom từ các con đối chứng tiếp xúc này để phân lập virus.

Bảng 1. Số con gà con sống sót tới năm ngày tuổi

Phác đồ	Nhóm	Tên	# sống sót tới 5 ngày tuổi/tổng số con
Đã chủng ngừa	1	RN1250 pre MSV (I)	38/38
Đã chủng ngừa	2	RN1250 pre MSV (U)	40/40
Đã chủng ngừa	3	RN1250 pre MSV (F)	73/75
Đã chủng ngừa	4	Rismavac [®]	73/75
Đối chứng tiếp xúc	1	RN1250 pre MSV (I)	12/13
Đối chứng tiếp xúc	2	RN1250 pre MSV (U)	13/13
Đối chứng tiếp xúc	3	RN1250 pre MSV (F)	22/25
Đối chứng tiếp xúc	4	Rismavac [®]	23/25

Bảng 2. Chỉ số bảo vệ chống lại vvMDV T. Kinh thử nghiệm

Phác đồ	Nhóm	Tên	# Số con nhiễm/tổng số con	Tỷ lệ nhiễm	Chỉ số bảo vệ ⁵
Đã chủng ngừa	1	RN1250 pre MSV (I) ¹	2/38	5,26%	87,4 (81,2) ⁶
Đã chủng ngừa	2	RN1250 pre MSV (U) ²	6/40	15,0%	2,6 (46,4) ⁶
Đã chủng ngừa	3	RN1250 pre MSV (F) ³	6/73	8,22%	84,9
Đã chủng ngừa	4	Rismavac ^{®4}	15/73	20,5%	63,7
Shedder	1	RN1250 pre MSV (I)	9/12	75,0%	N/A
Shedder	2	RN1250 pre MSV (U)	11/12	91,7%	N/A
Shedder	3	RN1250 pre MSV (F)	20/25	80,0%	N/A
Shedder	4	Rismavac [®]	22/24	91,7%	N/A
Đối chứng tiếp xúc	1	RN1250 pre MSV (I)	5/12	41,7%	N/A
Đối chứng tiếp xúc	2	RN1250 pre MSV (U)	2/13	15,4%	N/A
Đối chứng tiếp xúc	3	RN1250 pre MSV (F)	12/22	54,5%	N/A
Đối chứng tiếp xúc	4	Rismavac [®]	13/23	56,5%	N/A
Đối chứng lần thứ hai	1	RN1250 pre MSV (I)	9/10	90,0%	N/A
Đối chứng lần thứ hai	2	RN1250 pre MSV (U)	8/10	80,0%	N/A
Đối chứng lần thứ hai	3	RN1250 pre MSV (F)	9/10	90,0%	N/A
Đối chứng lần thứ hai	4	Rismavac [®]	8/10	80,0%	N/A

¹chuẩn độ vaccin RN1250 (I): 3600 pfu/0,2ml.²chuẩn độ vaccin RN1250 (U): 3144 pfu/0,2ml.³chuẩn độ vaccin RN1250 (F): 3710 pfu/0,2ml.⁴chuẩn độ vaccin Rismavac[®]: 2328 pfu/0,2ml.⁵Chỉ số bảo vệ: Tỷ lệ các con gà tiếp xúc không được chủng ngừa bị tổn thương MD (đối chứng thử nghiệm) - Tỷ lệ các con gà đã chủng ngừa bị tổn thương MD/Tỷ lệ các con tiếp xúc không được chủng ngừa bị tổn thương MD (đối chứng thử nghiệm).⁶Chỉ số bảo vệ chỉ ra tỷ lệ các con gà không được chủng ngừa đối chứng tiếp xúc bị tổn thương MD trong chuồng 10, Các nhóm 1 và 2, là chỉ một nhóm (28% hoặc 7 /25).

Kết luận. Vacxin ngừa bệnh Marek, Kiểu huyết thanh 1, Vacxin RN1250, pre MSV (I) và (F), là hữu hiệu hơn so với Rismavac® của Intervet ở gà giò thương mại bằng cách sử dụng MDV T. King trong mô hình thử nghiệm Shedder.

Ví dụ 3 – Độ an toàn của MDV RN1250 (X+5) ở gà con SPF một ngày tuổi

Hai trăm năm mươi con gà SPF, một ngày tuổi được chia ngẫu nhiên thành năm nhóm điều trị, mỗi nhóm gồm 50 con gà con, đồng thời chia ngẫu nhiên vào đơn vị phân lập áp lực âm đã sử dụng để nhốt trong chuồng. Một trăm con gà con được chỉ định là các con gà đã được chủng ngừa và được xác định là các nhóm 1 và 2. Một trăm con gà con được chỉ định là các con đối chứng tiếp xúc, đã được chủng ngừa giả của các nhóm 1 và 2 (các nhóm 4 và 5, tương ứng); các con gà con đã chủng ngừa giả còn lại (50) được cho vào Nhóm 3, đóng vai trò là nhóm đối chứng âm tính. Sau khi chọn ngẫu nhiên, các con đối chứng tiếp xúc, đã được chủng ngừa giả, và các con đối chứng âm tính, đã chủng ngừa giả được kẹp vào cánh các dải có đánh số để nhận diện và được nhốt vào các đơn vị tương ứng của chúng (7-10 con trong một đơn vị). Các con đã được chủng ngừa giả được tiêm chủng bằng dịch pha loãng chứa virus gây bệnh Marek, 0,2ml trên một con. Các con gà con được xác định là các con gà đã được chủng ngừa được tiêm chủng theo đường dưới da (SQ) bằng: RN1250 (X+5) (Nhóm 1) hoặc Rismavac® (Nhóm 2), 0,2ml trên một con (~ 5000-6500 đơn vị tạo mảng (pfu) trên một liều). Sau khi chủng ngừa, các con đã chủng ngừa được nhốt vào các đơn vị xác định của chúng (7-10 con trong một đơn vị) chứa các con đối chứng tiếp xúc, đã chủng ngừa giả, đã được nhốt vào chuồng trước đó, để tổng số gồm từ 15 đến 20 con gà con trong một đơn vị.

Bảng 3. Thiết kế nghiên cứu

NHÓM	VACXIN	Đường chủng ngừa*	Số con
1	MDV SR-1 RN1250	SQ	50
2	MDV SR-1 Rismavac®	SQ	50
3	Đã chủng ngừa giả (Đối chứng âm tính)	SQ	50
4	Đối chứng tiếp xúc, đã chủng ngừa giả cho các con gà con đã chủng ngừa bằng MDV SR-1 RN1250	SQ	50
5	Đối chứng tiếp xúc, đã chủng ngừa giả cho các con gà con đã chủng ngừa bằng MDV SR-1 Rismavac®	SQ	50

Vào ngày thử nghiệm thứ 7, mẫu bộ phận trong cơ thể (túi, tuyến ức và lá lách) thu được từ năm con gà con thuộc các nhóm 1-5, mỗi nhóm được chọn để thu thập và cố định trong 10% dung dịch đệm formalin để tiến hành mô bệnh học. Các con gà, 2-3 con trong một đơn vị, được chọn theo danh mục ngẫu nhiên. Vào ngày thử nghiệm thứ 14, trọng lượng cơ thể và trọng lượng các cơ quan (túi, tuyến ức và lá lách) của 15 con gà con thu được từ mỗi nhóm, các nhóm 1-5, được thu gom. Các mẫu trong cơ thể (túi, tuyến ức và lá lách) từ năm con gà con trong mỗi nhóm (Các nhóm 1-5) được thu thập và cố định trong 10% dung dịch đệm formalin. Hai đến ba con trong một đơn vị được sử dụng để cân trọng lượng và thu gom các bộ phận trong cơ thể. Các con gà được chọn theo danh mục ngẫu nhiên. Tiến trình thử nghiệm được mô tả vào ngày thử nghiệm thứ 14, được lặp lại vào ngày thứ 28, và vào ngày thứ 49 với các con còn lại.

Kết quả. RN1250 làm teo các bộ phận trong cơ thể. Tỷ lệ các túi của các con đã được chủng ngừa bằng vaccin MDV SR-1 RN1250 và tỷ lệ của con đối chứng tiếp xúc, đã được chủng ngừa giả là không khác biệt đáng kể so với tỷ lệ của các con đối chứng âm tính, đã được chủng ngừa giả, ngoại trừ rằng vào ngày thứ 28, tỷ lệ các túi của các con đối chứng tiếp xúc đối với MDVSR-1 RN1250 là cao hơn đáng kể so với tỷ lệ của nhóm đối chứng âm tính ($p \geq 0,0111$). Tỷ lệ các tuyến ức của các con đã chủng ngừa bằng vaccin MDVSR-1 RN1250 và tỷ lệ của con đối chứng tiếp xúc, đã được chủng ngừa giả là không khác biệt đáng kể so với tỷ lệ của các con đối chứng âm tính, đã được chủng ngừa giả ($p \geq 0,7265$). Cuối cùng, tỷ lệ lá lách của các con đã chủng ngừa bằng vaccin MDVSR-1 RN1250 và tỷ lệ con đối chứng tiếp xúc, đã được chủng ngừa giả là không khác biệt đáng kể so với tỷ lệ của các con đối chứng âm tính, đã được chủng ngừa giả ($p \geq 0,5286$).

Rismavac® làm teo các bộ phận trong cơ thể

Tỷ lệ của các túi của con đã chủng ngừa bằng vaccin MDVSR-1 Rismavac® và tỷ lệ con đối chứng tiếp xúc, đã được chủng ngừa giả là không khác biệt đáng kể so với that of các con đối chứng âm tính, đã được chủng ngừa giả ($p \geq 0,0581$). Tỷ lệ các tuyến ức of con đã chủng ngừa bằng vaccin MDVSR-1 Rismavac® và tỷ lệ con đối chứng tiếp xúc, đã được chủng ngừa giả là không khác biệt đáng kể so với tỷ lệ của các con đối chứng âm tính, đã được chủng ngừa giả ($p \geq 0,4004$). Tỷ lệ lá lách của con đã chủng ngừa bằng vaccin MDVSR-1 Rismavac® lớn hơn đáng kể so với tỷ lệ lá lách của đã được chủng ngừa giả, đối chứng âm tính vào ngày thứ 14 với giá trị $p = 0,0141$; và tỷ lệ lá lách của các con đối chứng tiếp xúc, đã chủng ngừa giả lớn hơn đáng kể so với tỷ lệ của các con đối chứng âm tính, đã được chủng ngừa giả, vào ngày thứ 28 với giá trị $p < 0,0001$. Các tỷ lệ này không khác nhau đáng kể ở các ngày khác bất kỳ ($p \geq 0,5558$). Kết quả thử nghiệm mô bệnh học

từ thử nghiệm mô bệnh học chứng minh rằng không có hiện tượng teo ở túi, tuyến ức hoặc lá lách của các con gà đã tiêm chủng bằng vacxin phòng bệnh Marek SR-1 RN1250 hoặc Rismavac®.

Kết luận. Trong các điều kiện của thử nghiệm này, MDV SR-1, RN1250, X+5 là an toàn khi dùng theo đường SQ, như được đánh giá bởi chứng teo tuyến ức, túi và/hoặc lá lách.

Ví dụ 4 – Khả năng gieo rắc bệnh khi dùng MDV, SR-1, RN1250 ở gà con SPF một ngày tuổi

Mục đích. Để đánh giá khả năng gieo rắc bệnh khi dùng vacxin thử nghiệm (X+5) MDV, SR-1, RN1250 ở gà (SPF) không gây bệnh đặc hiệu một ngày tuổi khi dùng theo đường SQ và xác định xem liệu nó có gây bệnh và lan tràn bệnh cho các con tiếp xúc, không được chủng ngừa hay không.

Nguyên liệu & Phương pháp. Một trăm hai mươi (120) con gà SPF một ngày tuổi được chia ngẫu nhiên vào ba nhóm điều trị khác nhau và sáu đơn vị, trong đó mỗi đơn vị chứa 15 các con gà đã được chủng ngừa và năm con gà đối chứng. Các con gà được chọn ngẫu nhiên vào nhóm tiếp xúc, được kẹp vào phần gáy cổ có các dải đánh số màu trong mỗi danh mục ngẫu nhiên và tiếp đó cho vào các đơn vị tương ứng của chúng. Các con gà được chọn ngẫu nhiên là các con gà đã được chủng ngừa được chủng ngừa bằng MDV RN1250 X+5 hoặc Rispens. Các vacxin thử nghiệm và thương mại được pha loãng thành dịch pha loãng Marek để tạo ra khoảng 100.000 pfu trên một liều (gấp khoảng 17 lần so với liều mong muốn) khi được dùng theo đường SQ. Sau khi chủng ngừa, các con gà được nhốt vào đơn vị tương ứng của chúng cùng với các con tiếp xúc đã nhốt vào trước đó. Các con đã chủng ngừa vào ngày tuổi thứ tám được kẹp cổ bằng các dải đánh số có màu theo danh mục ngẫu nhiên. Các người có hiểu biết trung bình liên quan tới các đánh giá thử nghiệm trong quá trình nghiên cứu không có mặt để kẹp các con gà tiếp xúc hoặc các con gà đã được chủng ngừa cũng như họ không tiến hành các quan sát lâm sàng bất kỳ ở giai đoạn này nhằm mục đích làm mù.

Bảng 4. Nhóm nghiên cứu

GP	VACXIN	Đường chủng ngừa/The thể tích	Số con*	
			Đã chủng ngừa	Tiếp xúc không được chủng ngừa
1	MDV SR-1 RN1250	SQ/ 0,2ml trên một con	30	10
2	Vacxin MDV SR-1	SQ/	30	10

	Rispens	0,2ml trên một con		
3	Đối chứng âm tính, đã chủng ngừa giả	SQ/ 0,2ml trên một con	30	10

Sau khi chủng ngừa hai tuần, các miếng gạc đặt ở khí quản và hậu môn để phát hiện virus từ tất cả các con gà đã chủng ngừa. Các miếng gạc này được gộp vào nhóm, chứa năm miếng gạc đặt khí quản hoặc hậu môn trong một ống gạc chứa 5 ml chất làm ổn định SPGA. Các nang lông chính được thu gom để phát hiện virus từ hai con đã chủng ngừa trong mỗi nhóm, thu thập hai đến ba mẫu lông trên một con. Hai con trong một nhóm để lấy mẫu nang lông được chọn theo danh mục ngẫu nhiên và được giữ cho sống sót sau khi lấy mẫu. Toàn bộ các mẫu được đưa vào phòng phân tích Merial Select để xử lý. Quy trình lấy mẫu tương tự được lặp lại hai lần, mỗi lần cách nhau bảy ngày.

Vào ngày thử nghiệm thứ 21, ngoài việc lấy mẫu từ miếng gạc đặt khí quản và hậu môn và lấy mẫu từ nang lông, năm con tiếp xúc, đã chủng ngừa và không được chủng ngừa trong một nhóm (được chọn theo danh mục ngẫu nhiên) được đem giết và mổ xác, và thu thập riêng các lá lách. Việc phân lập virus chỉ tiến hành ở các phần lá lách đã thu thập từ các con tiếp xúc, không được chủng ngừa (các con đã chủng ngừa được thu thập nhằm mục đích làm mù). Vào ngày cuối cùng của nghiên cứu (Ngày 49), toàn bộ các con còn lại đã đem giết và được mổ xác và nghiên cứu được kết thúc. Các lá lách thu được từ năm con tiếp xúc, đã chủng ngừa và không được chủng ngừa còn lại trong một nhóm được thu gom riêng biệt. Quá trình phân lập virus chỉ được tiến hành trên các phần lá lách đã thu gom từ các con gà con tiếp xúc, không được chủng ngừa (con gà con đã chủng ngừa được thu gom nhằm mục đích làm mù).

Kết quả. Nhóm một gồm MDV SR-1 RN1250 X+5 có độ chuẩn trung bình (arithmetic mean titer - AMT) bằng 94,160 pfu/0,2ml liều. Nhóm hai gồm MDV SR-1 Rispens có độ chuẩn bằng 51,800 pfu/0,2ml liều. Toàn bộ các miếng gạc đặt khí quản và hậu môn là âm tính để phát hiện virus.

Nhóm 1 - MDV SR-1 RN1250: Toàn bộ các mẫu đã thử nghiệm đối với nhóm này là âm tính để phát hiện virus từ nang lông.

Nhóm 2 - MDV SR-1 Rispens: Vào ngày thứ 21, nang lông từ cả các con gà đã lấy mẫu là dương tính đối với tác dụng gây bệnh tế bào Marek (MD CPE). Vào các ngày thứ 14 và 28, nang lông từ tất cả con gà con đã lấy mẫu là âm tính.

Nhóm 3 Đã chủng ngừa giả đối chứng âm tính: Toàn bộ các mẫu nang lông đã thử nghiệm là âm tính để phát hiện virus từ lông.

Không phát hiện thấy virus từ các phần lá lách bất kỳ thu được từ các con tiếp xúc ở các ngày 21 và 49. Các mẫu từ ngày 49 được cho nhiễm ban đầu nhưng được thử nghiệm lại bằng cách sử dụng PCR và toàn bộ là âm tính. Phần máu chứa bạch và tiểu cầu đông lạnh từ các mẫu tương tự này cũng được tạo mảng lại và toàn bộ các mẫu này được khẳng định là âm tính.

Kết luận. Trong các điều kiện của thử nghiệm này, chứng tỏ rằng các con đã chủng ngừa theo đường SQ bằng vacxin thử nghiệm MDV, SR-1, RN1250 có khả năng gieo rắc bệnh tương tự cho các con đã chủng ngừa theo đường SQ bằng các vacxin MDV, SR-1 Rispens có sẵn trên thị trường. Không phát hiện thấy virus hoặc bằng chứng bệnh trên lâm sàng ở các con gà không được chủng ngừa mà đã tiếp xúc với các con đã chủng ngừa bằng vacxin thử nghiệm MDV RN1250.

Ví dụ 5 – Đánh giá hiệu lực của vacxin MDV, S1, RN1250 (X+5) đã dùng cho gà con một ngày tuổi chống lại virus vvMDV, RB1B

Nguyên liệu & Phương pháp. Hai trăm tám mươi (280) con gà SPF một ngày tuổi được chia ngẫu nhiên vào tám nhóm khác nhau và 24 các đơn vị phân lập khác nhau theo danh mục ngẫu nhiên (11-12 con trong một đơn vị; 35 con cho một lần điều trị). Sau khi chia ngẫu nhiên, các con gà ở các Nhóm 6 và 7 - các con đã được chủng ngừa giả, được thử nghiệm và đối chứng âm tính đã chủng ngừa giả/thử nghiệm giả, được chủng ngừa bằng dịch vacxin Marek pha loãng và được nhốt vào các đơn vị đã định theo danh mục ngẫu nhiên. Các con còn lại tiếp đó được chủng ngừa bằng MDV SR-1 RN1250, với đơn vị tạo mảng bằng 287, 578, 736, 1085, hoặc 1392 pfu trên một liều một con, hoặc bằng MDV SR-3 HVT, 1728 pfu trên một liều một con. Các con gà được chủng ngừa theo đường dưới da (SQ) với 0,2ml trên một gà con. Sau khi chủng ngừa, mỗi nhóm đã chủng ngừa được cho vào đơn vị đã định của nó theo danh mục ngẫu nhiên. Vào ngày thử nghiệm thứ 4, các con gà ở Nhóm 7 được thử nghiệm giả bằng dịch vacxin Marek pha loãng và các nhóm 1-6 và 8 được thử nghiệm bằng vvMDV RB1B, theo đường trong màng bụng (IP), 0,2ml trên một con. Các con gà được quan sát hàng ngày trong 45 ngày sau thử nghiệm đối với phản ứng không thích hợp cho thử nghiệm, cụ thể là gây chết hoặc ức chế. Vào ngày thử nghiệm thứ 49, các con gà được cho chết và được mổ xác để thử nghiệm tổn thương toàn phần có liên quan đến bệnh Marek.

Kết quả. Khoảng gây ra tác dụng ngăn ngừa nhằm đánh giá khả năng chống lại thử nghiệm bằng vvMDV RB1B ở các Nhóm 1-5 nằm trong khoảng từ 0,84 đến 0,94. Khoảng gây ra tác dụng ngăn ngừa ở Nhóm 8, nhóm đã chủng ngừa bằng HVT, bằng 0,73. Tỷ lệ mắc phải của MDV trong nhóm 6 đã chủng ngừa giả, đối chứng thử nghiệm bằng 91,2%. Các con gà ở Nhóm 7 - đối chứng âm tính, đã

chủng ngừa giả, thử nghiệm gián không có tổn thương do MDV trong suốt quá trình nghiên cứu.

Kết luận. Vacxin MDV, Kiểu huyết thanh-1, Virut sống, Vacxin thử nghiệm RN1250 (X+5) đã dùng theo đường dưới da (SQ) cho gà SPF một ngày tuổi là có hiệu lực ở 287 đơn vị tạo mảng trên một liều bằng cách sử dụng virut RB1B làm virut thử nghiệm.

Bảng 5. Tóm tắt hiệu lực đáp ứng liều

Nhóm	Nhóm	Tên nhóm	Liều thực tế	# số con đã nhiễm/tổng số con	% bảo vệ	% nhiễm
1	B	Vacxin MDV RN1250 (X+5) 250 pfu	287,2 pfu/0,2ml (AMT)	5/34	85,3%	14,7%
2	H	Vắc-xin MDV RN1250 (X+5) 500 pfu	578,4 pfu/0,2ml (AMT)	4/34	88,2%	11,8%
3	C	Vắc-xin MDV RN1250 (X+5) 750 pfu	736 pfu/0,2ml (AMT)	2/34	94,1%	5,9%
4	A	Vắc-xin MDV RN1250 (X+5) 1000 pfu	1084,8 pfu/0,2ml (AMT)	3/35	91,4%	8,6%
5	D	Vắc-xin MDV RN1250 (X+5) 1500 pfu	1392 pfu/0,2ml (AMT)	4/34	88,2%	11,8%
6	E	Đối chứng đã chủng ngừa giả/thử nghiệm		31/34	N/A (8,8% *)	91,2%
7	G	Đối chứng âm tính đã chủng ngừa giả/thử nghiệm giả		0/35	N/A	0,0%
8	F	Nồng độ giải phóng MDV HVT	1725 pfu/0,2ml (AMT)	8/33	75,8%	24,2%

Từ đó, việc mô tả các phương án ưu tiên chi tiết theo sáng chế, cần hiểu rằng sáng chế được xác định bởi phần mô tả nêu trên là không nhằm giới hạn ở phần mô tả chi tiết nêu trên cũng như nhiều dạng biến đổi hiển nhiên của chúng có thể có mặt mà không nằm ngoài ý tưởng và phạm vi của sáng chế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm với lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị chứa virus gây bệnh Marek (MDV) tái tổ hợp được biến nạp ổn định với cấu trúc ADN ngoại lai, chứa trình tự đoạn lặp ở đầu cuối dài (LTR) của virus gây bệnh lưới nội mô không tăng bạch cầu để sử dụng trong phương pháp tạo ra ở động vật là gia cầm đáp ứng miễn dịch an toàn và bảo vệ chống lại virus gây bệnh Marek bao gồm bước cho động vật này dùng chế phẩm này, nhờ đó gây ra đáp ứng miễn dịch bảo vệ, trong đó MDV là virus vô tính, và không phải là quần thể hỗn hợp gồm virus bố mẹ và virus tái tổ hợp, trong đó MDV là CVI988/X MDV; hơn nữa trong đó LTR là như được thể hiện trong SEQ ID NO:2, trong đó trình tự LTR bao gồm phân đoạn ADN đã loại bỏ Pac I ra khỏi MDV có tất cả các đặc tính nhận dạng của chủng đã nộp lưu ở ATCC với số truy cập PTA-4945 và trong đó trình tự LTR được cài xen vào đầu 5' của gen ICP4 của MDV này.
2. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm này còn chứa chất mang hoặc chất pha loãng được dụng hoặc dùng được trong thú y.
3. Chế phẩm theo điểm 1 hoặc 2, trong đó trong đó gia cầm là gà.
4. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó MDV tái tổ hợp là virus liên kết tế bào.
5. Phương pháp tạo ra tác nhân virus có tác dụng bảo vệ gia cầm chống lại bệnh Marek bao gồm bước biến nạp chủng CVI988 của virus gây bệnh Marek (MDV) với cấu trúc ADN ngoại lai chứa trình tự LTR của virus gây bệnh lưới nội mô không tăng bạch cầu; trong đó LTR được thể hiện trong SEQ ID NO:2, trong đó trình tự LTR bao gồm phân đoạn ADN đã loại bỏ Pac I ra khỏi MDV có tất cả các đặc tính nhận dạng của chủng đã nộp lưu ở ATCC với số truy cập PTA-4945 và trong đó trình tự LTR được cài xen vào đầu 5' của gen ICP4 của MDV này.
6. Virus gây bệnh Marek (MDV) đã biến nạp ổn định với cấu trúc ADN ngoại lai, bao gồm trình tự đoạn lặp ở đầu cuối của virus gây bệnh lưới nội mô không tăng bạch cầu, trong đó MDV là CVI988/X; hơn nữa trong đó MDV là virus vô tính, và không phải là quần thể hỗn hợp gồm virus bố mẹ và virus tái tổ hợp và hơn nữa trong đó LTR là như được thể hiện trong SEQ ID NO:2, trong đó trình tự LTR bao gồm phân đoạn ADN đã loại bỏ Pac I ra khỏi MDV có tất cả các đặc tính nhận

dạng của chúng đã nộp lưu ở ATCC với số truy cập PTA-4945 và trong đó trình tự LTR được cài xen vào đầu 5' của gen ICP4 của MDV này.

7. Chế phẩm miễn dịch bao gồm MDV theo điểm 6.
8. Tế bào phân lập đã được biến nạp ổn định với MDV theo điểm 6.
9. Tế bào phân lập theo điểm 8, trong đó tế bào này là tế bào nguyên bào sợi phôi thai của gà hoặc vịt (CEF, DEF).

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Pritchard, Joyce
Mebatsion, Teshome
Bublôt, Michel

<120> Virut gây bệnh Marek (MDV) đã biến nạp ổn định với cấu trúc ADN ngoại lai, chế phẩm chứa virut gây bệnh Marek (MDV) tái tổ hợp được biến nạp ổn định với cấu trúc ADN ngoại lai và phương pháp tạo ra tác nhân virut có tác dụng bảo vệ gia cầm chống lại bệnh Marek

<130> MER 09-144

<150> US 61,614,142

<151> 2012-03-22

<160> 2

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 585

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Genbak S82226.1 Chủng MDV tái tổ hợp RM1 can thiệp rpt

<400> 1

ttaacctctc tataggcggg ggtgtgggag ggagctccgg gggaatgtgg gagggagctc	60
cggggggaat agcgctggct cgctaactgc catattagct tctgtaatca tgcttgcttg	120
ccttagccgc cattgtactt gatatatctt gctgatata tttctcggaa tcggcatcaa	180
gagcaggctc ataaaccata aaaggaaatg tttgttgaag gcaagcatca gaccacttgc	240
accatccaat cacgaacaaa cacgagatcg aactatcata ctgagccaat ggttgtaaag	300
ggcagatgct atcctccaat gagggaaaat gtcattgaac atcctgtaag cggctatata	360
agccagggtg atctcttgct cggggtcgcc gtcctacaca ttgttgtagc gtgcggccca	420
gattcgaatc tgtaataaaa gctttttctt ctatatcctc agattggcag tgagaggaga	480
ttttgttcgt ggtgttggtt ggcctactgg gtgggtagg gatccggact gaatccgtag	540
tatttcggta caacaggggg gaagtccttc ttatattggc gagtg	585

<210> 2

<211> 533

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

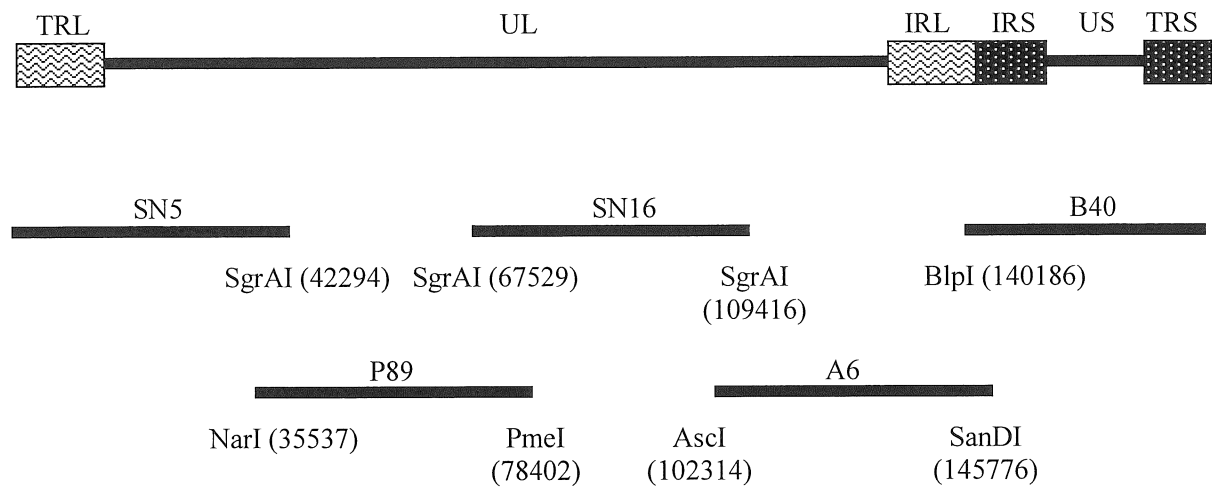
<220>

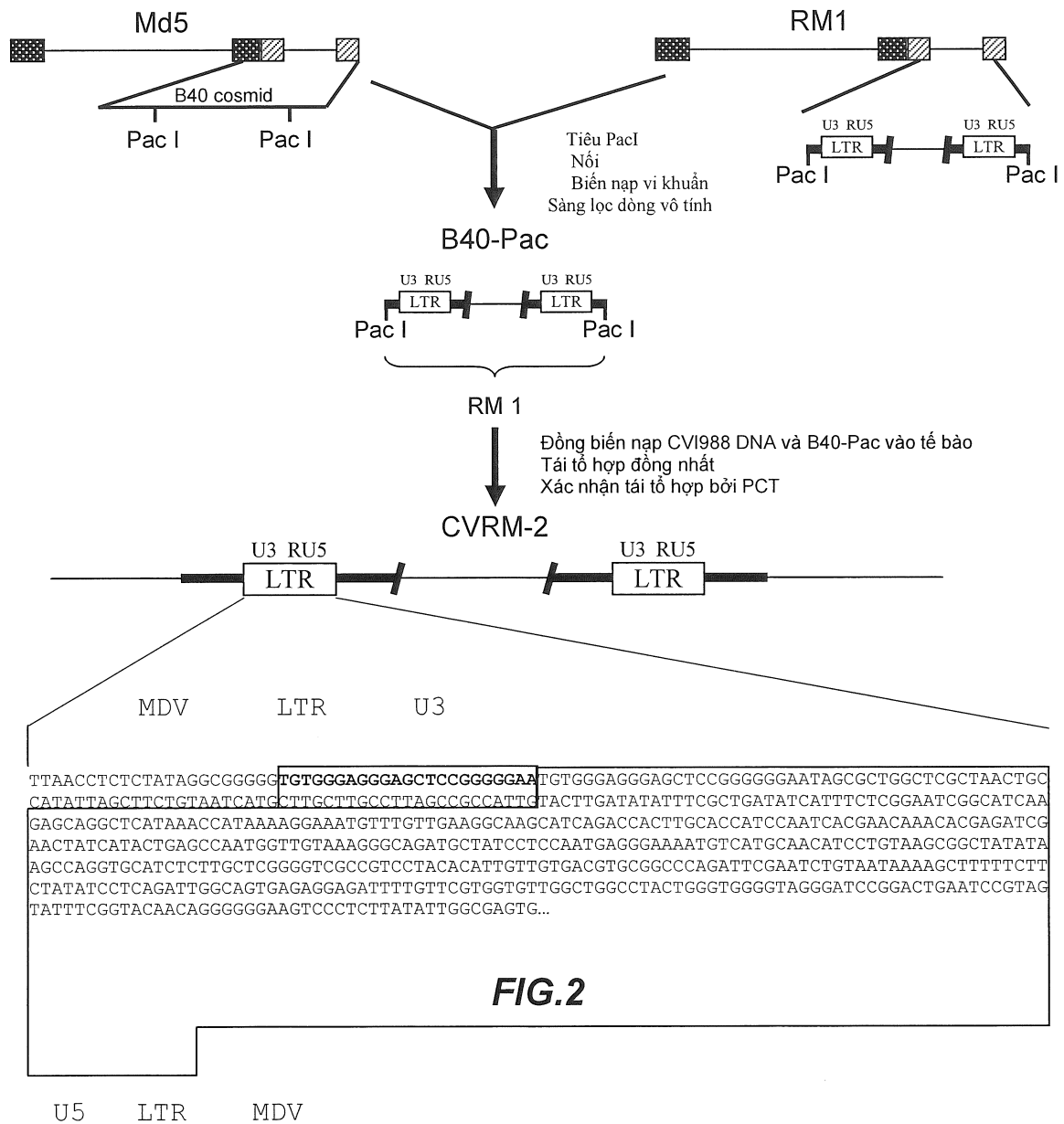
<223> Trình tự lặp lại dài đầu tận cùng từ virut Reticuloendothelial

<400> 2

tgtgggagg agctccggg gaattgtggga ggagctccg gggggaatag cgctggctcg	60
ctaactgcc tattagcttc tgtaatcatg cttgcttgcc ttagccgcc ttgtacttga	120
tatatctgc tgatatcatt tctcggaatc ggcattcaaga gcaggctcat aaaccataaa	180
aggaaatgtt tgttgaaggc aagcatcaga ccacttgac catccaatca cgaacaaaca	240
cgagatcgaa ctatcatact gagccaatgg ttgtaaaggg cagatgctat cctccaatga	300
gggaaaatgt catgcaacat cctgtaagcg gctatataag ccagggtgat ctcttgctcg	360

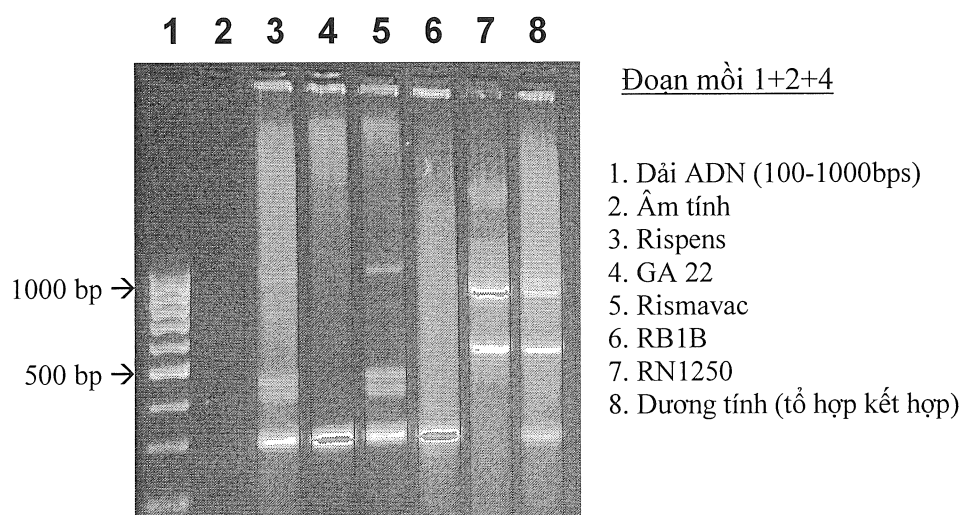
gggtcgccgt cctacacatt gttgtgacgt gcggcccaga ttcgaatctg taataaaagc	420
tttttcttct atatcctcag attggcagtg agaggagatt ttgttcgtgg tgttggctgg	480
cctactgggt ggggtaggga tccggactga atccgtagta ttcggtaca aca	533

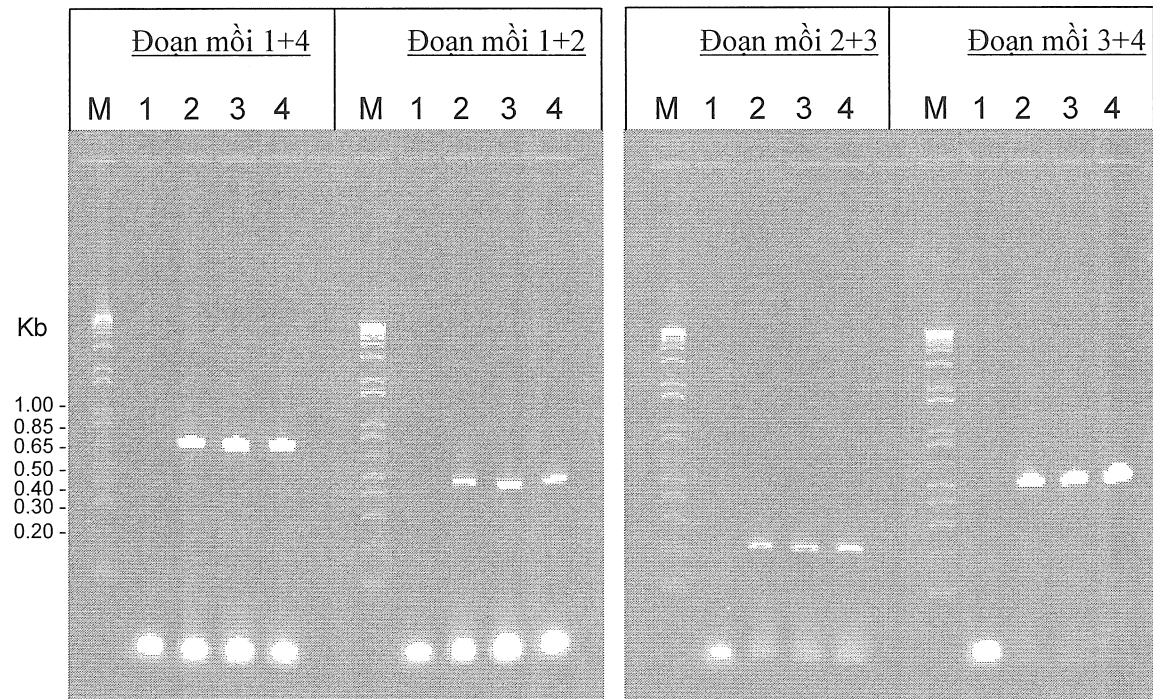
**FIG.1**



Cặp đoạn mồi	Trình tự (5' → 3')	
1	gccctgtcgaagaggaaata	SEQ ID NO:3
2	tctcactgccaatctgagga	SEQ ID NO:4
3	cacttgccaccatccaatcac	SEQ ID NO:5
4	ctatttgcgaggaggaag	SEQ ID NO:6
7	cagccttcgaaatatatctca	SEQ ID NO:7
8	cccttatgaaagctggcctc	SEQ ID NO:8
RN1250Nco	gcgctgtccatggtactgga	SEQ ID NO:9

Cặp đoạn mồi	RN1250 (2 LTR)	Rispens (0 LTR)
1 + 2	531	-
2 + 3	242	-
3 + 4	538	-
1 + 4	827	289
RN1250Nco + 7	3510	2977
RN1250Nco + 8	3762	3229

**FIG.3**

**FIG.4**