



(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)



1-0034209

(51)⁷ A61K 39/12; C12N 7/00

(13) B

(21) 1-2019-01902

(22) 18/09/2017

(86) PCT/EP2017/073473 18/09/2017

(87) WO2018/054837 29/03/2018

(30) 16189776.4 20/09/2016 EP

(45) 26/12/2022 417

(43) 26/08/2019 377A

(73) BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH (DE)

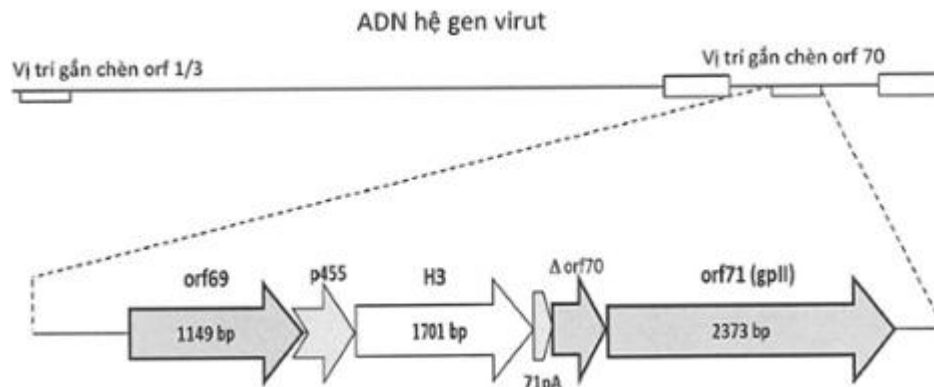
Binger Strasse 173, 55216 INGELHEIM AM RHEIN, Germany

(72) MUNDT, Alice (DE); GALLEI, Andreas (DE); REHMET, Kristina (DE).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) VECTƠ EQUID ALPHAHERPESVIRUS 1 (EHV-1) CHỨA CATXET BIỂU HIỆN CHỨA VỊ TRÍ GẮN CHÈN ORF70, CHẾ PHẨM MIỄN DỊCH, VACXIN VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT CHẾ PHẨM MIỄN DỊCH HOẶC VACXIN NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến lĩnh vực vaccin (vector), và đặc biệt là vị trí gắn chèn EHV mới ORF70. Sáng chế còn đề cập đến các catxet biểu hiện và các vector có liên quan, mà thích hợp để biểu hiện các gen quan tâm, đặc biệt là các trình tự mã hóa kháng nguyên. Các vector virus theo sáng chế là hữu dụng để sản xuất chế phẩm miễn dịch hoặc vaccin.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực vaccin (vector), và đặc biệt là vị trí gắn chèn EHV mới ORF70. Sáng chế còn đề cập đến các catxet biểu hiện và các vector có liên quan, mà thích hợp để biểu hiện các gen quan tâm, đặc biệt là các trình tự mã hóa kháng nguyên. Các vector virus theo sáng chế là hữu dụng để sản xuất chế phẩm miễn dịch hoặc vaccin.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Tác nhân gây bệnh cho ngựa Equid Alphaherpesvirus 1 (virus gây sảy thai ở ngựa, EHV-1) thuộc chi *Varicellovirus* trong phân họ *Alphaherpesvirinae* của họ *Herpesviridae* trong bộ *Herpesvirales*. Nó là virus lớn, có vỏ với hệ gen ADN sợi kép khoảng 150.000 cặp bazơ. Các thành viên quan trọng khác của phân chi *Varicellovirus* là Human Alphaherpesvirus 3 (virus Varicella Zoster), Suid Alphaherpesvirus 1 (virus Pseudorabies), Bovine Alphaherpesvirus 1 (virus gây bệnh viêm phế quản truyền nhiễm - Infectious Bronchitis Virus), và Equid Alphaherpesvirus 4 (Equine Rhinopneumonitis Virus, EHV-4) (<http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp> Virus Taxonomy: 2015 Release EC 47, London, UK, July 2015; Email ratification 2016 (MSL #30) EHV-1 và EHV-4 là đặc hữu và tác động đến ngựa trên toàn thế giới. Trong khi EHV-4 gây nhiễm phần lớn là nhẹ ở đường hô hấp trên, EHV-1 có thể gây nhiễm toàn thân với phổ bệnh từ các triệu chứng hô hấp đến sảy thai và bệnh não tủy gây tử vong tùy thuộc vào chủng và tình trạng miễn dịch của vật chủ. Hai vaccin sống được cải biến (modified live vaccines - MLV) kháng lại EHV-1 hiện có sẵn ở Mỹ và châu Âu, lần lượt là Rhinomune[®];TM (Boehringer Ingelheim) và Prevaccinol[®];TM (MSD). Cả hai vaccin này đều chứa chủng EHV-1 RacH đã được làm suy giảm độc lực theo cách truyền thống, chủng này được chuyển tiếp 256 lần trong các tế bào biểu mô của lợn để làm suy giảm độc lực (Ma et al. 2013). Cơ chế làm suy giảm độc lực đã được nghiên cứu ở mức độ phân tử. Osterrieder et al. (1996) thể hiện rằng RacH thiếu hai

bản sao hệ gen của orf67 và sự khôi phục của một bản sao là đủ để khôi phục độc lực. Ngoài ra, RacH mang đoạn xóa 1283 bp loại bỏ trên 90% của trình tự mã hóa của orf1 mà mã hóa protein virus ức chế miễn dịch. Các đột biến khác cũng có thể tác động đến việc làm suy giảm độc lực, nhưng đã không được nghiên cứu chi tiết cho đến nay. Tất cả các điều này khiến cho RacH là chủng vaccine rất an toàn vì sự nghịch đảo độc lực bằng cách chuyển tiếp trên động vật được chủng ngừa nếu có là rất khó xảy ra.

Hai biến thể của nhiễm sắc thể nhân tạo của vi khuẩn *E. coli* (bacterial artificial chromosome - BAC) chứa toàn bộ hệ gen của chủng vaccine virus Equid Alphaherpes 1 (EHV-1) RacH: pRacH và pRacH-SE đã được biết là nền tảng cho sự phát triển vaccine vector. BAC pRacH-SE được tạo ra trên cơ sở pRacH, BAC được tách dòng đầu tiên trong phòng thí nghiệm của Klaus Osterrieder, FU Berlin. pRacH có sự xóa đoạn orf71 mã hóa glycoprotein II (gpII; Wellington et al., 1996). Ở vị trí của nó, các trình tự BAC-vector và catxet biểu hiện GFP được đưa vào. Để giải phóng EHV-1 RacH không biến đổi ra khỏi pRacH, nó phải được đồng chuyển nhiễm với plasmit chứa toàn bộ các vùng gắn sườn cộng với vùng orf71, do đó trong quá trình sao chép virus các phần trình tự BAC-vector và catxet biểu hiện GFP được thay thế bằng orf71 thông qua sự tái tổ hợp tương đồng sao cho hệ gen RacH gốc sẽ được khôi phục. pRacH được biến đổi theo sáng chế sao cho các trình tự BAC-vector/catxet biểu hiện GFP trở nên có thể tự cắt bỏ (self-excisable - SE) khi chuyển nhiễm trong môi trường tế bào (Tischer et al., 2007). BAC được cải tiến này là pRacH-SE được định rõ. Cả pRacH và pRacH-SE đều có thể có tác dụng làm nền tảng cho sự phát triển vaccine vector, với sự khác biệt duy nhất là pRacH-SE tạo điều kiện thuận lợi cho việc giải phóng đáng kể virus đã sửa chữa orf71.

Đã thấy rằng các vaccine vector trên cơ sở EHV-1 RacH là có thể tạo ra tính miễn dịch ở một số loài động vật có vú bao gồm lợn, gia súc, và chó (Rosas et al. 2007, Rosas et al. 2008, Trapp et al. 2005, Said et al. 2013). Các gen mã hóa các protein kháng nguyên của các tác nhân gây bệnh có thể được biểu hiện bằng EHV-1 RacH tái tổ hợp. Hệ gen RacH-EHV-1 được xử lý dưới dạng BAC của nó trong *E. coli* và được điều chỉnh để biểu hiện các protein bổ sung thường bằng cách gắn chèn các catxet biểu hiện gen chuyển (Tischer et al., 2010). Khi chuyển nhiễm ADN pRacH-

SE trong các tế bào cho phép được nuôi cấy, sự sao chép EHV-1 được bắt đầu bằng bằng các yếu tố phiên mã tế bào. Hoạt tính của polymeraza ADN virus dẫn đến sự xóa bỏ tất cả các trình tự có liên quan đến BAC-vector và khôi phục hệ gen EHV-1 RacH về trạng thái ban đầu của nó. Virus gây bệnh được sinh ra, nó không thể phân biệt với RacH.

Khi pRacH-SE được xử lý trong E.coli, ví dụ, bằng cách gắn chèn các catxet biểu hiện gen chuyển, virus được hoàn nguyên sau quá trình chuyển nhiễm trong các tế bào cho phép sẽ mang sự biến đổi này và sẽ biểu hiện gen bổ sung. EHV-1 RacH tái tổ hợp có thể được sử dụng làm vaccin vector.

Các chủng EHV-1 kiểu dại có ba khung đọc mở (open reading frame - orf) được gọi là orf1, orf2 và orf3 ở một đầu của đoạn đơn nhất dài của hệ gen của chúng (các tọa độ trình tự 1298-3614; fig.1). Orf1 và orf3 được sắp xếp tuần tự trên một sợi của ADN trong khi orf2 được mã hóa bởi sợi bổ sung. Chủng vaccin RacH có đoạn xóa 1283 bp trong vùng đó các orf 1 và 2 ảnh hưởng thể hiện rằng các gen này là không thiết yếu cho sự sao chép của virus. Vì lý do này, vị trí này có tác dụng là vị trí gắn chèn gen chuyển. Vị trí gắn chèn này được gọi là ORF1/3.

Tuy nhiên, kích thước và số lượng của các gen chuyển mà có thể được gắn chèn vào trong vị trí gắn chèn ORF1/3 thường bị giới hạn. Vì thế, để tăng cường khả năng của vector EHV-1, có một nhu cầu chưa được đáp ứng đối với các cách mới và thay thế để gắn chèn và biểu hiện gen chuyển từ vector EHV-1, đặc biệt là vector EHV-1 RacH tái tổ hợp.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Để tăng cường khả năng của vector EHV-1, sáng chế đề xuất các cách thức mới và thay thế để gắn chèn và biểu hiện gen chuyển từ khung vector EHV-1.

Sáng chế đề cập đến vị trí gắn chèn gen chuyển mới, thay thế, ORF70, mà có thể được sử dụng để gắn chèn trình tự gen chuyển và biểu hiện protein gen chuyển từ vector EHV-1, cụ thể là EHV-1 RacH tái tổ hợp.

“Vị trí gắn chèn ORF70” mới trong vector EHV-1 được đặc trưng bởi việc xóa, cắt, thay thế, biến đổi một phần hoặc tương tự liên quan đến ORF70. Việc xóa ORF70

hoàn chỉnh sẽ được coi là bất lợi cho sự sao chép của virus và do đó bất lợi cho việc sản xuất và hiệu quả vacxin vì việc xóa bỏ hoàn toàn ORF70 có thể ảnh hưởng đến trình tự khởi đầu của ORF71 mã hóa cho gpII. Vị trí gắn chèn ORF70 mới và/hoặc việc gắn chèn (của catxet biểu hiện) vào trong ORF70 được định nghĩa về mặt chức năng sao cho ORF71 vẫn giữ được chức năng hoặc nguyên vẹn.

Theo một khía cạnh cụ thể, vị trí gắn chèn ORF70 bao hàm việc xóa một phần khoảng 801bp trong ORF70 đối với RacH (SEQ ID NO.: 20) hoặc trình tự tương đồng 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% của nó. Phần bị xóa trong trình tự hệ gen RacH được thể hiện là SEQ ID NO.: 20 (không có số nucleotit vì trình tự bộ gen RacH hoàn chỉnh không được biết). Theo một khía cạnh cụ thể khác, vị trí gắn chèn ORF70 bao hàm việc xóa 801bp theo lý thuyết trong ORF70 đối với chủng EHV-1 kiểu đại ab4 (mã số truy cập Genbank AY665713.1). Phần bị xóa nằm trong trình tự hệ gen ab4 kiểu đại (mã số truy cập Genbank AY665713.1) từ nucleotit 127681 đến 128482 (SEQ ID NO.: 19).

Trong sáng chế, “vùng gắn sườn” được dùng để chỉ việc tái tổ hợp của catxet biểu hiện chứa trình tự hoặc gen quan tâm, tốt hơn là trình tự mã hóa kháng nguyên, vào trong hệ gen EHV-1. Các vùng gắn sườn này vốn có trong EHV-1. Vùng gắn sườn Up70 (417 bp, SEQ ID NO.: 13) và vùng gắn sườn Up71 (431 bp, SEQ ID NO.: 14) được chọn để tái tổ hợp tương đồng theo cách cổ điển đối với tất cả các vecto/plasmit chuyển được sử dụng cho vị trí orf70. Trong chủng EHV-1 kiểu đại ab4 (mã số truy cập Genbank AY665713.1) các trình tự tương ứng được nằm ở các nucleotit 127264 – 127680 (vùng gắn sườn trên orf70, SEQ ID NO.: 15) và 128483 – 128913 (vùng gắn sườn trên orf71, SEQ ID NO.: 16). Đối với việc tái tổ hợp RED, các vùng gắn sườn bị cắt do việc phân cắt giới hạn XbaI. Các vùng gắn sườn bị cắt này giống với 283 bp 3' của vùng gắn sườn “cổ điển” 417 bp (vùng gắn sườn Up70, SEQ ID NO.: 13) và 144 bp 5' của vùng gắn sườn “cổ điển” 431 bp (vùng gắn sườn Up71, SEQ ID NO.: 14), mà được mô tả ở trên. Các vùng gắn sườn bị cắt này được đặt tên là vùng gắn sườn Up70 (283 bp), bao gồm SEQ ID NO.: 17 và vùng gắn sườn Up71 (144 bp) bao gồm SEQ ID NO.: 18. Các vùng gắn sườn khác nhau này xác định vị trí gắn chèn ORF70 giống nhau. Các vùng gắn sườn luôn được sử dụng theo cặp

một vùng gắn sườn “trái” như các SEQ ID NO.: 13, 15, 17 và một vùng gắn sườn “phải” như các SEQ ID NO.: 14, 16, 18.

Các bản đồ plasmit / vectơ trên fig.3 đối với plasmit chuyển pU-mC70-BGH (SEQ ID NO.: 21), trên fig.4 đối với vectơ chuyển pU70-p455-71K71 (SEQ ID NO.: 22), và trên fig.5 đối với plasmit chuyển pU70-p455-H3-71K71 (SEQ ID NO.: 23) là các ví dụ về các vectơ chứa catxet biểu hiện chứa vị trí gắn chèn ORF70 mới. Các bản đồ plasmit / vectơ trên fig.10 đối với vectơ chuyển pU-1-3-p430-BGHKBGH (SEQ ID NO.: 24), và trên fig.11 đối với plasmit chuyển pU1-3-p430-H1av-BGHKBGH (SEQ ID NO.: 25) là các ví dụ về các vectơ chứa catxet biểu hiện chứa vị trí gắn chèn ORF1/3.

Sáng chế còn đề cập đến vectơ EHV-1 biểu hiện hai gen chuyển khác nhau từ một khung vectơ mà không ghép hai gen chuyển bằng các chức năng có nguồn gốc từ virus ARN (peptit 2a, các vị trí IRES) dưới sự kiểm soát của một trình tự khởi đầu.

Sáng chế còn đề cập đến vectơ Equid alphaherpesvirus 1 (EHV-1), tốt hơn là RacH hoặc RacH-SE, chứa trình tự thứ nhất hoặc gen quan tâm được gắn chèn vào vị trí gắn chèn ORF70 mới và trình tự thứ hai hoặc gen quan tâm được gắn chèn vào vị trí gắn chèn được thiết lập như ORF1/3. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến các vectơ trên cơ sở các virus Herpes khác, cụ thể là các virus Alphaherpes, cụ thể là các Varicellovirus gồm Equid alphaherpesvirus 3 (EHV-3), Equid alphaherpesvirus 4 (EHV-4), Equid alphaherpesvirus 8 (EHV-8), Equid alphaherpesvirus 9 (EHV-9), Bovine alphaherpesvirus 1 (BHV-1), Bovine alphaherpesvirus 5 (BHV-5), Canid alphaherpesvirus 1, và Felid alphaherpesvirus 1.

Sáng chế còn đề cập đến tế bào chủ của động vật có vú chứa các vectơ như vậy và các phương pháp tạo ra các vacxin vectơ sử dụng các tế bào chủ như vậy, cũng như các chế phẩm miễn dịch và các vacxin chứa vectơ Equid alphaherpesvirus 1 (EHV-1) theo sáng chế.

Vì thế, giải pháp cho vấn đề kỹ thuật được mô tả ở trên đạt được bằng phần mô tả và các phương án được mô tả đặc trưng trong các yêu cầu bảo hộ, và theo các khía cạnh khác nhau của nó, sáng chế được thực hiện căn cứ vào phần yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Các tính chất này cho phép tạo ra các vacxin vector tái tổ hợp dựa trên EHV-1 RacH biểu hiện ít nhất một kháng nguyên từ vị trí gắn chèn ORF70 mới được mô tả hoặc ít nhất hai kháng nguyên khác nhau song song với hiệu quả tương đương từ vị trí gắn chèn ORF70 mới được mô tả và vị trí gắn chèn khác như ORF1/3. Nếu đích vacxin chỉ gồm các tác nhân gây bệnh khác nhau thì việc áp dụng vị trí gắn chèn ORF70 mới này song song với vị trí gắn chèn được thiết lập như ORF1/3 có thể làm giảm chi phí hàng hóa một cách đáng kể và thể hiện là có ưu điểm rõ ràng so với vector chỉ biểu hiện một thành phần kháng nguyên.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

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

Fig.1 là sơ đồ minh họa so sánh các vùng orf1/3 của chủng EHV-1 kiểu dại (wt) ab4 và chủng vacxin giảm độc lực EHV-1 RacH.

Fig.2 là hình minh họa vị trí gắn chèn orf70

UL = đoạn đơn nhất dài
 US = đoạn đơn nhất ngắn
 IR = đoạn lặp đảo ngược bên trong
 TR = đoạn lặp đảo ngược đầu tận cùng
 gG = glycoprotein G
 gpII = glycoprotein II
 orf = khung đọc mở (open reading frame)
 bp = cặp bazơ (base pairs)

Fig.3 là bản đồ plasmit và trình tự nucleotit của plasmit chuyển pU-mC70-BGH

Fig.4 là bản đồ plasmit và trình tự nucleotit của vector chuyển pU70-p455-71K71

Fig.5 là bản đồ plasmit và trình tự nucleotit của plasmit chuyển để gắn chèn catxet biểu hiện p455-H3-71 vào trong orf70 của EHV-1 RacH.

H3 = khung đọc mở mã hóa cho hemagglutinin virut cúm A H3

71pA = trình tự polyA mới như được mô tả trong phần mô tả sáng chế, EM
P2016-022

I-SceI = vị trí phân cắt đối với endonucleaza giới hạn I-SceI

trình tự khởi đầu aph = trình tự khởi đầu gen kháng Kanamycin nhân sơ

Kana = gen kháng Kanamycine

ORF70 đầu 3' = vùng tái tổ hợp xuôi chiều với vị trí gắn chèn

ORI = nguồn gốc sao chép của plasmit

APr = gen kháng Ampicillin của plasmit

orf70 ngược chiều = vùng tái tổ hợp ngược chiều của vị trí gắn chèn

p455 = trình tự khởi đầu mới p455

bp = cặp bazơ (base pairs)

Fig.6 là sơ đồ minh họa hệ gen của rEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3 với vùng gắn chèn orf70 được phóng đại.

orf69: khung đọc mở số 69 ngược chiều vị trí gắn chèn trong orf70; p455: đoạn khởi đầu mới được mô tả trong bản mô tả này, xem chẳng hạn như ví dụ 1; H3: hemagglutinin virut cúm gen chuyển; 71pA: trình tự polyadenyl hóa mới; Δorf70: phần còn lại của orf70 chứa đoạn khởi đầu đối với orf71, mà mã hóa glycoprotein II cấu trúc của virut (gpII).

Fig.7 thể hiện kết quả thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang gián tiếp: Thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang gián tiếp của các tế bào VERO được gây nhiễm bằng rEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3.

Các tế bào 24 giờ sau khi nhiễm được cố định bằng etanol và làm khô bằng không khí. Bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng có bán trên thị trường kháng H3 làm kháng thể sơ cấp và IgG của thỏ kháng chuột được liên hợp FITC làm kháng thể thứ cấp, H3 đã thể hiện trong các tế bào bị nhiễm EHV-1 RacH SE-70-p455-H3 tái tổ hợp bằng phép hiển vi huỳnh quang.

Fig.8 thể hiện kết quả thấm tách Western: Thấm tách Western đối với tế bào bị nhiễm với các giai đoạn chuyển tiếp khác nhau của rEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3 hoặc rEHV-1 RacH-SE đối chứng hoặc được gây nhiễm giả. Mẫu thấm tách bên trái được

ủ với kháng thể đơn dòng Ai2G7 được hướng đến gpII của EHV-1. Mẫu thẩm tách bản sao bên phải được ủ với huyết thanh tăng miễn dịch của thỏ có bán trên thị trường kháng hemagglutinin H3 cúm A (PA5-34930).

Fig.9 thể hiện kết quả độ chuẩn virus: Các biểu đồ thể hiện tải lượng virus của các mẫu phổi của các con lợn được chủng ngừa hoặc không được chủng ngừa sau thử thách

Inact= vaccin vô hoạt có bán trên thị trường

EHV= rEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3.

Fig.10 là bản đồ plasmit và trình tự nucleotit của vectơ chuyển pU-1-3-p430-BGHKBGH.

Fig.11 là bản đồ plasmit và trình tự nucleotit của plasmit chuyển để gắn chèn catxet biểu hiện p430-H1av-BGH vào trong orf1/3 của EHV-1 RacH.

H1av = khung đọc mở mã hóa cho hemagglutinin virus cúm A H1

BGHpA = trình tự polyA hormon sinh trưởng bò (bovine growth hormone polyA sequence)

trình tự khởi đầu aph = trình tự khởi đầu gen kháng Kanamycin nhân sơ

Kana = gen kháng Kanamycine

Flank B = vùng tái tổ hợp xuôi chiều với vị trí gắn chèn

Flank A = vùng tái tổ hợp ngược chiều với vị trí gắn chèn

p430 = trình tự khởi đầu mới p430

bp = cặp bazơ (base pairs).

Fig.12 là sơ đồ minh họa hệ gen của rEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1av với vùng gắn chèn orf1/3 được phóng đại.

Δ orf1: Phần còn lại của khung đọc mở 1 ngược chiều với vị trí gắn chèn; p430: trình tự khởi đầu mới được mô tả trong bản mô tả này, chẳng hạn xem ví dụ 1; H1av: hemagglutinin virus cúm gen chuyển; BGHpA: trình tự polyadenyl hóa hormon tăng trưởng bò; orf3: khung đọc mở 3 xuôi chiều với vị trí gắn chèn.

Fig.13 thể hiện kết quả thấm tách Western và miễn dịch huỳnh quang của tế bào bị nhiễm rEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1av thể hiện sự biểu hiện của gen chuyển.

H1av = rEHV-1 RacH-SE1/3-p430-H1av

SE = rEHV-RacH-SE (đối chứng)

Giả = tế bào không bị nhiễm (đối chứng)

Fig.14 là sơ đồ minh họa hệ gen của rEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1av-70-p455-H3 (rEHV-1-RacH-SE B) với hai vùng gắn chèn được phóng đại.

Δ orf1: Phần còn lại của khung đọc mở 1 ngược chiều với vị trí gắn chèn; p430: trình tự khởi đầu mới; H1av: hemagglutinin virus cúm gen chuyển; BGHPA: trình tự polyadenyl hóa hormon tăng trưởng bò; orf3: khung đọc mở 3 xuôi chiều với vị trí gắn chèn.

orf69: khung đọc mở 69 ngược chiều với vị trí gắn chèn trong orf70; p455: trình tự khởi đầu mới; H3: hemagglutinin virus cúm gen chuyển; 71pA: trình tự polyadenyl hóa mới; Δ orf70: phần còn lại của orf70 chứa trình tự khởi đầu cho orf71, mã hóa glycoprotein II cấu trúc của virus (gpII).

Fig.15 thể hiện kết quả thấm tách Western: Thấm tách Western của tế bào bị nhiễm rEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1av-70-p455-H3 (B), vector trống rEHV-1 RacH-SE (SE), hoặc được gây nhiễm giả (ctrl). Các mẫu thấm tách bản sao được ủ với huyết thanh tăng miễn dịch của thỏ có bán trên thị trường kháng H3 (H3), huyết thanh tăng miễn dịch của thỏ có bán trên thị trường (PA 34929) kháng H1 (H1), hoặc kháng thể đơn dòng Ai2G7 kháng EHV-1 gpII (gpII).

Fig.16 thể hiện kết quả thân nhiệt trung bình của các nhóm trước và tại thời điểm 1, 2, và 3 ngày sau khi thử thách. Khoảng sai số, độ lệch chuẩn. Từ trái sang phải trên mỗi ngày thử nghiệm: nhóm đối chứng âm (neg. ctrl.), nhóm đối chứng thử thách (chall. ctrl.), động vật được chủng ngừa một lần bằng RacH-SE-70-p455-H3 (1x EHV-1), được chủng ngừa hai lần bằng RacH-SE-70-p455-H3 (2x EHV-1), hoặc hai lần bằng vacxin IAV lợn vô hoạt (2x chết).

Fig.17 thể hiện điểm số trung bình của phổi của các nhóm một và ba ngày sau khi thử thách. Khoảng sai số, độ lệch chuẩn. Nhóm đối chứng âm (neg. ctrl.), nhóm đối chứng thử thách (chall. ctrl.), động vật được chủng ngừa một lần bằng RacH-SE-70-p455-H3 (1x EHV-1), được chủng ngừa hai lần bằng RacH-SE-70-p455-H3 (2x EHV-1), hoặc hai lần bằng vaccin IAV lợn vô hoạt (2x chết).

Fig.18 thể hiện độ chuẩn trung hòa huyết thanh thuận nghịch (SN) của huyết thanh động vật kháng chủng thử thách IAV H3 lợn R452-14 được thu gom vào ngày thử thách. 20, giới hạn phát hiện. Nhóm đối chứng âm (neg. ctrl.), nhóm đối chứng thử thách (chall. ctrl.), động vật được chủng ngừa một lần bằng RacH-SE-70-p455-H3 (1x EHV-1), được chủng ngừa hai lần bằng RacH-SE-70-p455-H3 (2x EHV-1), hoặc hai lần bằng vaccin IAV lợn vô hoạt (2x chết).

Fig.19 thể hiện các kết quả từ IL-1 β từ BALF được lấy một hoặc hai ngày sau khi sử dụng thử thách IAV lợn. Mỗi chấm là giá trị được xác định cho mỗi con vật. Nhóm đối chứng âm (Neg. Ctr.), nhóm đối chứng thử thách (Chall. Ctr.), các con vật được chủng ngừa một lần bằng RacH-SE-70-p455-H3 (1x EHV-1), được chủng ngừa hai lần bằng RacH-SE-70-p455-H3 (2x EHV-1), hoặc hai lần bằng vaccin IAV lợn vô hoạt (2x chết).

Fig.20 thể hiện các kết quả từ IFN γ -ELISpots của các PBMC được kích thích lại 7 ngày sau khi chủng ngừa lần hai. (A), nhóm đối chứng không được chủng ngừa; (B), được chủng ngừa hai lần bằng vaccin IAV lợn vô hoạt; (C), được chủng ngừa một lần bằng rEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3; (D), được chủng ngừa hai lần bằng rEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3. Đối với các con vật chỉ được chủng ngừa một lần bằng rEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3 việc kích thích lại tương ứng với 7 ngày sau khi chủng ngừa lần thứ nhất. Mỗi chấm là giá trị được xác định cho mỗi con vật ở thời điểm đã định và sau khi kích thích lại bằng các tác nhân kích thích cụ thể. Để kích thích lại, IAV HA lợn được biểu hiện tái tổ hợp tương ứng với kháng nguyên vaccin H3 trong rEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3 (HA_V), IAV HA lợn được biểu hiện tái tổ hợp tương ứng với H3 của chủng thử thách R452-14 (HA_CH), môi trường để phalloangx HA_V và HA_CH (RPMI), vectơ EHV-1 RacH-SE trống (EHV-1 trống), vaccin RacH-SE-70-p455-H3 (EHV-1-H3), chủng thử thách IAV H3N2 lợn R452-14 (H3N2), dịch nổi

tế bào từ các tế bào không bị nhiễm được sử dụng để nuôi cấy R452-14 (MDCK), hoặc được biểu hiện tái tổ hợp nucleoprotein IAV lợn (NP) được sử dụng.

Fig.21 thể hiện bản đồ sơ lược của plasmit chuyển pU1/3-p430-H1hu-BGHKKBGH

Fig.22 thể hiện bản đồ sơ lược của plasmit chuyển pU70-p455-H1pdm-71K71

Fig.23 thể hiện hệ gen ADN sợi kép tuyến tính của rEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1hu-70-p455-H1pdm (rEHV-1 RacH-SE_D) với các vùng gắn chèn orf1/3 và orf70 được phóng đại

Fig.24 thể hiện kết quả của thẩm tách Western của các tế bào bị nhiễm rEHV-1 RacH-SE_B, RacH-SE_D, RacH-SE, hoặc không bị nhiễm (ctrl). Các mẫu thẩm tách bản sao được ủ với huyết thanh tăng miễn dịch đa dòng của thử kháng H3 (PA5-34930), huyết thanh tăng miễn dịch đa dòng của thử kháng H1 (PA5-34929), hoặc kháng thể đơn dòng (Ai2G7) kháng EHV-1 glycoprotein II (gpII). Tất cả các kháng thể đều tạo ra các mẫu như kỳ vọng xác nhận sự biểu hiện của các kháng nguyên mong muốn H3 và H1 và hiệu quả sao chép có thể so sánh của các virus khác nhau như được đánh giá từ kết quả nhuộm rất giống nhau của EHV-1 gpII trên tất cả các mẫu tế bào bị nhiễm.

Fig.25 thể hiện kết quả của các thử nghiệm trung hòa virus cúm A đối với huyết thanh chuột nhắt. * Khoảng sai số thể hiện độ lệch chuẩn.

Fig.26 thể hiện bản đồ plasmit chuyển pU70-455-SBVGc_71K71

Fig.27: A) thể hiện kết quả của RT-PCR định lượng đối với gia súc đối chứng không được chủng ngừa (ô trên) và các con vật được chủng ngừa hai lần bằng rEHV-SBV-Gc (ô dưới) để phát hiện hệ gen virus SBV. Các con vật riêng rẽ được nhận diện bằng các loại đường và ký hiệu khác nhau lần lượt đối với mỗi nhóm động vật không được chủng ngừa và được chủng ngừa. Con vật số 1 được mô tả là đường liền màu đen với các hình tròn đen (tương ứng với cột màu đen trên fig.27B). Con vật số 2 được mô tả là đường nét đứt màu xám với các hình tam giác màu xám (tương ứng với cột màu xám nhạt trên fig.27B). Con vật số 3 được mô tả là đường nét đứt màu đen với các hình vuông trắng (tương ứng với các cột màu trắng trên fig.27B). Con vật số 4 được mô tả là đường nét đứt màu xám với hình thoi màu xám (tương ứng với cột màu xám đậm trên fig.27B). B) Kết quả từ các thử nghiệm trung hòa huyết thanh đối với gia

súc đối chứng không được chủng ngựa (ô trên) và các con vật được chủng ngựa hai lần bằng rEHV-SBV-Gc (ô dưới). Các con vật riêng rẽ được nhận diện bằng các màu sắc cột khác nhau (từ màu đen đến xám nhạt đến xám đậm và đến trắng) lần lượt đối với mỗi nhóm động vật không được chủng ngựa và được chủng ngựa. Con vật số 1 được mô tả là cột màu đen (tương ứng với đường màu đen với các hình tròn màu đen trên fig.27A). Con vật số 2 được mô tả là cột màu xám nhạt (tương ứng với đường nét đứt màu xám với các hình tam giác màu xám trên fig.27A). Con vật số 3 được mô tả là cột màu trắng (tương ứng với đường nét đứt màu đen với các hình vuông màu trắng trên fig.27A). Con vật số 4 được mô tả là cột màu xám đậm (tương ứng với đường nét đứt màu xám với hình thoi màu xám trên fig.27A).

Fig.28 thể hiện kết quả thử nghiệm trung hòa EHV. Tất cả các kết quả thu được từ các mẫu của con vật giống nhau trong nhóm tương ứng được thể hiện dưới sắc thái màu xám như nhau: một con vật được biểu thị bằng cột màu đen, con vật khác được biểu thị bằng cột màu xám nhạt, con vật thứ ba được biểu thị bằng cột màu trắng, và con vật thứ tư được biểu thị bằng cột màu xám đậm.

Fig.29 thể hiện độ chuẩn IAV lợn ở phổi được xác định là mô phổi TCID₅₀/g đối với các động vật bị giết một ngày sau khi thử thách. neg. ctrl., nhóm đối chứng âm; chall. ctrl., nhóm đối chứng thử thách; 2x IM, nhóm được chủng ngựa hai lần trong cơ; IN+IM, nhóm được chủng ngựa lần thứ nhất trong mũi và lần thứ hai trong cơ; 2X IN, nhóm được chủng ngựa hai lần trong mũi. Các điểm dữ liệu cho biết giá trị trung bình thu được từ các con vật riêng lẻ. Đường nằm ngang ở giữa tương ứng cho biết các giá trị trung bình của nhóm. Các đường nằm ngang trên và dưới lần lượt thể hiện các độ lệch chuẩn. Giá trị p đối với các so sánh thống kê theo cặp của các nhóm được nêu dưới đây và được tính bằng kiểm định t bằng cách sử dụng kiểm định Mann-Whitney và GraphPad Prism® cho phần mềm Windows 7.02, GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA 92037, USA, bằng cách cài đặt các phần mềm chuẩn tương ứng.

Fig.30 thể hiện độ chuẩn IAV lợn trong phổi được xác định là TCID₅₀/g mô phổi đối với các con vật bị giết ba ngày sau khi thử thách. neg. ctrl., nhóm đối chứng âm; chall. ctrl., nhóm đối chứng thử thách; 2x IM, nhóm được chủng ngựa hai lần trong cơ; IN+IM, nhóm được chủng ngựa lần thứ nhất trong mũi và lần thứ hai trong cơ; 2X

IN, nhóm được chủng ngừa hai lần trong mũi. Các điểm dữ liệu thể hiện giá trị trung bình thu được từ các con vật riêng lẻ. Đường nằm ngang ở giữa tương ứng thể hiện các giá trị trung bình của nhóm. Các đường nằm ngang trên và dưới lần lượt thể hiện các độ lệch chuẩn. Giá trị p đối với các so sánh thống kê theo cặp của các nhóm được nêu dưới đây và được tính bằng kiểm định t bằng cách sử dụng kiểm định Mann-Whitney và GraphPad Prism® cho phần mềm Windows 7.02, GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA 92037, USA, bằng cách cài đặt các phần mềm chuẩn tương ứng.

Fig.31 thể hiện độ chuẩn IAV lợn ở phổi được xác định là TCID₅₀/g mô phổi đối với các con vật bị giết năm ngày sau khi thử thách; neg. ctrl., nhóm đối chứng âm; chall. ctrl., nhóm đối chứng thử thách; 2x IM, nhóm được chủng ngừa hai lần trong cơ; IN+IM, nhóm được chủng ngừa lần thứ nhất trong mũi và lần thứ hai trong cơ; 2X IN, nhóm được chủng ngừa hai lần trong mũi. Các điểm dữ liệu thể hiện giá trị trung bình thu được từ các con vật riêng lẻ. Đường nằm ngang ở giữa tương ứng thể hiện các giá trị trung bình của nhóm. Các đường nằm ngang trên và dưới lần lượt thể hiện các độ lệch chuẩn. Giá trị p đối với các so sánh thống kê theo cặp của các nhóm được nêu dưới đây và được tính bằng kiểm định t bằng cách sử dụng kiểm định Mann-Whitney và GraphPad Prism® cho phần mềm Windows 7.02, GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA 92037, USA, bằng cách cài đặt các phần mềm chuẩn tương ứng.

Fig.32 thể hiện các kết quả từ các thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (enzyme-linked immunosorbent assay - ELISA) đặc hiệu với globulin miễn dịch G (IgG) của lợn kháng kháng nguyên hemagglutinin H3 của IAV lợn được biểu hiện tái tổ hợp mà tương đồng với H3 được biểu hiện bởi chủng vacxin rEHV-1 RacH-SE_B. Với thử nghiệm này, mỗi lỗ được phủ bằng 100 ng H3 được biểu hiện tái tổ hợp. Các mẫu được đo theo cặp, giá trị trung bình của mẫu được tính từ các số đo theo cặp, và giá trị của nhóm được tính từ giá trị trung bình của mẫu tương ứng. chall. ctrl., nhóm đối chứng thử thách (dùng làm đối chứng âm); 2x IM, nhóm được chủng ngừa hai lần trong cơ; IN+IM, nhóm được chủng ngừa lần thứ nhất trong mũi và lần thứ hai trong cơ; 2X IN, nhóm được chủng ngừa hai lần trong mũi. Khoảng sai số thể hiện độ lệch

chuẩn. Ngày nghiên cứu (Study days - SD) được nêu trong chú giải ở bên phải của đồ thị.

Fig.33 thể hiện các kết quả từ các thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (enzyme-linked immunosorbent assay - ELISA) đặc hiệu với globulin miễn dịch G (IgG) của lợn kháng kháng nguyên hemagglutinin H3 của IAV lợn được biểu hiện tái tổ hợp mà tương đồng với H3 được biểu hiện bởi chủng vaccin rEHV-1 RacH-SE_B. Với thử nghiệm này, mỗi lỗ được phủ bằng 100 ng H3 được biểu hiện tái tổ hợp. Các mẫu được đo theo cặp, giá trị trung bình của mẫu được tính từ các số đo theo cặp, và giá trị của nhóm được tính từ giá trị trung bình của mẫu tương ứng. chall. ctrl., nhóm đối chứng thử thách (dùng làm đối chứng âm); 2x IM, nhóm được chủng ngừa hai lần trong cơ; IN+IM, nhóm được chủng ngừa lần thứ nhất trong mũi và lần thứ hai trong cơ; 2X IN, nhóm được chủng ngừa hai lần trong mũi. Khoảng sai số thể hiện độ lệch chuẩn. Ngày nghiên cứu (Study days - SD) được nêu trong chú giải ở bên phải của đồ thị.

Fig.34 thể hiện các kết quả từ thử nghiệm đếm hấp thụ miễn dịch được liên kết enzym đặc hiệu với interferon gamma (IFN γ ELISpot). Tế bào đơn nhân máu ngoại vi (Peripheral blood mononuclear cell - PBMC) được tinh chế từ máu được lấy từ động vật thử nghiệm vào ngày nghiên cứu 28 (SD28). Sau đó PBMC được kích thích lại bằng chủng thử thách IAV lợn H3N2 R452-14 ở tỷ lệ gây nhiễm là 1 (H3N2 MOI 1) hoặc bằng kháng nguyên H3 IAV lợn được biểu hiện tái tổ hợp mà tương đồng với H3 được biểu hiện bởi chủng vaccin rEHV-1 RacH-SE_B ở nồng độ là 1 μ g/ml (rH3 1 μ g/ml). Bằng cách sử dụng PBMC kích thích lại, thử nghiệm đếm hấp thụ miễn dịch được liên kết enzym đặc hiệu interferon gamma (IFN γ ELISpot) được thực hiện, và các giá trị thu được được chuẩn hóa với 10⁶ tế bào và được tính là giá trị trung bình tương ứng của từng nhóm. chall. ctrl., nhóm đối chứng thử thách (được sử dụng làm đối chứng âm); 2x IM, nhóm được chủng ngừa hai lần trong cơ; IN+IM, nhóm được chủng ngừa lần thứ nhất trong mũi và lần thứ hai trong cơ ; 2X IN, nhóm được chủng ngừa hai lần trong mũi. Khoảng sai số thể hiện độ lệch chuẩn.

Fig.35 thể hiện các kết quả từ thử nghiệm đếm hấp thụ miễn dịch được liên kết enzym đặc hiệu interferon gamma (IFN γ ELISpot). Tế bào đơn nhân máu ngoại vi (Peripheral blood mononuclear cell- PBMC) được tinh chế từ máu được lấy từ động vật thử

nghiệm vào ngày nghiên cứu 28 (SD28). Sau đó PBMC được kích thích lại bằng chủng thử thách IAV lợn H3N2 R452-14 ở tỷ lệ gây nhiễm là 1 (H3N2 MOI 1) hoặc bằng kháng nguyên H3 IAV lợn được biểu hiện tái tổ hợp mà tương đồng với H3 được biểu hiện bởi chủng vaccin rEHV-1 RacH-SE_B ở nồng độ là 1 µg/ml (rH3 1 µg/ml). Bằng cách sử dụng PBMC kích thích lại, thử nghiệm đốm hấp thụ miễn dịch được liên kết enzym đặc hiệu interferon gama (IFN γ ELISpot) được thực hiện, và các giá trị thu được được chuẩn hóa với 10^6 tế bào và được tính là giá trị trung bình tương ứng của từng nhóm. chall. ctrl., nhóm đối chứng thử thách (được sử dụng làm đối chứng âm); 2x IM, nhóm được chủng ngừa hai lần trong cơ; IN+IM, nhóm được chủng ngừa lần thứ nhất trong mũi và lần thứ hai trong cơ ; 2X IN, nhóm được chủng ngừa hai lần trong mũi. Khoảng sai số thể hiện độ lệch chuẩn.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế này giải quyết được các vấn đề vốn có trước đây và tạo ra sự cải tiến rõ rệt trong lĩnh vực.

Nói chung, sáng chế đề cập đến catxet biểu hiện chứa:

(i) ít nhất một trình tự nucleotit ngoại sinh quan tâm, tốt hơn là gen quan tâm, tốt hơn nữa là trình tự mã hóa kháng nguyên, qua đó trình tự nucleotit quan tâm này, tốt hơn là gen quan tâm, tốt hơn nữa là trình tự mã hóa kháng nguyên, được liên kết được liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự khởi đầu, và

(ii) ít nhất một vùng gắn sườn ORF70 trái được chọn từ nhóm bao gồm: SEQ ID NO.: 13 và trình tự tương đồng và/hoặc đồng nhất 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% của nó, SEQ ID NO.: 15 và trình tự tương đồng và/hoặc đồng nhất 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% của nó, và SEQ ID NO.: 17 và trình tự tương đồng và/hoặc đồng nhất 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% của nó, và

(iii) ít nhất một vùng gắn sườn ORF70 phải được chọn từ nhóm bao gồm: SEQ ID NO.: 14 và trình tự tương đồng và/hoặc đồng nhất 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% của nó, SEQ ID NO.: 16 và trình tự tương đồng và/hoặc đồng nhất 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%,

97%, 98%, 99% của nó, và SEQ ID NO.: 18 và trình tự tương đồng và/hoặc đồng nhất 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% của nó.

Sáng chế còn đề xuất Equid herpesvirus (EHV), đặc biệt là Equid Alphaherpesvirus như EHV-1, EHV-3, EHV-4, EHV-8 và EHV-9, đặc biệt hơn là vector Equid Alphaherpesvirus 1 (EHV-1), đặc biệt nhất là chủng RacH, chứa catxet biểu hiện theo sáng chế.

Sáng chế đề xuất vector Equid Alphaherpesvirus 1 (EHV-1), tốt hơn là chủng RacH, chứa catxet biểu hiện theo sáng chế.

Sáng chế còn đề cập đến Equid herpesvirus (EHV), đặc biệt là Equid Alphaherpesvirus như EHV-1, EHV-3, EHV-4, EHV-8 và EHV-9, đặc biệt hơn là vector Equid Alphaherpesvirus 1 (EHV-1), đặc biệt nhất là chủng RacH, chứa:

(i) ít nhất một trình tự nucleotit ngoại sinh quan tâm, tốt hơn là gen quan tâm, tốt hơn nữa là trình tự mã hóa kháng nguyên, qua đó trình tự nucleotit quan tâm này, tốt hơn là gen quan tâm, tốt hơn nữa là trình tự mã hóa kháng nguyên, được liên kết được liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự khởi đầu, và

(ii) ít nhất một vùng gần sườn ORF70 trái được chọn từ nhóm bao gồm: SEQ ID NO.: 13 và trình tự tương đồng và/hoặc đồng nhất 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% của nó, SEQ ID NO.: 15 và trình tự tương đồng và/hoặc đồng nhất 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% của nó, và SEQ ID NO.: 17 và trình tự tương đồng và/hoặc đồng nhất 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% của nó, và

(iii) ít nhất một vùng gần sườn ORF70 phải được chọn từ nhóm bao gồm: SEQ ID NO.: 14 và trình tự tương đồng và/hoặc đồng nhất 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% của nó, SEQ ID NO.: 16 và trình tự tương đồng và/hoặc đồng nhất 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% của nó, và SEQ ID NO.: 18 và trình tự tương đồng và/hoặc đồng nhất 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% của nó.

Sáng chế còn đề cập đến Equid herpesvirus (EHV), đặc biệt là Equid Alphaherpesvirus như EHV-1, EHV-3, EHV-4, EHV-8 và EHV-9, đặc biệt hơn là vector Equid Alphaherpesvirus 1 (EHV-1), đặc biệt nhất là chủng RacH, chứa trình tự nucleotit quan tâm, tốt hơn là gen quan tâm, tốt hơn nữa là trình tự mã hóa kháng nguyên, được gắn chèn vào ORF70.

Sáng chế còn đề cập đến Equid herpesvirus (EHV), đặc biệt là Equid Alphaherpesvirus như EHV-1, EHV-3, EHV-4, EHV-8 và EHV-9, đặc biệt hơn là vector Equid Alphaherpesvirus 1 (EHV-1), đặc biệt nhất là chủng RacH, chứa trình tự nucleotit hoặc gen thứ nhất quan tâm, tốt hơn là trình tự mã hóa kháng nguyên, được gắn chèn vào ORF70 và trình tự nucleotit hoặc gen thứ hai quan tâm, tốt hơn là trình tự mã hóa kháng nguyên khác, được gắn chèn vào vị trí gắn chèn thứ hai, tốt hơn là ORF1/3. Theo khía cạnh cụ thể của vector EHV-1 này theo sáng chế, ít nhất hai gen quan tâm được liên kết theo kiểu hoạt động được với các trình tự điều hòa, tốt hơn là các trình tự khởi đầu.

Theo khía cạnh cụ thể của vector theo sáng chế, việc gắn chèn vào ORF70 được đặc trưng bằng việc xóa, cắt, thay thế, biến đổi một phần hoặc tương tự trong ORF70, nhờ đó ORF71 vẫn giữ được chức năng.

Theo một khía cạnh cụ thể khác của vector theo sáng chế, việc gắn chèn vào trong ORF70 được đặc trưng bằng việc xóa một phần khoảng 801bp trong ORF70 đối với RacH (SEQ ID NO.: 20) hoặc trình tự tương đồng và/hoặc đồng nhất 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% của nó.

Theo một khía cạnh cụ thể khác của vector theo sáng chế việc gắn chèn vào trong ORF70 được đặc trưng bằng việc xóa một phần khoảng 801bp trong ORF70 đối với RacH (SEQ ID NO.: 20) hoặc xóa trình tự tương đồng và/hoặc đồng nhất 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% của nó ở chủng bất kỳ khác.

Theo một khía cạnh cụ thể khác của vector theo sáng chế, việc gắn chèn vào trong ORF70 được đặc trưng bằng việc xóa khoảng 801bp trong ORF70 đối với chủng EHV-1 kiểu đại ab4 (mã số truy cập Genbank AY665713.1), nhờ đó phần bị xóa trong trình tự hệ gen ab4 kiểu đại được nằm giữa nucleotit 127681 và 128482

(SEQ ID NO.: 19) hoặc trình tự tương đồng và/hoặc đồng nhất 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% của nó.

Theo một khía cạnh cụ thể khác của vector theo sáng chế, việc gắn chèn vào trong ORF70 được đặc trưng bằng việc xóa khoảng 801bp trong ORF70 đối với chủng EHV-1 kiểu đại ab4 (mã số truy cập Genbank AY665713.1), nhờ đó phần bị xóa trong trình tự hệ gen ab4 kiểu đại được nằm giữa nucleotit 127681 và 128482 (SEQ ID NO.: 19) hoặc xóa trình tự tương đồng và/hoặc đồng nhất 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% của nó ở chủng bất kỳ khác.

Theo khía cạnh cụ thể nữa của vector theo sáng chế, vector EHV, cụ thể là vector EHV-1 bao gồm ít nhất một vùng gắn sườn được chọn từ nhóm bao gồm: SEQ ID NO.: 13, SEQ ID NO.: 14, SEQ ID NO.: 15, SEQ ID NO.: 16, SEQ ID NO.: 17, và SEQ ID NO.: 18 và trình tự tương đồng và/hoặc đồng nhất 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% của trình tự bất kỳ trong số các trình tự này.

Theo khía cạnh cụ thể khác của vector theo sáng chế, vector EHV, cụ thể là vector EHV-1 bao gồm (i) ít nhất một vùng gắn sườn ORF70 trái được chọn từ nhóm bao gồm: SEQ ID NO.: 13, SEQ ID NO.: 15, và SEQ ID NO.: 17, và (ii) ít nhất một vùng gắn sườn ORF70 phải được chọn từ nhóm bao gồm: SEQ ID NO.: 14, SEQ ID NO.: 16, và SEQ ID NO.: 18.

Theo khía cạnh cụ thể khác của vector hoặc catxet biểu hiện theo sáng chế, trình tự nucleotit quan tâm đã nêu, tốt hơn là gen quan tâm, tốt hơn nữa là trình tự mã hóa kháng nguyên là không có trong tự nhiên và/hoặc là tái tổ hợp.

Theo khía cạnh cụ thể khác của vector hoặc catxet biểu hiện theo sáng chế, trình tự nucleotit quan tâm đã nêu là tái tổ hợp và/hoặc khác loại và/hoặc ngoại sinh.

Theo khía cạnh cụ thể khác của vector hoặc catxet biểu hiện theo sáng chế, trình tự mã hóa kháng nguyên đã nêu đề cập đến tác nhân gây bệnh tác động đến động vật sản xuất thực phẩm như lợn và/hoặc gia súc.

Theo khía cạnh cụ thể của vector hoặc catxet biểu hiện theo sáng chế, trình tự mã hóa kháng nguyên đã nêu đề cập đến tác nhân gây bệnh tác động đến lợn. Theo

khía cạnh cụ thể khác, tác nhân gây bệnh đã nêu là virus cúm lợn A (Swine Influenza A Virus - IAV). Theo khía cạnh cụ thể khác, kháng nguyên đã nêu là kháng nguyên hemagglutinin (HA), đặc biệt là kháng nguyên hemagglutinin đã nêu là có nguồn gốc từ virus cúm A. Ví dụ, virus cúm A là virus cúm A (A/lợn/Italy/116114/2010(H1N2)), virus cúm A (A/lợn/Italy/7680/2001(H3N2)), virus cúm A (A/lợn/Gent/132/2005(H1N1)), và/hoặc virus cúm A (A/lợn/Italy/4675/2003(H1N2)). Theo khía cạnh cụ thể khác, kháng nguyên đã nêu bao gồm hoặc chỉ bao gồm trình tự được mã hóa bằng SEQ ID NO. được chọn từ nhóm bao gồm: SEQ ID NO.: 26, 27, 28, và 29. Theo khía cạnh cụ thể khác, kháng nguyên đã nêu bao gồm hoặc chỉ bao gồm trình tự mã hóa trình tự axit amin với độ tương đồng ít nhất là 70%, ít nhất là 75%, ít nhất là 80%, ít nhất là 85%, ít nhất là 90%, ít nhất là 91%, ít nhất là 92%, ít nhất là 93%, ít nhất là 94%, ít nhất là 95%, ít nhất là 96%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% so với trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.:26, SEQ ID NO.:27, SEQ ID NO.:28 và SEQ ID NO.:29.

Theo khía cạnh cụ thể khác của vector hoặc catxet biểu hiện theo sáng chế, trình tự mã hóa kháng nguyên đã nêu đề cập đến tác nhân gây bệnh tác động đến gia súc. Theo khía cạnh cụ thể khác, tác nhân gây bệnh đã nêu là virus Schmallenberg (SBV). Theo khía cạnh cụ thể khác, kháng nguyên đã nêu là protein Gc của SBV (SBV-Gc). Theo khía cạnh cụ thể hơn, kháng nguyên đã nêu là dạng được cắt của SBV-Gc ví dụ như phần 234 axit amin của vùng mã hóa của SBV-Gc. Theo khía cạnh cụ thể, phần 234 axit amin này của vùng mã hóa của SBV-GC có nguồn gốc từ đầu tận cùng amino của glycoprotein Gc của SBV. Theo khía cạnh cụ thể khác, phần 234 axit amin như vậy của vùng mã hóa của SBV-GC được biến đổi để có được sự vận chuyển hiệu quả đến và gắn chèn vào trong các màng huyết tương của tế bào bị nhiễm (ví dụ bằng cách gắn chèn peptit tín hiệu vào trình tự của SBV-Gc và/hoặc bằng sự gắn chèn của peptit neo xuyên màng vào trình tự của SBV-Gc), và/hoặc phần 234 axit amin này được tối ưu hóa về việc sử dụng codon để biểu hiện trong EHV-1, và/hoặc trình tự liên kết GS (ví dụ, SEQ ID NO.:30) được gắn chèn vào giữa phần Gc và peptit tín hiệu / neo xuyên màng. Theo khía cạnh cụ thể khác, kháng nguyên đã nêu được mã hóa bằng trình tự có độ tương đồng ít nhất là 70%, ít nhất là 75%, ít nhất là 80%, ít nhất là 85%, ít nhất là 90%, ít nhất là 91%, ít nhất là 92%, ít nhất là

93%, ít nhất là 94%, ít nhất là 95%, ít nhất là 96%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98%, ít nhất là 99%, hoặc ít nhất là 100% so với trình tự axit nucleic như nêu trong SEQ ID NO.:31. Theo khía cạnh cụ thể khác kháng nguyên đã nêu bao gồm hoặc chỉ bao gồm trình tự được mã hóa bởi SEQ ID NO.: 31.

Theo khía cạnh cụ thể của vectơ theo sáng chế, gen quan tâm được liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự điều hòa, tốt hơn là trình tự khởi đầu.

Theo khía cạnh cụ thể khác của vectơ hoặc catxet biểu hiện theo sáng chế, vectơ hoặc catxet biểu hiện này còn chứa ít nhất là một trình tự điều hòa bổ sung khác như trình tự tín hiệu kết thúc hoặc trình tự polyadenyl hóa.

Theo khía cạnh cụ thể khác của vectơ hoặc catxet biểu hiện theo sáng chế, vectơ hoặc catxet biểu hiện này còn chứa các trình tự điều hòa bổ sung như trình tự tín hiệu kết thúc và/hoặc trình tự polyadenyl hóa.

Theo khía cạnh cụ thể khác của vectơ hoặc catxet biểu hiện theo sáng chế, vectơ hoặc catxet biểu hiện này còn chứa ít nhất là một trình tự nucleotit quan tâm khác, tốt hơn là gen quan tâm khác, tốt hơn nữa là trình tự mã hóa kháng nguyên. Theo một khía cạnh, ít nhất là một trình tự nucleotit quan tâm khác, tốt hơn là gen quan tâm khác, tốt hơn nữa là trình tự mã hóa kháng nguyên, được gắn chèn vào cùng vị trí gắn chèn ORF70, ví dụ, thông qua (các) peptit IRES /2a. Theo khía cạnh khác, vectơ hoặc catxet biểu hiện chứa ít nhất là một trình tự nucleotit quan tâm khác, tốt hơn là gen quan tâm khác, tốt hơn nữa là trình tự mã hóa kháng nguyên, được gắn chèn vào vị trí gắn chèn khác, tốt hơn là vào ORF1/3.

Theo khía cạnh cụ thể của vectơ hoặc catxet biểu hiện theo sáng chế, ít nhất là hai gen quan tâm được liên kết theo kiểu hoạt động được với các trình tự điều hòa, tốt hơn là các trình tự khởi đầu.

Theo khía cạnh khác của vectơ hoặc catxet biểu hiện theo sáng chế, (các) trình tự khởi đầu được liên kết theo kiểu hoạt động được với một hoặc hai hoặc nhiều trình tự hoặc gen quan tâm được chọn từ nhóm bao gồm: T lớn SV40, gen biểu hiện rất sớm 1 của HCMV và MCMV, vùng khởi đầu alpha yếu tố kéo dài của người, vùng khởi đầu baculovirus polyhedrin, mảnh chức năng của 4pgG600 (SEQ ID NO.:1), tốt

hơn là mảnh chức năng này là p430 (SEQ ID NO.:3), mảnh chức năng của trình tự nucleotit bổ trợ của 4pgG600 (SEQ ID NO. 1), mảnh chức năng của 4pMCP600 (SEQ ID NO. 2), tốt hơn là mảnh chức năng này là p455 (SEQ ID NO. 4), mảnh chức năng của trình tự nucleotit bổ trợ của 4pMCP600 (SEQ ID NO. 2).

Theo khía cạnh cụ thể khác của vector hoặc catxet biểu hiện theo sáng chế, các trình tự khởi đầu được liên kết theo kiểu hoạt động được với ít nhất là hai gen quan tâm là khác nhau.

Theo khía cạnh cụ thể khác của vector hoặc catxet biểu hiện theo sáng chế, trình tự khởi đầu được liên kết theo kiểu hoạt động được với ít nhất là một gen quan tâm là p455 (SEQ ID NO. 4) hoặc mảnh chức năng hoặc dẫn xuất của nó hoặc các trình tự nucleotit bổ trợ của nó và nhờ đó trình tự khởi đầu được liên kết theo kiểu hoạt động được với gen quan tâm khác là p430 (SEQ ID NO. 3) hoặc mảnh chức năng hoặc dẫn xuất của nó hoặc các trình tự nucleotit bổ trợ của nó.

Sáng chế còn đề cập đến plasmit chứa các vùng gắn sườn để tái tổ hợp tương đồng hoặc tái tổ hợp qua trung gian RED (cả hai phương pháp được mô tả trên đây) vào vị trí đích cụ thể trong hệ gen vector virus, tốt hơn là vào vị trí orf1/3 của vector EHV, đặc biệt là EHV-1, đặc biệt hơn là vector RacH, như plasmit chuyển pU-mC70-BGH (SEQ ID NO.: 21) và/hoặc vector chuyển pU70-p455-71K71 (SEQ ID NO.: 22), và/hoặc plasmit chuyển pU70-p455-H3-71K71 (SEQ ID NO.: 23), và/hoặc vector chuyển pU-1-3-p430-BGHKBGH (SEQ ID NO.: 24), và/hoặc plasmit chuyển pU1-3-p430-H1av-BGHKBGH (SEQ ID NO.: 25).

Sáng chế còn đề cập đến plasmit chứa các vùng gắn sườn để tái tổ hợp tương đồng hoặc tái tổ hợp qua trung gian RED (cả hai phương pháp được mô tả trên đây) vào vị trí đích cụ thể trong hệ gen vector virus, tốt hơn là vào vị trí orf70 của vector EHV, đặc biệt là EHV-1, đặc biệt hơn là vector RacH.

Sáng chế còn đề cập đến plasmit chứa các vùng gắn sườn để tái tổ hợp tương đồng hoặc tái tổ hợp qua trung gian RED (cả hai phương pháp được mô tả trên đây) vào vị trí đích cụ thể trong hệ gen vector virus, tốt hơn là vào vị trí orf1/3 của vector EHV, đặc biệt là EHV-1, đặc biệt hơn là vector RacH và axit nucleic điều hòa, tốt hơn là trình tự khởi đầu, tốt hơn là p430, như vector chuyển pU-1-3-p430-BGHKBGH

(SEQ ID NO.: 24), và/hoặc plasmit chuyển pU1-3-p430-H1av-BGHKBGH (SEQ ID NO.: 25).

Sáng chế còn đề cập đến plasmit chứa các vùng gắn sườn để tái tổ hợp tương đồng hoặc tái tổ hợp qua trung gian RED (cả hai phương pháp được mô tả trên đây) vào vị trí đích cụ thể trong hệ gen vector virus, tốt hơn là vào vị trí orf70 của vector EHV, đặc biệt là EHV-1, đặc biệt hơn là vector RacH và axit nucleic điều hòa, tốt hơn là trình tự khởi đầu, tốt hơn là p455, như vector chuyển pU70-p455-71K71 (SEQ ID NO.: 22), và/hoặc plasmit chuyển pU70-p455-H3-71K71 (SEQ ID NO.: 23),

Sáng chế còn đề cập đến plasmit chứa các vùng gắn sườn để tái tổ hợp tương đồng hoặc tái tổ hợp qua trung gian RED (cả hai phương pháp được mô tả trên đây) vào vị trí đích cụ thể trong hệ gen vector virus, tốt hơn là vào vị trí orf1/3 của vector EHV, đặc biệt là EHV-1, đặc biệt hơn là vector RacH và axit nucleic điều hòa, tốt hơn là trình tự khởi đầu, tốt hơn là p430, như vector chuyển pU-1-3-p430-BGHKBGH (SEQ ID NO.: 24), và/hoặc plasmit chuyển pU1-3-p430-H1av-BGHKBGH (SEQ ID NO.: 25).

Sáng chế còn đề cập đến plasmit chứa các vùng gắn sườn để tái tổ hợp tương đồng hoặc tái tổ hợp qua trung gian RED (cả hai phương pháp được mô tả trên đây) vào vị trí đích cụ thể trong hệ gen vector virus, tốt hơn là vào vị trí orf1/3 của vector EHV, đặc biệt là EHV-1, đặc biệt hơn là vector RacH và trình tự axit nucleic điều hòa, tốt hơn là trình tự khởi đầu, tốt hơn là p430, và axit nucleic điều hòa thứ hai, tốt hơn là trình tự polyadenyl hóa, tốt hơn là trình tự polyadenyl hóa BGH, như vector chuyển pU-1-3-p430-BGHKBGH (SEQ ID NO.: 24), và/hoặc plasmit chuyển pU1-3-p430-H1av-BGHKBGH (SEQ ID NO.: 25).

Sáng chế còn đề cập đến plasmit chứa các vùng gắn sườn để tái tổ hợp tương đồng hoặc tái tổ hợp qua trung gian RED (cả hai phương pháp được mô tả trên đây) vào vị trí đích cụ thể trong hệ gen vector virus, tốt hơn là vào vị trí orf70 của vector EHV, đặc biệt là EHV-1, đặc biệt hơn là vector RacH và trình tự axit nucleic điều hòa, tốt hơn là trình tự khởi đầu, tốt hơn là p455, và axit nucleic điều hòa thứ hai, tốt hơn là trình tự polyadenyl hóa, tốt hơn là trình tự polyadenyl hóa 71pA, như vector chuyển

pU70-p455-71K71 (SEQ ID NO.: 22), và/hoặc plasmit chuyển pU70-p455-H3-71K71 (SEQ ID NO.: 23).

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp sản xuất vectơ theo sáng chế bao gồm các bước:

- a. Gắn chèn trình tự nucleotit quan tâm thứ nhất, tốt hơn là gen quan tâm, như trình tự mã hóa kháng nguyên, vào ORF70,
- b. Tùy ý liên kết theo kiểu hoạt động được gen quan tâm thứ nhất này với trình tự axit nucleic điều hòa / trình tự khởi đầu, tốt hơn là p455 hoặc p430,
- c. Tùy ý liên kết theo kiểu hoạt động được gen quan tâm thứ nhất này với trình tự axit nucleic điều hòa (khác), ví dụ, trình tự polyadenyl hóa, tốt hơn là 71pA hoặc BGHpA.

Theo một khía cạnh cụ thể, phương pháp này còn bao gồm các bước

- d. Gắn chèn trình tự nucleotit quan tâm, tốt hơn là gen quan tâm thứ hai vào vị trí gắn chèn thứ hai, tốt hơn là ORF1/3,
- e. Tùy ý liên kết theo kiểu hoạt động được gen quan tâm thứ hai này với trình tự axit nucleic điều hòa / trình tự khởi đầu, tốt hơn là p455 hoặc p430,
- f. Tùy ý liên kết theo kiểu hoạt động được gen quan tâm thứ nhất này với trình tự axit nucleic điều hòa, ví dụ, trình tự polyadenyl hóa, tốt hơn là 71pA hoặc BGHpA.

Sáng chế còn đề cập đến kit chứa vectơ theo sáng chế, (các) tác nhân chuyển nhiễm tùy ý, và tờ hướng dẫn sử dụng.

Sáng chế còn đề cập đến tế bào chủ động vật có vú được đặc trưng ở chỗ nó chứa vectơ theo sáng chế.

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp sản xuất tế bào chủ, đặc trưng bằng các bước dưới đây:

- a. gây nhiễm tế bào chủ động vật có vú theo sáng chế bằng vector theo sáng chế,
- b. nuôi cấy các tế bào đã nhiễm trong điều kiện thích hợp,
- c. tùy ý thu hoạch tế bào chủ nêu trên.

Sáng chế còn đề cập đến việc sử dụng ORF70 trong vector Equid herpesvirus (EHV), đặc biệt là trong Equid Alphaherpesvirus như EHV-1, EHV-3, EHV-4, EHV-8 và EHV-9, đặc biệt hơn là trong vector Equid Alphaherpesvirus 1 (EHV-1), đặc biệt nhất là trong RacH, làm vị trí gắn chèn trong vector Equid herpesvirus (EHV) vừa nêu, trong đó vị trí gắn chèn này hỗ trợ / tạo điều kiện thuận lợi cho sự biểu hiện của trình tự nucleotit quan tâm, tốt hơn là gen quan tâm, như trình tự mã hóa kháng nguyên, nhờ đó vị trí gắn chèn ORF70 chứa sự xóa, cắt, thay thế, biến đổi một phần hoặc tương tự trong ORF70, và nhờ đó ORF71 vẫn giữ được chức năng.

Sáng chế còn đề cập đến việc sử dụng vector theo sáng chế hoặc tế bào chủ động vật có vú theo sáng chế để sản xuất chế phẩm miễn dịch hoặc vaccin.

Sáng chế còn đề cập đến chế phẩm miễn dịch chứa:

- a. vector theo sáng chế, và/hoặc
- b. polypeptit được biểu hiện bằng vector theo sáng chế, như virus, virus sống được biến đổi, hạt giống virus (virus like particle - VLP) hoặc dạng tương tự, và
- c. tùy ý chất mang được dùng hoặc chấp nhận được cho thú y hoặc tá dược, tốt hơn là chất mang này là thích hợp để dùng qua đường miệng, trong da, trong cơ hoặc trong mũi,

tốt hơn là chế phẩm miễn dịch này chứa virus. Theo một khía cạnh cụ thể, virus này là virus lây nhiễm.

Sáng chế còn đề cập đến vacxin hoặc được phẩm chứa

- a. vectơ theo sáng chế, và/hoặc
- b. polypeptit được biểu hiện bằng vectơ theo sáng chế, như virus sống được biến đổi, hạt giống virus (virus like particle - VLP) hoặc dạng tương tự, và
- c. chất mang được dụng hoặc chấp nhận được cho thú y hoặc tá được, tốt hơn là chất mang này là thích hợp để dùng qua đường miệng, trong da, trong cơ hoặc trong mũi,
- d. tùy ý vacxin này còn chứa tá được.

Sáng chế chứng minh việc chủng ngừa thành công bằng cách sử dụng vectơ hoặc catxet biểu hiện theo sáng chế ở các loài khác nhau, đặc biệt là ở lợn và gia súc. Ví dụ, cấu trúc vacxin thử nghiệm dựa vào EHV-1 RacH biểu hiện kháng nguyên Schmallerberg virus (SBV) mà được biến đổi trong vị trí gắn chèn ORF70 mới được mô tả đã thể hiện là có hiệu quả đối với gia súc (xem ví dụ 9). Tất cả các con vật được chủng ngừa đều thể hiện mức sao chép virus giảm sau khi thử thách bằng virus Schmallerberg độc lực như được đánh giá bằng kỹ thuật PCR phiên mã ngược định lượng (qRT-PCR). Hai trong số bốn con vật được chủng ngừa được bảo vệ hoàn toàn, không phát hiện thấy có sự sao chép virus trên toàn bộ các thời kỳ lấy mẫu. Ở hai con vật còn lại trong nhóm đó, sự sao chép hệ gen SBV được phát hiện bởi qRT-PCR nhưng ở mức thấp hơn so với nhóm đối chứng thử thách. (Fig.27A). Hơn nữa, ở các con vật đối chứng không được chủng ngừa, không phát hiện thấy kháng thể đặc hiệu với SBV trong thử nghiệm trung hòa huyết thanh trước khi thử thách gây nhiễm. Từ một hoặc hai tuần sau khi gây nhiễm trở đi, các kháng thể trung hòa có thể phát hiện được trên tất cả các con vật không được chủng ngừa (fig.27B). Ngược lại với nhóm đối chứng không được chủng ngừa, các kháng thể trung hòa đặc hiệu với SBV có thể phát hiện được vào ngày thử thách gây nhiễm ở hai trong số bốn con gia súc được gây miễn dịch bằng rEHV-SBV-Gc. Ở hai con vật còn lại trong nhóm này, không phát hiện được kháng thể trung hòa đặc hiệu với SBV trước khi thử thách gây nhiễm, nhưng từ hai tuần sau khi gây nhiễm, các kháng thể trung hòa lại có mặt (fig.27B).

Kháng thể trung hòa đặc hiệu với SBV ở tất cả bốn con vật là thấp hơn trong nhóm đối chứng thử thách, điều này thể hiện sự sao chép virus giảm mạnh sau thử thách.

Do đó, theo khía cạnh cụ thể, chế phẩm miễn dịch hoặc vaccin hoặc được phẩm nêu trên chứa vector hoặc catxet biểu hiện theo sáng chế, trong đó trình tự mã hóa kháng nguyên đã nêu liên quan đến tác nhân gây bệnh gây nhiễm cho gia súc. Theo khía cạnh cụ thể khác, tác nhân gây bệnh đã nêu là virus Schmallenberg (SBV). Theo khía cạnh cụ thể khác, kháng nguyên đã nêu là protein Gc của SBV (SBV-Gc). Theo khía cạnh cụ thể hơn, kháng nguyên đã nêu là dạng được cắt của SBV-Gc ví dụ như phần 234 axit amin của vùng mã hóa của SBV-Gc. Theo khía cạnh cụ thể, phần 234 axit amin này của vùng mã hóa của SBV-GC có nguồn gốc từ đầu tận cùng amino của glycoprotein Gc của SBV. Theo khía cạnh cụ thể khác, phần 234 axit amin như vậy của vùng mã hóa của SBV-GC được biến đổi để có được sự vận chuyển hiệu quả đến và gắn chèn vào trong các màng huyết tương của tế bào bị nhiễm (ví dụ bằng cách gắn chèn peptit tín hiệu vào trình tự của SBV-Gc và/hoặc bằng sự gắn chèn của peptit neo xuyên màng vào trình tự của SBV-Gc), và /hoặc phần 234 axit amin này được tối ưu hóa về việc sử dụng codon để biểu hiện trong EHV-1, và/hoặc trình tự liên kết GS (ví dụ, SEQ ID NO.:30) được gắn chèn vào giữa phần Gc và peptit tín hiệu / neo xuyên màng. Theo khía cạnh cụ thể khác, kháng nguyên đã nêu được mã hóa bằng trình tự có độ tương đồng ít nhất là 70%, ít nhất là 75%, ít nhất là 80%, ít nhất là 85%, ít nhất là 90%, ít nhất là 91%, ít nhất là 92%, ít nhất là 93%, ít nhất là 94%, ít nhất là 95%, ít nhất là 96%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98%, ít nhất là 99%, hoặc ít nhất là 100% so với trình tự axit nucleic như nêu trong SEQ ID NO.:31. Theo khía cạnh cụ thể khác kháng nguyên đã nêu bao gồm hoặc chỉ bao gồm trình tự được mã hóa bởi SEQ ID NO.: 31.

Hơn nữa, theo khía cạnh cụ thể khác, chế phẩm miễn dịch hoặc vaccin hoặc được phẩm nêu trên chứa vector hoặc catxet biểu hiện theo sáng chế, trong đó trình tự mã hóa kháng nguyên đã nêu liên quan đến tác nhân gây bệnh gây nhiễm cho lợn. Theo khía cạnh cụ thể khác, tác nhân gây bệnh đã nêu là virus cúm lợn A (Swine Influenza A Virus - IAV). Theo khía cạnh cụ thể khác, kháng nguyên đã nêu là kháng nguyên hemagglutinin (HA), đặc biệt là kháng nguyên hemagglutinin đã nêu là có nguồn gốc từ virus cúm A. Ví dụ, virus cúm A là virus cúm A

(A/lợn/Italy/116114/2010(H1N2)), virus cúm A (A/lợn/Italy/7680/2001(H3N2)), virus cúm A (A/lợn/Gent/132/2005(H1N1)), và/hoặc virus cúm A (A/lợn/Italy/4675/2003(H1N2)). Theo khía cạnh cụ thể khác, kháng nguyên đã nêu bao gồm hoặc chỉ bao gồm trình tự được mã hóa bằng SEQ ID NO. được chọn từ nhóm bao gồm: SEQ ID NO.: 26, 27, 28, và 29. Theo khía cạnh cụ thể khác, kháng nguyên đã nêu bao gồm hoặc chỉ bao gồm trình tự mã hóa trình tự axit amin với độ tương đồng ít nhất là 70%, ít nhất là 75%, ít nhất là 80%, ít nhất là 85%, ít nhất là 90%, ít nhất là 91%, ít nhất là 92%, ít nhất là 93%, ít nhất là 94%, ít nhất là 95%, ít nhất là 96%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% so với trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.:26, SEQ ID NO.:27, SEQ ID NO.:28 và SEQ ID NO.:29.

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp sản xuất chế phẩm miễn dịch hoặc vacxin để làm giảm tỷ lệ mắc phải hoặc độ nặng của một hoặc nhiều dấu hiệu lâm sàng liên quan đến hoặc gây ra bởi sự nhiễm, bao gồm các bước sau:

- a. gây nhiễm tế bào chủ động vật có vú theo sáng chế bằng vector theo sáng chế,
- b. nuôi cấy các tế bào đã nhiễm trong điều kiện thích hợp,
- c. thu gom giống nuôi cấy tế bào đã nhiễm,
- d. tùy ý tinh chế giống nuôi cấy tế bào đã nhiễm thu gom được trong bước c),
- e. tùy ý trộn giống nuôi cấy tế bào đã nhiễm thu gom được này với chất mang được dụng.

Ứng dụng y tế:

Sáng chế còn đề cập đến chế phẩm miễn dịch hoặc vacxin theo sáng chế để sử dụng trong phương pháp giảm hoặc phòng ngừa các dấu hiệu lâm sàng hoặc bệnh do sự nhiễm tác nhân gây bệnh gây ra ở động vật hoặc để sử dụng trong phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa sự nhiễm tác nhân gây bệnh ở động vật, tốt hơn là động vật này là động vật sản xuất thực phẩm như lợn hoặc gia súc, đặc biệt là lợn.

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp tạo miễn dịch cho động vật như động vật sản xuất thực phẩm bao gồm lợn để chống lại bệnh lâm sàng do tác nhân gây bệnh gây ra ở động vật này, phương pháp này bao gồm bước cho động vật dùng chế phẩm miễn dịch hoặc vacxin theo sáng chế, trong đó chế phẩm miễn dịch hoặc vacxin này không gây ra các dấu hiệu lâm sàng về sự nhiễm mà có khả năng cảm ứng đáp ứng miễn dịch mà tạo miễn dịch cho động vật chống lại các hình thức gây bệnh của tác nhân gây bệnh đã nêu.

Theo khía cạnh cụ thể của ứng dụng y tế theo sáng chế được mô tả trên đây hoặc phương pháp tạo miễn dịch cho động vật như mô tả trên đây, trình tự mã hóa kháng nguyên có liên quan đến tác nhân gây bệnh gây nhiễm cho lợn. Theo khía cạnh cụ thể khác, tác nhân gây bệnh đã nêu là virus cúm lợn A (Swine Influenza A Virus - IAV). Theo khía cạnh cụ thể khác, kháng nguyên đã nêu là kháng nguyên hemagglutinin (HA), đặc biệt là kháng nguyên hemagglutinin đã nêu là có nguồn gốc từ virus cúm A. Ví dụ, virus cúm A là virus cúm A (A/lợn/Italy/116114/2010(H1N2)), virus cúm A (A/lợn/Italy/7680/2001(H3N2)), virus cúm A (A/lợn/Gent/132/2005(H1N1)), và/hoặc virus cúm A (A/lợn/Italy/4675/2003(H1N2)). Theo khía cạnh cụ thể khác, kháng nguyên đã nêu bao gồm hoặc chỉ bao gồm trình tự được mã hóa bằng SEQ ID NO. được chọn từ nhóm bao gồm: SEQ ID NO.: 26, 27, 28, và 29. Theo khía cạnh cụ thể khác, kháng nguyên đã nêu bao gồm hoặc chỉ bao gồm trình tự mã hóa trình tự axit amin với độ tương đồng ít nhất là 70%, ít nhất là 75%, ít nhất là 80%, ít nhất là 85%, ít nhất là 90%, ít nhất là 91%, ít nhất là 92%, ít nhất là 93%, ít nhất là 94%, ít nhất là 95%, ít nhất là 96%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% so với trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.:26, SEQ ID NO.:27, SEQ ID NO.:28 và SEQ ID NO.:29.

Theo khía cạnh cụ thể khác của ứng dụng y tế theo sáng chế được mô tả trên đây hoặc phương pháp tạo miễn dịch cho động vật như mô tả trên đây, trình tự mã hóa kháng nguyên có liên quan đến tác nhân gây bệnh gây nhiễm cho gia súc. Theo khía cạnh cụ thể khác, tác nhân gây bệnh đã nêu là virus Schmallenberg (SBV). Theo khía cạnh cụ thể khác, kháng nguyên đã nêu là protein Gc của SBV (SBV-Gc). Theo khía cạnh cụ thể hơn, kháng nguyên đã nêu là dạng được cắt của SBV-Gc ví dụ như

phần 234 axit amin của vùng mã hóa của SBV-Gc. Theo khía cạnh cụ thể, phần 234 axit amin này của vùng mã hóa của SBV-GC có nguồn gốc từ đầu tận cùng amino của glycoprotein Gc của SBV. Theo khía cạnh cụ thể khác, phần 234 axit amin như vậy của vùng mã hóa của SBV-GC được biến đổi để có được sự vận chuyển hiệu quả đến và gắn chèn vào trong các màng huyết tương của tế bào bị nhiễm (ví dụ bằng cách gắn chèn peptit tín hiệu vào trình tự của SBV-Gc và/hoặc bằng sự gắn chèn của peptit neo xuyên màng vào trình tự của SBV-Gc), và /hoặc phần 234 axit amin này được tối ưu hóa về việc sử dụng codon để biểu hiện trong EHV-1, và/hoặc trình tự liên kết GS (ví dụ, SEQ ID NO.:30) được gắn chèn vào giữa phần Gc và peptit tín hiệu / neo xuyên màng. Theo khía cạnh cụ thể khác, kháng nguyên đã nêu được mã hóa bằng trình tự có độ tương đồng ít nhất là 70%, ít nhất là 75%, ít nhất là 80%, ít nhất là 85%, ít nhất là 90%, ít nhất là 91%, ít nhất là 92%, ít nhất là 93%, ít nhất là 94%, ít nhất là 95%, ít nhất là 96%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98%, ít nhất là 99%, hoặc ít nhất là 100% so với trình tự axit nucleic như nêu trong SEQ ID NO.:31. Theo khía cạnh cụ thể khác kháng nguyên đã nêu bao gồm hoặc chỉ bao gồm trình tự được mã hóa bởi SEQ ID NO.: 31.

Sáng chế còn đề cập đến kit để chủng ngừa động vật, tốt hơn là động vật sản xuất thực phẩm như lợn hoặc gia súc, để chống lại bệnh có liên quan đến và/hoặc giảm tỷ lệ mắc phải hoặc độ nặng của một hoặc nhiều dấu hiệu lâm sàng có liên quan đến hoặc do tác nhân gây bệnh gây ra ở động vật, chứa:

- a) dụng cụ định lượng có khả năng đưa vacxin vào động vật đã nêu;
và
- b) chế phẩm miễn dịch hoặc vacxin theo sáng chế, và
- c) tùy ý tờ hướng dẫn sử dụng.

Các định nghĩa

Trừ khi được xác định theo cách khác, tất cả mọi thuật ngữ khoa học và kỹ thuật sử dụng trong bản mô tả này có cùng nghĩa như thường được hiểu bởi người có kỹ năng trong lĩnh vực của sáng chế này. Ý nghĩa và phạm vi của các thuật ngữ cần phải rõ ràng; tuy nhiên, trong trường hợp không rõ ràng tiềm ẩn bất kỳ, các định nghĩa

nêu ra ở đây có tính quyết định hơn so với bất kỳ định nghĩa trong từ điển hoặc định nghĩa bên ngoài nào. Thêm nữa, trừ khi được yêu cầu theo cách khác bởi ngữ cảnh, các thuật ngữ số ít sẽ bao gồm cả số nhiều và các thuật ngữ số nhiều sẽ bao gồm cả số ít. Ở đây, sử dụng “hoặc” có nghĩa là “và/hoặc” trừ khi được quy định theo cách khác. Hơn nữa, việc sử dụng thuật ngữ “bao gồm”, cũng như các dạng khác như “bao gồm cả” và “được bao gồm” không bị hạn chế. Tất cả các tài liệu patent và công bố đề cập ở đây được kết hợp bằng cách viện dẫn trong sáng chế này.

Việc thực hiện sáng chế sẽ sử dụng, trừ khi được chỉ rõ theo cách khác, các kỹ thuật thông thường về virus học, sinh học phân tử, vi sinh vật học, công nghệ ADN tái tổ hợp, hóa học protein và miễn dịch học, các kỹ thuật này đều nằm trong kỹ năng trong lĩnh vực này. Các kỹ thuật như vậy được giải thích đầy đủ trong tài liệu. Ví dụ, xem trong Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Vols. I, II and III, Second Edition (1989); *DNA Cloning*, Vols. I and II (D. N. Glover ed. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait ed. 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); *Animal Cell Culture* (R. K. Freshney ed. 1986); *Immobilized Cells and Enzymes* (IRL press, 1986); Perbal, B., *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); các tập, *Methods In Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); *Protein purification methods – a practical approach* (E.L.V. Harris and S. Angal, eds., IRL Press at Oxford University Press); và *Handbook of Experimental Immunology*, Vols. I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell eds., 1986, Blackwell Scientific Publications).

Trước khi mô tả chi tiết sáng chế, cần hiểu rằng sáng chế không bị giới hạn ở các trình tự ADN, polypeptit hoặc các thông số quy trình cụ thể mà có thể thay đổi. Cũng cần hiểu rằng, thuật ngữ được sử dụng trong bản mô tả này chỉ nhằm mục đích mô tả các phương án cụ thể và không dự định để hạn chế. Như được sử dụng trong bản mô tả và yêu cầu bảo hộ của sáng chế này, dạng số ít “một” và dạng xác định bao gồm cả dạng số nhiều trừ khi ngữ cảnh chỉ rõ theo cách khác. Do đó, ví dụ, thuật ngữ tham chiếu “kháng nguyên” bao gồm cả hỗn hợp của hai hoặc nhiều kháng nguyên; thuật ngữ tham chiếu “tá được” bao gồm cả hỗn hợp của hai hoặc nhiều tá được và tương tự.

Các định nghĩa sinh học phân tử

Thuật ngữ “vector” như nó được biết trong lĩnh vực này đề cập đến cấu trúc polynucleotit, thường là plasmid hoặc nhiễm sắc thể nhân tạo của vi khuẩn, được sử dụng để truyền vật liệu di truyền sang tế bào chủ. Vector có thể là, ví dụ, vi khuẩn, virus, thể thực khuẩn, nhiễm sắc thể nhân tạo của vi khuẩn, cosmit, hoặc plasmid. Vector như được sử dụng trong bản mô tả này có thể bao gồm hoặc chứa ADN hoặc ARN. Theo một số phương án, vector bao gồm ADN. Theo một số phương án vector là virus lây nhiễm. Vector virus như vậy chứa hệ gen của virus mà được thao tác theo cách nó mang gen ngoại lai mà không có chức năng trong quá trình sao chép của vector virus cả trong nuôi cấy tế bào cũng như trong động vật chủ. Theo các khía cạnh cụ thể của phần mô tả vector có thể được sử dụng cho các khía cạnh khác nhau như đơn thuần chuyển vật liệu di truyền, để chuyển nhiễm vào tế bào chủ hoặc sinh vật, để sử dụng làm vaccin, ví dụ vaccin ADN hoặc để nhằm mục đích biểu hiện gen. Sự biểu hiện gen là thuật ngữ mô tả quá trình sinh tổng hợp protein trong tế bào khi được dẫn hướng bằng trình tự polynucleotit đặc thù được gọi là gen. Theo một khía cạnh cụ thể vector có thể là “vector biểu hiện”, là vector có khả năng dẫn hướng sự biểu hiện của protein được mã hóa bởi một hoặc nhiều gen được mang bởi vector khi nó có mặt trong môi trường thích hợp.

Vector và phương pháp để tạo ra và/hoặc sử dụng vector (hoặc thể tái tổ hợp) để biểu hiện có thể là bằng hoặc tương tự như các phương pháp được bộc lộ trong: Patent Mỹ số 4,603,112, 4,769,330, 5,174,993, 5,505,941, 5,338,683, 5,494,807, 4,722,848, 5,942,235, 5,364,773, 5,762,938, 5,770,212, 5,942,235, 382,425, các đơn PCT số công bố WO 94/16716, WO 96/39491, WO 95/30018; Paoletti, "Applications of pox virus vectors to vaccination: An update, "PNAS USA 93: 11349-11353, October 1996; Moss, "Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety," PNAS USA 93: 11341-11348, October 1996; Smith et al., patent Mỹ số 4,745,051 (recombinant baculovirus); Richardson, C. D. (Editor), *Methods in Molecular Biology* 39, "Baculovirus Expression Protocols" (1995 Humana Press Inc.); Smith et al., "Production of Human Beta Interferon in Insect Cells Infected with a Baculovirus Expression Vector", *Molecular and Cellular Biology*, December, 1983, Vol. 3, No. 12, p. 2156-2165; Pennock et al., "Strong and

Regulated Expression of Escherichia coli B-Galactosidase in Infect Cells with Baculovirus vector, "Molecular and Cellular Biology March 1984, Vol. 4, No. 3, p. 406; EPA0 370 573; đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 920,197, nộp ngày 16 tháng 10 năm 1986; công bố đơn châu Âu số 265785; patent Mỹ số 4,769,331 (recombinant herpesvirus); Roizman, "The function of herpes simplex virus genes: A primer for genetic engineering of novel vectors," PNAS USA 93:11307-11312, October 1996; Andreansky et al., "The application of genetically engineered herpes simplex viruses to the treatment of experimental brain tumors," PNAS USA 93: 11313-11318, October 1996; Robertson et al., "Epstein-Barr virus vectors for gene delivery to B lymphocytes", PNAS USA 93: 11334-11340, October 1996; Frolov et al., "Alphavirus-based expression vectors: Strategies and applications," PNAS USA 93: 11371-11377, October 1996; Kitson et al., J. Virol. 65, 3068-3075, 1991; patent Mỹ số 5,591,439, 5,552,143; WO 98/00166; loạt đơn Mỹ số 08/675,556, và 08/675,566 cả hai nộp ngày 03 tháng 07 năm 1996 (recombinant adenovirus); Grunhaus et al., 1992, "Adenovirus as cloning vectors," Seminars in Virology (Vol. 3) p. 237-52, 1993; Ballay et al. EMBO Journal, vol. 4, p. 3861-65, Graham, Tibtech 8, 85-87, April, 1990; Prevec et al., J. Gen Virol. 70, 42434; PCT WO 91/11525; Felgner et al. (1994), J. Biol. Chem. 269, 2550-2561, Science, 259: 1745-49, 1993; và McClements et al., "Immunization with DNA vaccines encoding glycoprotein D or glycoprotein B, alone or in combination, induces protective immunity in animal models of herpes simplex virus-2 disease", PNAS USA 93: 11414-11420, October 1996; và patent Mỹ số 5,591,639, 5,589,466, và 5,580,859, cũng như công bố quốc tế số WO 90/11092, WO93/19183, WO94/21797, WO95/11307, WO95/20660; Tang et al., Nature, và Furth et al., Analytical Biochemistry, relating to DNA expression vectors, inter alia. Cũng xem trong tài liệu WO 98/33510; Ju et al., Diabetologia, 41: 736-739, 1998 (hệ biểu hiện viru chậm); Sanford et al., patent Mỹ số 4,945,050; Fischbach et al. (Intracel); WO 90/01543; Robinson et al., Seminars in Immunology vol. 9, pp. 271-283 (1997), (DNA vector systems); Szoka et al., patent Mỹ số 4,394,448 (phương pháp gắn chèn ADN vào các tế bào sống); McCormick et al., patent Mỹ số 5,677,178 (sử dụng các virut gây bệnh tế bào); và patent Mỹ số 5,928,913 (các vector để phân bố gen); cũng như các tài liệu khác viện dẫn ở đây.

Thuật ngữ “vector virus” mô tả virus được biến đổi di truyền mà được thao tác bằng kỹ thuật ADN tái tổ hợp theo cách mà sự xâm nhập của nó vào tế bào chủ dẫn đến các hoạt tính sinh học cụ thể, ví dụ sự biểu hiện của gen chuyển được mang bởi vector. Theo một khía cạnh cụ thể gen chuyển là kháng nguyên. Vector virus có thể có hoặc có thể không có khả năng sao chép trong tế bào, mô hoặc sinh vật đích.

Việc tạo ra vector virus có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các kỹ thuật công nghệ di truyền thích hợp bất kỳ đã biết rõ trong lĩnh vực này, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các kỹ thuật chuẩn về phân giải endonucleaza giới hạn, nối, biến nạp, tinh chế plasmit, giải trình tự ADN, chuyển nhiễm trong nuôi cấy tế bào, ví dụ như được mô tả trong Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y. (1989)) hoặc K. Maramorosch and H. Koprowski (Methods in Virology Volume VIII, Academic Press Inc. London, UK (2014)).

Vector virus có thể kết hợp các trình tự từ hệ gen của sinh vật đã biết bất kỳ. Các trình tự này có thể được kết hợp ở dạng nguyên bản của chúng hoặc có thể được biến đổi theo cách bất kỳ để thu được hoạt tính mong muốn. Ví dụ, các trình tự có thể bao gồm gắn chèn, xóa hoặc thay thế.

Vector virus có thể bao gồm vùng mã hóa cho hai hay nhiều protein quan tâm. Ví dụ, vector virus có thể bao gồm vùng mã hóa cho protein quan tâm thứ nhất và vùng mã hóa cho protein quan tâm thứ hai. Protein quan tâm thứ nhất và protein quan tâm thứ hai có thể giống hoặc khác nhau. Theo một số phương án, vector virus có thể bao gồm (các) vùng mã hóa cho protein quan tâm thứ ba hoặc thứ tư. Protein quan tâm thứ ba và thứ tư có thể giống hoặc khác nhau. Tổng chiều dài của hai hay nhiều protein quan tâm được mã hóa bởi một vector virus có thể khác nhau. Ví dụ, tổng chiều dài của hai hay nhiều protein có thể ít nhất là khoảng 200 axit amin. Ít nhất khoảng 250 axit amin, ít nhất là khoảng 300 axit amin, ít nhất là khoảng 350 axit amin, ít nhất là khoảng 400 axit amin, ít nhất là khoảng 450 axit amin, ít nhất là khoảng 500 axit amin, ít nhất là khoảng 550 axit amin, ít nhất là khoảng 600 axit amin, ít nhất là khoảng 650 axit amin, ít nhất là khoảng 700 axit amin, ít nhất là khoảng 750 axit amin, ít nhất là khoảng 800 axit amin, hoặc dài hơn.

Các vectơ virus được ưu tiên bao gồm vectơ virus herpes như thu được từ EHV-1 hoặc EHV-4 hoặc các varicellovirus như PrV (virus Pseudorabies) hoặc BHV-1 (Bovine Herpesvirus 1).

Theo khía cạnh cụ thể của sáng chế, thuật ngữ “vectơ virus” hoặc theo cách khác là “cấu trúc virus” đề cập đến cấu trúc virus tái tổ hợp thu được từ virus, mà được chọn từ các họ Herpesviridae như EHV-1, EHV-4. Các vectơ virus được ưu tiên bao gồm vectơ virus herpes như thu được từ EHV-1 hoặc EHV-4.

Các thuật ngữ “vectơ virus” và “cấu trúc virus” có thể được sử dụng thay thế nhau.

Thuật ngữ “cấu trúc” như được sử dụng ở đây, đề cập đến axit nucleic tái tổ hợp như plasmid, BAC, hoặc virus tái tổ hợp mà được tạo ra theo cách nhân tạo.

Thuật ngữ “plasmid” đề cập đến ADN tế bào chất mà sao chép một cách độc lập của nhiễm sắc thể vi khuẩn trong tế bào chủ vi khuẩn. Theo một khía cạnh cụ thể của sáng chế, thuật ngữ “plasmid” và/hoặc “plasmid chuyển” đề cập đến một yếu tố của kỹ thuật ADN tái tổ hợp hữu dụng để tạo cấu trúc ví dụ catxet biểu hiện để gắn chèn vào trong vectơ virus. Theo khía cạnh cụ thể khác, thuật ngữ “plasmid” có thể được sử dụng để chỉ plasmid hữu dụng mục đích chèn vào ADN.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “axit nucleic” và “polynucleotit” có thể thay thế cho nhau và dùng để chỉ axit nucleic bất kỳ.

Thuật ngữ “axit nucleic”, “trình tự axit nucleic”, “trình tự nucleotit”, “polynucleotit”, “trình tự polynucleotit”, “trình tự ARN”, hoặc “trình tự ADN” như được sử dụng trong bản mô tả này đề cập đến oligonucleotit, nucleotit hoặc polynucleotit và các mảnh và các phần của nó và ADN hoặc ARN có nguồn gốc từ hệ gen hoặc có nguồn gốc tổng hợp, mà có thể là sợi đơn hoặc sợi kép và là sợi có nghĩa hoặc sợi đối nghĩa. Trình tự có thể là trình tự không mã hóa, trình tự mã hóa hoặc hỗn hợp của hai trình tự này. Trình tự axit nucleic theo sáng chế có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các kỹ thuật chuẩn đã được người có kỹ năng trung bình trong lĩnh vực này biết rõ.

Thuật ngữ "axit nucleic" và "polynucleotit" cụ thể cũng bao gồm các axit nucleic gồm các bazơ khác ngoài năm bazơ xuất hiện trong sinh học (adenin, guanin, thymin, xytosin và uraxil).

Các thuật ngữ “axit nucleic điều hòa”, “yếu tố điều hòa” và “yếu tố kiểm soát sự biểu hiện” được sử dụng thay thế cho nhau và để chỉ các phân tử axit nucleic mà có thể ảnh hưởng đến sự biểu hiện của trình tự mã hóa được liên kết theo kiểu hoạt động được trong sinh vật chủ cụ thể. Các thuật ngữ này được sử dụng một cách rộng rãi và bao hàm tất cả các yếu tố mà thúc đẩy hoặc điều hòa quá trình phiên mã, bao gồm các vùng khởi đầu, trình tự khởi đầu, yếu tố lõi cần cho sự tương tác cơ bản của polymeraza ARN và yếu tố phiên mã, yếu tố ngược dòng, yếu tố tăng cường, và yếu tố đáp ứng. Các yếu tố điều hòa làm ví dụ ở sinh vật nhân sơ bao gồm vùng khởi đầu, trình tự vận hành và vị trí gắn kết ribosom. Các yếu tố điều hòa được sử dụng trong tế bào nhân chuẩn có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, trình tự kiểm soát phiên mã và dịch mã, như vùng khởi đầu, yếu tố tăng cường, tín hiệu ghép nối, tín hiệu polyadenyl hóa, yếu tố kết thúc, tín hiệu phân giải protein, các vị trí nội nhập ribosom bên trong (internal ribosome-entry sites - IRES), trình tự picornaviridal 2A, và tương tự, mà tạo ra và/hoặc điều hòa sự biểu hiện của trình tự mã hóa và/hoặc sản xuất polypeptit được mã hóa trong tế bào chủ.

“Vị trí nội nhập ribosom bên trong” hoặc “IRES” mô tả trình tự mà thúc đẩy về mặt chức năng sự khởi đầu dịch mã độc lập với đầu 5' của gen của IRES và cho phép hai xistron (khung đọc mở) được dịch mã từ một bản phiên mã trong tế bào động vật. IRES tạo ra vị trí nội nhập ribosom độc lập cho việc dịch mã của khung đọc mở ngay xuôi chiều của nó. Không giống như mARN vi khuẩn có thể là đa xistron, tức là mã hóa cho một vài polypeptit khác nhau mà được dịch mã lần lượt từ mARN, hầu hết các mARN của tế bào động vật là đơn xistron và mã hóa để tổng hợp chỉ một polypeptit. Với sản phẩm phiên mã đa xistron trong tế bào nhân chuẩn, việc dịch mã bắt đầu từ điểm khởi đầu dịch mã ở đầu 5', kết thúc ở codon kết thúc thứ nhất, và sản phẩm phiên mã sẽ được giải phóng khỏi ribosom, dẫn đến việc dịch mã của polypeptit được mã hóa thứ nhất trong mARN. Trong tế bào nhân chuẩn, sản phẩm phiên mã đa xistron có IRES được liên kết theo kiểu hoạt động được với khung đọc mở thứ hai hoặc tiếp theo trong sản phẩm phiên mã cho phép việc dịch mã lần lượt của khung

đọc mở xuôi chiều để tạo ra hai hay nhiều polypeptit được mã hóa bởi cùng một sản phẩm phiên mã. IRES có thể có chiều dài khác nhau và từ nhiều nguồn khác nhau, ví dụ virus Encephalomyocarditis (EMCV), picornavirus (ví dụ virus bệnh chân tay miệng, FMDV hoặc virus Polio (PV), hoặc virus viêm gan C (HCV). Các trình tự IRES khác nhau và sử dụng chúng trong việc tạo cấu trúc vector đã được mô tả và đã được biết rõ trong lĩnh vực này. Trình tự mã hóa xuôi chiều được liên kết theo kiểu hoạt động được với đầu 3' của IRES ở khoảng cách bất kỳ mà sẽ không gây ảnh hưởng bất lợi đến sự biểu hiện của gen xuôi chiều. Khoảng cách tối ưu hoặc cho phép giữa IRES và điểm bắt đầu của gen xuôi chiều có thể được xác định dễ dàng bằng cách thay đổi khoảng cách và đo sự biểu hiện dưới dạng một hàm của khoảng cách.

Thuật ngữ “2a” hoặc “peptit 2a” có nghĩa là các trình tự oligopeptit ngắn, được mô tả là 2a và ‘giống 2a’, được dùng làm phần tử liên kết mà có thể điều tiết sự phân cắt dịch mã đồng thời giữa các protein bằng quy trình được xác định là bỏ qua ribosom. Các trình tự 2a và ‘giống 2a’ (từ Picornaviridae hoặc các virus khác hoặc các trình tự tế bào) có thể được sử dụng để nối nhiều trình tự gen thành một gen, đảm bảo sự biểu hiện đồng thời của chúng trong cùng tế bào (xem Luke and Ryan, 2013).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “vùng khởi đầu” hoặc “trình tự khởi đầu” có nghĩa là trình tự nucleotit cho phép sự gắn kết của ARN polymeraza và dẫn hướng sự phiên mã của gen. Thông thường, vùng khởi đầu được nằm trong vùng không mã hóa 5' của gen, gần với vị trí khởi đầu phiên mã của gen. Các trình tự thành phần trong vùng khởi đầu mà có chức năng khởi đầu phiên mã thường được mô tả đặc điểm bằng trình tự nucleotit liên ứng. Các ví dụ về vùng khởi đầu bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, vùng khởi đầu từ vi khuẩn, nấm men, thực vật, virus, và động vật như động vật có vú (bao gồm ngựa, lợn, trâu bò và người), chim hoặc côn trùng. Vùng khởi đầu có thể cảm ứng, kiểm chế và/hoặc cấu tạo. Vùng khởi đầu cảm ứng bắt đầu tăng mức độ phiên mã từ ADN dưới sự kiểm soát của chúng để đáp ứng với một số thay đổi trong điều kiện nuôi cấy, như thay đổi nhiệt độ (Ptashne, 2014). Các ví dụ về vùng khởi đầu đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết rõ là, ví dụ, T lớn SV40, gen biểu hiện rất sớm 1 của HCMV và MCMV, vùng khởi đầu alpha yếu tố kéo dài của người, vùng khởi đầu polyhedrin của baculovirus.

Như được sử dụng trong bản mô tả này trong ngữ cảnh của sáng chế, thuật ngữ vùng khởi đầu đặc biệt để chỉ mảnh chức năng ví dụ phần cắt của 4pgG600 (SEQ ID NO. 1) hoặc trình tự nucleotit bổ trợ của nó, tốt hơn là độ đồng nhất trình tự là (ít nhất là) 72% trên toàn bộ chiều dài (hoặc cao hơn). Hơn nữa, như được sử dụng trong bản mô tả này trong ngữ cảnh của sáng chế, thuật ngữ vùng khởi đầu đặc biệt để chỉ mảnh chức năng, ví dụ phần cắt của 4pMCP600 (SEQ ID NO. 2) hoặc trình tự nucleotit bổ trợ của nó, tốt hơn là độ đồng nhất trình tự là (ít nhất là) 78% trên toàn bộ chiều dài (hoặc cao hơn). Tốt nhất là thuật ngữ “vùng khởi đầu” để chỉ p430 (SEQ ID NO.:3) hoặc p455 (SEQ ID NO.: 4). Như được sử dụng trong bản mô tả này trong ngữ cảnh của sáng chế, thuật ngữ vùng khởi đầu đặc biệt để chỉ dẫn xuất chức năng của p430 (SEQ ID NO.:3) hoặc p455 (SEQ ID NO.: 4) hoặc 4pgG600 (SEQ ID NO. 1) hoặc 4pMCP600 (SEQ ID NO. 2) có, ví dụ, sự thay thế, sự đột biến hoặc sự đảo đoạn nhỏ sao cho độ đồng nhất trình tự là ở mức tương đồng hoặc đồng nhất 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%.

Các thuật ngữ “p430”, “gG 430” và “430” được sử dụng đồng nghĩa và thay thế cho nhau trong toàn bản mô tả, hình vẽ, danh mục trình tự, v.v. Các thuật ngữ “p455”, “MCP 455” và “455” được sử dụng đồng nghĩa và thay thế cho nhau trong toàn bản mô tả, hình vẽ, danh mục trình tự, v.v.

Thuật ngữ “yếu tố tăng cường” để chỉ trình tự polynucleotit mà ở vị trí *cis* tác động lên hoạt tính của vùng khởi đầu và vì thế kích thích sự phiên mã của gen hoặc trình tự mã hóa được liên kết về mặt chức năng với trình tự khởi đầu. Không giống như vùng khởi đầu tác động của yếu tố tăng cường độc lập với vị trí và hướng vì thế chúng có thể nằm trước hoặc nằm sau đơn vị phiên mã, trong intron hoặc thậm chí trong vùng mã hóa. Yếu tố tăng cường có thể được đặt cả trong vùng ngay gần đơn vị phiên mã và ở một khoảng cách đáng kể so với vùng khởi đầu. Nó cũng có thể có các đoạn trùng lặp về mặt vật lý và chức năng với vùng khởi đầu. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ biết được một số yếu tố tăng cường từ các nguồn khác nhau (và được nộp lưu trong kho dữ liệu như GenBank, ví dụ yếu tố tăng cường SV40, yếu tố tăng cường CMV, yếu tố tăng cường polyoma, yếu tố tăng cường adenovirut) có sẵn dưới dạng các yếu tố độc lập hoặc các yếu tố được tách dòng trong các trình tự polynucleotit (ví dụ được nộp lưu ở ATCC hoặc từ các nguồn thương mại

hoặc riêng rẽ). Nhiều trình tự khởi đầu cũng chứa trình tự tăng cường như vùng khởi đầu CMV thường được sử dụng. Yếu tố tăng cường CMV của người là một trong các yếu tố tăng cường mạnh nhất được xác định cho đến nay. Một ví dụ về yếu tố tăng cường cảm ứng là yếu tố tăng cường metallothionein, mà có thể được kích thích bằng glucocorticoid hoặc kim loại nặng.

Thuật ngữ “trình tự nucleotit bổ trợ” mô tả một sợi của hai sợi polynucleotit theo cặp như ADN hoặc ARN. Trình tự nucleotit của sợi bổ trợ phản chiếu trình tự nucleotit của sợi cặp đôi của nó sao cho mỗi adenosin tương ứng là thymin (hoặc uraxil đối với ARN), cho mỗi guanin tương ứng xytosin, và ngược lại. Trình tự nucleotit bổ trợ ví dụ của 5'-GCATAC-3' là 3'-CGTATG-5' hoặc đối với ARN là 3'-CGUAUG-5'.

Các thuật ngữ “gen”, “gen quan tâm”, như được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa giống nhau và để chỉ trình tự polynucleotit có chiều dài bất kỳ mã hóa sản phẩm quan tâm. Gen có thể còn chứa trình tự điều hòa trước (trình tự 5' không mã hóa hoặc không dịch mã) và sau (trình tự 3' không mã hóa hoặc không dịch mã) trình tự mã hóa. Trình tự được chọn có thể có chiều dài đầy đủ hoặc bị cắt, gen dung hợp hoặc được gắn thẻ, và có thể là ADN bổ trợ, ADN hệ gen, hoặc mảnh ADN. Thường hiểu rằng ADN hệ gen mã hóa cho polypeptit hoặc ARN có thể bao gồm vùng không mã hóa (tức là intron) mà được cắt từ ARN thông tin thành thực (mARN) và vì thế không có mặt trong ADN bổ trợ mã hóa cho cùng polypeptit hoặc ARN. Nó có thể là trình tự tự nhiên, tức là (các) dạng xuất hiện trong tự nhiên, hoặc có thể bị đột biến, hoặc chứa các trình tự thu được từ các nguồn khác nhau hoặc được biến đổi nếu muốn. Các biến đổi bao gồm tối ưu hóa codon để tối ưu hóa việc sử dụng codon trong tế bào chủ được chọn hoặc trong việc gắn thẻ. Ngoài ra chúng có thể bao gồm việc bớt hoặc thêm các vị trí tác động *cis* như vị trí cung cấp cắt nối (ảnh), vị trí tiếp nhận và các điểm nhánh, tín hiệu polyadenyl hóa, hộp TATA, vị trí chi, vị trí nội nhập ribosom, trình tự lặp, cấu trúc bậc hai (ví dụ các vòng thân), vị trí gắn kết cho yếu tố phiên mã hoặc các yếu tố điều hòa khác, vị trí enzym giới hạn được nêu chỉ là một vài ví dụ không phải giới hạn. Trình tự được chọn có thể mã hóa polypeptit được tiết, của tế bào chất, nhân, gắn kết màng hoặc bề mặt tế bào.

Thuật ngữ “trình tự nucleotit quan tâm” như được sử dụng trong bản mô tả này là thuật ngữ chung chung hơn gen quan tâm do nó không nhất thiết bao gồm gen mà có thể bao gồm các yếu tố hoặc phần của gen hoặc thông tin di truyền khác, ví dụ *ori* (vùng khởi đầu sao chép). Trình tự nucleotit quan tâm có thể là trình tự ADN hoặc ARN bất kỳ độc lập với việc liệu nó có bao gồm trình tự mã hóa hay không.

“Khung đọc mở” hoặc “ORF” đề cập đến chiều dài của trình tự axit nucleic, ADN hoặc ARN bao gồm tín hiệu khởi đầu dịch mã hoặc codon khởi đầu, như ATG hoặc AUG, và codon kết thúc và có thể dịch mã thành trình tự polypeptit.

Thuật ngữ “phiên mã” mô tả quá trình sinh tổng hợp mRNA trong tế bào.

Thuật ngữ “sự biểu hiện” như được sử dụng trong bản mô tả này đề cập đến sự phiên mã và/hoặc dịch mã của trình tự axit nucleic trong tế bào chủ. Theo khía cạnh cụ thể của sáng chế thuật ngữ “sự biểu hiện” đề cập đến sự phiên mã và/hoặc dịch mã của trình tự axit nucleic khác loại và/hoặc ngoại sinh trong tế bào chủ. Mức biểu hiện của sản phẩm mong muốn trong tế bào chủ có thể được xác định trên cơ sở lượng ARN hoặc mRNA tương ứng có mặt trong tế bào, hoặc lượng polypeptit mong muốn được mã hóa bởi trình tự được chọn. Ví dụ, mRNA có thể được phiên mã từ trình tự được chọn có thể được định lượng bằng kỹ thuật lai thấm Northern, bảo vệ ARN ribonucleaza, lai hóa in situ với ARN tế bào hoặc bằng RTqPCR (phiên mã ngược tiếp đó là PCR định lượng). Protein được biểu hiện từ trình tự được chọn có thể được định lượng bằng các phương pháp khác nhau, ví dụ bằng ELISA, tách Western, bằng thử nghiệm miễn dịch phóng xạ, kết tủa miễn dịch, bằng thử nghiệm hoạt tính sinh học của protein, hoặc nhuộm miễn dịch protein sau đó phân tích FACS.

Thuật ngữ “catxet biểu hiện” hoặc “đơn vị phiên mã” hoặc “đơn vị biểu hiện” đề chỉ vùng trong vectơ, cấu trúc hoặc trình tự polynucleotit chứa một hoặc nhiều gen được phiên mã, trong đó các trình tự nucleotit mã hóa (các) gen được phiên mã cũng như các trình tự polynucleotit bao gồm các yếu tố điều hòa được chứa trong catxet biểu hiện được liên kết theo kiểu hoạt động được với nhau. Chúng được phiên mã từ vùng khởi đầu và quá trình phiên mã được kết thúc bằng ít nhất một tín hiệu polyadenyl hóa. Theo một khía cạnh cụ thể, chúng được phiên mã từ một trình tự

khởi đầu đơn lẻ. Kết quả là các gen khác nhau ít nhất là được liên kết về mặt phiên mã. Nhiều hơn một protein hoặc sản phẩm có thể được phiên mã và được biểu hiện từ mỗi đơn vị phiên mã (đơn vị phiên mã nhiều xistron). Mỗi đơn vị phiên mã sẽ bao gồm yếu tố điều hòa cần cho quá trình phiên mã và dịch mã của trình tự được chọn bất kỳ mà được chứa trong đơn vị này. Và mỗi đơn vị phiên mã có thể chứa các yếu tố điều hòa giống hoặc khác nhau. Ví dụ, mỗi đơn vị phiên mã có thể chứa cùng yếu tố kết thúc, yếu tố IRES hoặc intron có thể được sử dụng cho việc liên kết về mặt chức năng của các gen trong đơn vị phiên mã. Vectơ hoặc trình tự polynucleotit có thể chứa nhiều hơn một đơn vị phiên mã.

Thuật ngữ “biểu hiện tăng”, “độ chuẩn hoặc năng suất tăng” hoặc “biểu hiện hoặc năng suất được cải thiện” có nghĩa là việc tăng sự biểu hiện, tổng hợp hoặc tiết trình tự khác loại và/hoặc ngoại sinh được đưa vào trong tế bào chủ, ví dụ gen mã hóa protein trị liệu, so sánh với đối chứng thích hợp, ví dụ protein được mã hóa bởi ADN bổ trợ so với protein được mã hóa bởi gen chứa intron. Độ chuẩn hoặc năng suất tăng nếu tế bào theo sáng chế được nuôi cấy theo phương pháp theo sáng chế được mô tả ở đây, và nếu tế bào có năng suất hoặc độ chuẩn cụ thể tăng ít nhất là 1,2 lần, 1,5 lần, hai lần, ba lần, bốn lần hoặc năm lần. Độ chuẩn hoặc năng suất tăng nếu tế bào theo sáng chế được nuôi cấy theo phương pháp theo sáng chế được mô tả ở đây, và nếu tế bào có năng suất hoặc độ chuẩn cụ thể tăng ít nhất là 1,2 lần, hoặc ít nhất là 1,5 lần, hoặc ít nhất là hai lần, hoặc ít nhất là ba lần. Cụ thể, độ chuẩn hoặc năng suất tăng nếu tế bào theo sáng chế được nuôi cấy theo phương pháp theo sáng chế được mô tả ở đây, và nếu tế bào có năng suất hoặc độ chuẩn cụ thể tăng ít nhất là 1,2 lần đến năm lần, tốt hơn là 1,5 lần đến năm lần, tốt hơn nữa là hai lần đến năm lần đặc biệt tốt hơn là ba lần đến năm lần. “Biểu hiện tăng” còn có thể có nghĩa là nhiều tế bào trên thực tế biểu hiện gen/trình tự quan tâm. Ví dụ biểu hiện tăng có thể có nghĩa là vùng khởi đầu mới theo sáng chế có hoạt tính trong thời gian dài hơn trong chu kỳ sao chép của virus so với các trình tự khởi đầu khác.

Sự tăng biểu hiện, độ chuẩn hoặc năng suất có thể đạt được bằng cách sử dụng vectơ khác loại theo sáng chế. Việc này có thể được kết hợp với các phương pháp khác như chọn lọc được hỗ trợ bằng FACS các tế bào chủ tái tổ hợp mà chứa, dưới dạng dấu chuẩn chọn lọc bổ sung, một hoặc nhiều protein huỳnh quang (ví dụ GFP)

hoặc dầu chuẩn bề mặt tế bào. Các phương pháp khác để đạt được sự biểu hiện tăng, và tổ hợp của các phương pháp khác nhau cũng có thể được sử dụng, được dựa trên ví dụ việc sử dụng yếu tố hoạt tính cis để xử lý cấu trúc chất nhiễm sắc (ví dụ LCR, UCOE, EASE, chất phân lập, S/MARs, các yếu tố STAR), việc sử dụng yếu tố phiên mã (nhân tạo), xử lý tế bào bằng các chất tự nhiên hoặc tổng hợp để điều hòa tăng sự biểu hiện gen nội sinh hoặc khác loại và/hoặc ngoại sinh, cải thiện độ ổn định (thời gian bán hủy) của mRNA hoặc protein, cải thiện sự khởi đầu dịch mã mRNA, tăng liều lượng gen bằng việc sử dụng plasmid episom (dựa trên việc sử dụng trình tự virus làm nguồn sao chép, ví dụ SV40, polyoma, adenovirus, EBV hoặc BPV), việc sử dụng trình tự thúc đẩy khuếch đại hoặc hệ thống khuếch đại in vitro trên cơ sở các chuỗi khảm ADN.

Thử nghiệm để xác định “biểu hiện tăng” là các phép đo protein trên cơ sở LC-MS/MS như theo dõi đa phản ứng (multiple reaction monitoring - MRM); phương pháp phát hiện trên cơ sở kháng thể như thấm tách Western, thấm điểm, hoặc khuếch tán miễn dịch, và đếm tế bào theo dòng; và xác định hoạt tính sinh học bằng thử nghiệm ngưng kết hồng cầu.

“Hoạt tính vùng khởi đầu” được xác định gián tiếp bằng cách định lượng mRNA được phiên mã dưới sự kiểm soát của vùng khởi đầu tương ứng. mRNA được định lượng bằng RTqPCR theo tiêu chuẩn nội sinh.

Thật ngữ “độ chuẩn virus” là số đo đơn vị lây nhiễm trên một thể tích chế phẩm virus. Độ chuẩn virus là điểm đầu mút trong quy trình sinh học và được định nghĩa là mức pha loãng trong đó một tỷ lệ nhất định các thử nghiệm được thực hiện song song cho thấy hiệu quả (Reed and Muench, 1938). Cụ thể là liều gây nhiễm mô nuôi cấy 50 trên một mililit (TCID₅₀/ml) là độ pha loãng của chế phẩm virus mà tại đó 50% số lượng của giống nuôi cấy tế bào được chủng song song với độ pha loãng đó bị nhiễm.

“Yếu tố điều hòa phiên mã” thường bao gồm vùng khởi đầu ngược chiều của trình tự gen được biểu hiện, các vị trí khởi đầu và kết thúc phiên mã và tín hiệu polyadenyl hóa.

Thuật ngữ “vị trí khởi đầu phiên mã” đề cập đến axit nucleic trong cấu trúc tương ứng với axit nucleic thứ nhất được kết hợp thành sản phẩm phiên mã sơ cấp, tức là tiền chất mARN. Vị trí khởi đầu phiên mã có thể chồng lên các trình tự khởi đầu.

“Tín hiệu kết thúc” hoặc “yếu tố kết thúc” hoặc “tín hiệu polyadenyl hóa” hoặc “polyA” hoặc vị trí kết thúc phiên mã” hoặc “yếu tố kết thúc phiên mã” là trình tự tín hiệu gây ra việc phân cắt ở vị trí cụ thể ở đầu 3' của mARN sinh vật nhân chuẩn và kết hợp sau phiên mã của trình tự khoảng 100 - 200 nucleotit adenin (đuôi polyA) ở đầu 3' bị phân cắt, và vì thế làm cho ARN polymeraza kết thúc quá trình phiên mã. Tín hiệu polyadenyl hóa bao gồm trình tự AATAAA khoảng 10-30 nucleotit ngược chiều với vị trí phân cắt và trình tự được nằm xuôi chiều. Các yếu tố polyadenyl hóa khác nhau đã biết như tk polyA, polyA biểu hiện muộn và sớm của SV40, polyA BGH (được mô tả ví dụ trong patent Mỹ số 5,122,458) hoặc polyA hormon tăng trưởng của chuột hamster (WO2010010107).

"Yếu tố điều hòa dịch mã" bao gồm vị trí khởi đầu dịch mã (AUG), codon kết thúc và tín hiệu polyA cho mỗi polypeptit cụ thể được biểu hiện. Vị trí nội nhập ribosom bên trong (IRES) có thể được bao gồm trong một số cấu trúc. Để tối ưu hóa sự biểu hiện có thể nên bớt, thêm hoặc thay đổi các vùng không dịch mã 5' và/hoặc 3' của trình tự axit nucleic được biểu hiện để loại bỏ các codon khởi đầu dịch mã khác có khả năng không phù hợp bất kỳ hoặc các trình tự khác mà có thể can thiệp hoặc làm giảm sự biểu hiện, ở mức phiên mã hoặc dịch mã. Vị trí gắn kết ribosom liên ứng (trình tự Kozak) có thể được gắn chèn ngay trước codon khởi đầu để tăng cường quá trình dịch mã vì thế tăng cường sự biểu hiện. Các thành phần A/U tăng xung quanh vị trí gắn kết ribosom này làm cho việc gắn kết ribosom hiệu quả hơn.

Theo định nghĩa, mỗi trình tự polynucleotit hoặc mỗi gen được gắn chèn trong tế bào chủ và protein hoặc ARN tương ứng được mã hóa do đó được gọi là “ngoại sinh”, “trình tự ngoại sinh”, “gen ngoại sinh”, “trình tự mã hóa ngoại sinh”, so với tế bào chủ, khi nó là từ loài (virus) khác. Do đó, vùng khởi đầu trên cơ sở EHV-4 theo sáng chế là ngoại sinh về khía cạnh vector virus EHV-1. Như được sử dụng trong bản mô tả này về mặt trình tự hoặc gen quan tâm như kháng nguyên, thuật ngữ “ngoại sinh” có nghĩa là trình tự hoặc gen quan tâm đó, cụ thể là kháng nguyên đó được biểu

hiện ngoài phạm vi loài tự nhiên của nó. Do đó, kháng nguyên H3 từ IAV lợn là một ví dụ (xem ví dụ 3) về kháng nguyên ngoại sinh đối với vectơ EHV-1. Vì thế trình tự không của phải của ngựa hoặc gen quan tâm như kháng nguyên không từ ngựa là trình tự ngoại sinh hoặc gen ngoại sinh quan tâm hoặc kháng nguyên theo khía cạnh cụ thể của sáng chế.

Theo định nghĩa, mỗi trình tự polynucleotit hoặc mỗi gen được gắn chèn vào trong tế bào chủ và protein hoặc ARN tương ứng được mã hóa theo đó được dùng để chỉ “khác loại”, “trình tự khác loại”, “gen khác loại”, “trình tự mã hóa khác loại”, “gen chuyển” hoặc “protein khác loại” so với tế bào chủ. Điều này áp dụng ngay cả khi trình tự được đưa vào hoặc gen được đưa vào giống hệt trình tự nội sinh hoặc gen nội sinh của tế bào chủ. Ví dụ, trình tự khởi đầu EHV-4 được đưa vào vectơ virut EHV-4 ở vị trí khác hoặc ở dạng biến đổi so với virut kiểu đại EHV-4 được định nghĩa là trình tự khác loại. Như được sử dụng trong bản mô tả này về mặt trình tự hoặc gen quan tâm như kháng nguyên, thuật ngữ “khác loại” có nghĩa là trình tự hoặc gen quan tâm, cụ thể là kháng nguyên, được biểu hiện ngoài phạm vi phân loài tự nhiên của nó. Do đó, trình tự hoặc gen đặc hiệu phi EHV-1 quan tâm như kháng nguyên, ví dụ kháng nguyên từ Equid alphaherpesvirus ngoại trừ EHV-1, ví dụ EHV-3, EHV-8, là trình tự hoặc gen khác loại quan tâm hoặc kháng nguyên theo khía cạnh cụ thể của sáng chế.

Thuật ngữ “không có trong tự nhiên” có nghĩa là trình tự hoặc gen quan tâm bất kỳ như kháng nguyên, mà không xuất hiện trong ngữ cảnh này một cách tự nhiên, như trình tự lai hoặc trình tự hoặc gen quan tâm như kháng nguyên từ loài khác, hoặc trình tự hoặc gen quan tâm như kháng nguyên, mà không phải là một sản phẩm của tự nhiên do đột biến nhân tạo, gắn chèn, xóa hoặc tương tự.

Thuật ngữ “tái tổ hợp” được sử dụng thay thế nhau với các thuật ngữ “không có trong tự nhiên”, “khác loại” và “ngoại sinh” trong suốt bản mô tả của sáng chế. Vì thế, protein “tái tổ hợp” là protein được biểu hiện từ trình tự polynucleotit khác loại hoặc trình tự polynucleotit ngoại sinh. Thuật ngữ tái tổ hợp khi được sử dụng liên quan đến virut, có nghĩa là virut được tạo ra bằng thao tác nhân tạo trên hệ gen virut. Virut chứa trình tự khác loại hoặc ngoại sinh như trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại

sinh là virus tái tổ hợp. Thuật ngữ virus tái tổ hợp và thuật ngữ virus không có trong tự nhiên được sử dụng thay cho nhau.

Vì thế, thuật ngữ “vector khác loại” có nghĩa là vector chứa trình tự polynucleotit khác loại hoặc ngoại sinh. Thuật ngữ “vector tái tổ hợp” có nghĩa là vector chứa trình tự polynucleotit khác loại hoặc tái tổ hợp.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "liên kết theo kiểu hoạt động được" được dùng để mô tả việc kết nối giữa yếu tố điều hòa và gen hoặc vùng mã hóa của nó. Thông thường, sự biểu hiện gen được đặt dưới sự kiểm soát của một hoặc nhiều yếu tố điều hòa, ví dụ, không giới hạn ở, vùng khởi đầu cấu tạo hoặc cảm ứng, yếu tố điều hòa đặc hiệu mô, và yếu tố tăng cường. Gen hoặc vùng mã hóa được gọi là "được liên kết theo kiểu hoạt động được với" hoặc "liên kết một cách khả thi với" hoặc "được kết hợp theo kiểu hoạt động được với" các yếu tố điều hòa, có nghĩa là gen hoặc vùng mã hóa được kiểm soát hoặc được tác động bởi yếu tố điều hòa. Ví dụ, vùng khởi đầu được liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự mã hóa nếu vùng khởi đầu này tác động đến sự phiên mã hoặc sự biểu hiện của trình tự mã hóa.

Ngoài ra, nằm trong phạm vi của phần mô tả này, các thuật ngữ "liên kết về mặt chức năng", "được liên kết về mặt chức năng" hoặc “liên kết theo kiểu hoạt động được” có nghĩa là hai hay nhiều trình tự axit nucleic hoặc thành phần trong trình tự được bố trí theo cách cho phép chúng thực hiện chức năng theo cách được dự định của chúng. Ví dụ, trình tự khởi đầu/yếu tố tăng cường hoặc yếu tố kết thúc được liên kết về mặt chức năng với trình tự gen mã hóa nếu nó có thể kiểm soát hoặc điều biến sự phiên mã của trình tự gen được liên ở vị trí *cis*. Thông thường, nhưng không nhất thiết, các trình tự ADN được liên kết về mặt chức năng là liền kề nhau và, khi cần để nối hai vùng mã hóa polypeptit hoặc trong trường hợp petit tín hiệu tiết, chúng liền kề nhau và trong khung đọc. Tuy nhiên, mặc dù vùng khởi đầu được liên kết theo kiểu hoạt động được thường được nằm trước hoặc yếu tố kết thúc được liên kết theo kiểu hoạt động được thường được nằm sau trình tự mã hóa, nhưng không nhất thiết phải liền kề với nó. Các yếu tố tăng cường không phải liền kề nhau miễn là chúng làm tăng sự phiên mã của trình tự mã hóa. Vì thế chúng có thể nằm trước hoặc sau trình tự mã hóa và thậm chí cách ra một khoảng nào đó. Vị trí polyadenyl hóa được liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự mã hóa nếu nó được nằm ở đầu 3' của

trình tự mã hóa theo cách mà sự phiên mã diễn ra qua trình tự mã hóa thành tín hiệu polyadenyl hóa. Việc nối được thực hiện bằng phương pháp tái tổ hợp đã biết trong lĩnh vực, ví dụ bằng cách nối ở vị trí giới hạn thích hợp hoặc đầu tù hoặc bằng cách sử dụng phương pháp PCR dung hợp. Phần tử liên kết hoặc trình tự thích ứng oligonucleotit tổng hợp có thể được sử dụng theo thực hành thông thường nếu vị trí giới hạn thích hợp không có mặt.

Do đó, thuật ngữ “mảnh chức năng” hoặc “dẫn xuất chức năng” của trình tự khởi đầu có nghĩa là mảnh hoặc dẫn xuất vẫn ảnh hưởng đến hoạt tính của vùng khởi đầu. Thử nghiệm chức năng về cách đánh giá hoạt tính của vùng khởi đầu đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết rõ (Bustin 2000, Nolan et al. 2006). Phương án ví dụ của thử nghiệm chức năng như vậy bao gồm ví dụ thử nghiệm động học vùng khởi đầu. Tế bào đã nhiễm virus vector mang catxet biểu hiện, trong đó vùng khởi đầu hoặc mảnh của nó điều khiển sự phiên mã của gen chuyển thông báo, được ủ trong các thời gian khác nhau. ARN tổng được tạo ra từ các mẫu được thu gom ở các thời điểm khác nhau sau khi nhiễm. Sau khi phá hủy ADN tạp nhiễm bằng cách phân hủy ADNaza I, ARN được phiên mã ngược. Một mẫu sao chép được xử lý bằng cách bổ sung enzym phiên mã ngược (reverse transcriptase - RT), mẫu sao chép thứ hai được xử lý không bổ sung RT để chứng tỏ việc loại bỏ thành công ADN tạp nhiễm ra khỏi chế phẩm ARN. ADN bổ trợ thu được được tinh chế và được sử dụng làm khuôn trong PCR thông thường. Chỉ có các mẫu được xử lý bằng việc bổ sung RT mới tạo ra sản phẩm PCR. Sau đó các ADN bổ trợ này có thể được sử dụng để qPCR với đoạn môi cho gen chuyển thông báo và song song với đoạn môi cho gen thiết yếu của vector virus (gen nội chuẩn), sự phiên mã mà tạo ra sản phẩm nội chuẩn đối với hiệu quả của việc nhiễm và sao chép. Các giá trị qPCR của gen thông báo được chuẩn hóa giữa các cấu trúc và thời gian khác nhau sau khi nhiễm bằng cách sử dụng các giá trị qPCR của gen nội chuẩn. Điều này cho phép hiểu rõ các hoạt tính của vùng khởi đầu của các vùng khởi đầu khác nhau và mảnh của chúng.

“Sự tương đồng về mặt trình tự”, như được sử dụng ở đây, dùng để chỉ phương pháp xác định mối quan hệ giữa hai trình tự. Để xác định mức tương đồng trình tự, hai hoặc nhiều hơn hai trình tự được sắp thẳng hàng theo cách tối ưu, và các khoảng trống được đưa vào nếu cần. Tuy nhiên, ngược với “mức đồng nhất về mặt trình tự”,

việc thay thế axit amin có bảo toàn được tính là khớp khi xác định mức tương đồng về mặt trình tự.

Nói cách khác, để thu được polypeptit hoặc polynucleotit có thể so sánh có mức tương đồng về trình tự 95% với trình tự tham chiếu, 85%, tốt hơn là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, thậm chí tốt hơn nữa là 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,9% số gốc axit amin hoặc nucleotit trong trình tự tham chiếu phải khớp hoặc bao gồm sự thay thế có bảo toàn bằng axit amin hoặc nucleotit khác. Cách khác, một số axit amin hoặc nucleotit lên tới 15%, tốt hơn là lên tới 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, thậm chí tốt hơn nữa là lên tới 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,1% tổng số gốc axit amin hoặc nucleotit, không bao gồm các thay thế có bảo toàn, trong trình tự tham chiếu có thể được gắn chèn vào trình tự tham chiếu. Tốt hơn là trình tự tương đồng bao gồm ít nhất một mạch gồm 50, thậm chí tốt hơn là 100, thậm chí tốt hơn là 250, thậm chí tốt hơn là 500 nucleotit.

“Mức đồng nhất trình tự” như đã biết trong lĩnh vực đề cập đến mối quan hệ giữa hai hoặc nhiều trình tự polypeptit hoặc hai hoặc nhiều trình tự polynucleotit, cụ thể là trình tự tham chiếu và trình tự định sẵn để so sánh với trình tự tham chiếu. Mức đồng nhất trình tự được xác định bằng cách so sánh trình tự định sẵn với trình tự tham chiếu sau khi các trình tự này đã được sắp thẳng hàng một cách tối ưu để tạo ra mức độ tương tự cao nhất về mặt trình tự, như được xác định bởi sự khớp giữa các chuỗi trình tự này. Bằng cách sắp thẳng hàng như vậy, mức đồng nhất trình tự được xác định trên cơ sở theo từng vị trí, ví dụ, các trình tự là “đồng nhất” tại một vị trí cụ thể nếu tại vị trí đó, các nucleotit hoặc các gốc axit amin giống nhau. Tiếp theo, tổng mức đồng nhất vị trí như vậy được chia cho tổng số nucleotit hoặc các gốc trong trình tự tham chiếu để thu được mức đồng nhất trình tự tính theo %. Mức đồng nhất trình tự có thể được tính toán một cách dễ dàng bằng các phương pháp đã biết, bao gồm nhưng không giới hạn ở, các phương pháp được mô tả trong tài liệu: Computational Molecular Biology, Lesk, A. N., ed., Oxford University Press, New York (1988), Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York (1993); Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinge, G., Academic Press (1987); Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York (1991);

and Carillo, H., and Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988), toàn bộ nội dung của các tài liệu này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn. Các phương pháp được ưu tiên để xác định mức đồng nhất trình tự được thiết kế sao cho thu được mức độ khớp lớn nhất giữa các trình tự được kiểm tra. Các phương pháp để xác định mức đồng nhất trình tự được mã hóa trong các chương trình máy tính sẵn có công khai, các chương trình này xác định mức đồng nhất trình tự giữa các trình tự định sẵn. Các ví dụ về các chương trình như vậy bao gồm, nhưng không giới hạn ở, gói chương trình GCG (Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research, 12(1): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN and FASTA (Altschul, S. F. et al., J. Molec. Biol., 215:403-410 (1990). Chương trình BLASTX sẵn có công khai từ NCBI và các nguồn khác (BLAST Manual, Altschul, S. et al., NCVINLM NIH Bethesda, MD 20894, Altschul, S. F. et al., J. Molec. Biol., 215:403-410 (1990), toàn bộ nội dung của các tài liệu này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn). Các chương trình này sắp thẳng hàng các trình tự theo cách tối ưu bằng cách sử dụng trọng số khoảng trống mặc định để tạo ra mức độ đồng nhất cao nhất về mặt trình tự giữa trình tự tham chiếu và trình tự định sẵn. Theo như minh họa, nếu polynucleotit có trình tự nucleotit có “độ đồng nhất trình tự” ít nhất là, ví dụ, 85%, tốt hơn là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, thậm chí tốt hơn nữa là 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,9% so với trình tự nucleotit tham chiếu, dự định rằng, trình tự nucleotit của polynucleotit nhất định là giống với trình tự tham chiếu, chỉ khác ở chỗ, trình tự polynucleotit nhất định này có thể bao gồm lên tới 15, tốt hơn tới 10, thậm chí tốt hơn nữa tới 5 điểm đột biến trên mỗi 100 nucleotit của trình tự nucleotit tham chiếu. Nói cách khác, trong một polynucleotit có trình tự nucleotit có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 85%, tốt hơn là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, thậm chí tốt hơn nữa là 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,9% so với trình tự nucleotit tham chiếu, thì có tới 15%, tốt hơn là 10%, 9%, 8%, 7%, 6% thậm chí tốt hơn nữa là 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,1% số nucleotit trong trình tự tham chiếu có thể được loại bỏ hoặc thay thế bằng nucleotit khác hoặc một số lượng nucleotit lên tới 15%, tốt hơn là 10%, 9%, 8%, 7%, 6% thậm chí tốt hơn nữa là 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,1% tổng số nucleotit trong trình tự tham chiếu có thể được gắn chen vào trình tự tham chiếu. Các đột biến như vậy đối với trình tự tham chiếu có thể xảy ra ở các vị trí đầu tận cùng 5' hoặc 3' của trình tự nucleotit tham chiếu hoặc ở bất kỳ nơi nào giữa các vị trí đầu tận cùng này, được nằm rải rác riêng rẽ trong các nucleotit trong trình tự tham chiếu hoặc trong

một hoặc nhiều nhóm liên kế thuộc trình tự tham chiếu này. Tương tự, nếu polypeptit có trình tự axit amin nhất định có độ đồng nhất trình tự ít nhất là, ví dụ 85%, tốt hơn là 90%, 91%, 92%, 93%, 94% thậm chí tốt hơn nữa là 95%, 96%, 97%, 98%, 99% so với trình tự axit amin tham chiếu, dự định rằng trình tự axit amin nhất định của polypeptit giống với trình tự tham chiếu, chỉ khác ở chỗ, trình tự polypeptit nhất định này có thể bao gồm lên tới 15, tốt hơn là lên tới 10, 9, 8, 7, 6 thậm chí tốt hơn nữa là lên tới 5, 4, 3, 2, 1 sự thay đổi axit amin trên mỗi 100 axit amin của trình tự axit amin tham chiếu. Nói cách khác, để thu được trình tự polypeptit nhất định có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 85%, tốt hơn là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, thậm chí tốt hơn nữa là 95%, 96%, 97%, 98%, 99% với trình tự axit amin tham chiếu, thì lên tới 15%, tốt hơn là lên tới 10%, 9%, 8%, 7%, thậm chí tốt hơn nữa là lên tới 5%, 4%, 3%, 2%, 1% số gốc axit amin trong trình tự tham chiếu có thể được loại bỏ hoặc được thay thế bằng một axit amin khác, hoặc số lượng axit amin lên tới 15%, tốt hơn là lên tới 10%, 9%, 8%, 7%, thậm chí tốt hơn nữa là lên tới 5%, 4%, 3%, 2%, 1% tổng số gốc axit amin trong trình tự tham chiếu có thể được gắn chen vào trình tự tham chiếu. Những thay đổi như vậy đối với trình tự tham chiếu có thể xảy ra ở các vị trí đầu tận cùng amino hoặc carboxy của trình tự axit amin tham chiếu hoặc ở bất kỳ nơi nào giữa các vị trí đầu tận cùng này, được nằm rải rác riêng rẽ trong số các gốc trong trình tự tham chiếu hoặc trong một hoặc nhiều nhóm liên kế thuộc trình tự tham chiếu này. Tốt hơn là, các vị trí gốc mà không giống nhau sẽ khác nhau bởi các thay thế axit amin có bảo toàn. Tuy nhiên, các thay thế có bảo toàn không được tính như là khớp khi xác định độ đồng nhất về mặt trình tự.

Thuật ngữ "độ đồng nhất trình tự" hoặc "tỷ lệ % đồng nhất" ở đây có thể được sử dụng thay đổi cho nhau. Nhằm mục đích của sáng chế này, ở đây định nghĩa rằng, để xác định tỷ lệ % đồng nhất của hai trình tự axit amin hoặc hai trình tự axit nucleic, các trình tự được sắp thẳng hàng nhằm mục đích so sánh tối ưu (ví dụ, các khoảng trống có thể được đưa vào trong trình tự của axit amin hoặc axit nucleic thứ nhất để sắp xếp thẳng hàng tối ưu với trình tự axit amin hoặc axit nucleic thứ hai). Tiếp theo, các gốc axit amin hoặc nucleotit tại các vị trí axit amin hoặc nucleotit tương ứng được so sánh. Nếu một vị trí trong trình tự thứ nhất được chiếm chỗ bởi gốc axit amin hoặc nucleotit giống như vậy làm vị trí tương ứng trong trình tự thứ hai, thì các phân tử là giống nhau tại vị trí đó. Tỷ lệ % đồng nhất giữa hai trình tự là hàm của số lượng vị

trí giống nhau được chia đều bởi các trình tự (tức là, % đồng nhất = số lượng vị trí giống nhau/tổng số lượng vị trí (tức là, các vị trí chồng lên nhau) x 100). Tốt hơn, hai trình tự có chiều dài như nhau.

Việc so sánh trình tự có thể được thực hiện trên toàn bộ chiều dài của hai trình tự đang được so sánh hoặc trên đoạn của hai trình tự. Thông thường, việc so sánh sẽ được thực hiện trên toàn bộ chiều dài của hai trình tự đang được so sánh. Tuy nhiên, độ đồng nhất trình tự có thể được thực hiện trên một vùng gồm, ví dụ, 20, 15, 100 hoặc nhiều hơn 100 gốc axit amin liền kề nhau.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rõ thực tế là có một số chương trình vi tính khác nhau để xác định mức tương đồng giữa hai trình tự. Ví dụ, việc so sánh các trình tự và xác định tỷ lệ % đồng nhất giữa hai trình tự có thể được hoàn thành nhờ sử dụng thuật toán toán học. Theo phương án ưu tiên, tỷ lệ % đồng nhất giữa hai trình tự axit amin hoặc axit nucleic được xác định nhờ sử dụng thuật toán của tác giả Needleman và Wunsch (J. Mol. Biol. (48): 444-453 (1970)), thuật toán này được kết hợp vào trong chương trình GAP trong gói phần mềm Accelrys GCG (có sẵn tại địa chỉ <http://www.accelrys.com/products/gcg/>), sử dụng ma trận Blosum 62 hoặc ma trận PAM250 và trọng số khoảng trống là 16, 14, 12, 10, 8, 6, hoặc 4 và trọng số chiều dài là 1, 2, 3, 4, 5, hoặc 6. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng, tất cả những thông số khác nhau này sẽ dẫn đến những kết quả khác nhau chút ít nhưng tổng tỷ lệ % đồng nhất của hai trình tự không thay đổi đáng kể khi sử dụng các thuật toán khác nhau.

Các trình tự protein hoặc các trình tự axit nucleic theo sáng chế còn có thể được sử dụng làm "trình tự truy vấn" để thực hiện tra cứu đối với các cơ sở dữ liệu công khai, ví dụ, để nhận diện các thành viên của họ khác hoặc các trình tự liên quan. Các tra cứu như vậy có thể được thực hiện nhờ sử dụng các chương trình BLASTN và BLASTP (version 2.0) của tác giả Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. Tra cứu protein BLAST có thể được thực hiện bằng chương trình BLASTP, điểm ghi = 50, độ dài từ = 3 để thu được các trình tự axit amin tương đồng với các phân tử protein theo sáng chế. Để thu được sự sắp xếp thẳng hàng có khoảng trống cho các mục đích so sánh, chương trình Gapped BLAST có thể được sử dụng như được mô tả trong tài liệu của tác giả Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25(17): 3389-

3402. Khi sử dụng các chương trình BLAST và Gapped BLAST, thông số mặc định của các chương trình tương ứng (ví dụ, BLASTP và BLASTN) có thể được sử dụng. Xem trong trang chủ của Trung tâm Thông tin Công nghệ sinh học Quốc gia tại trang web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Định nghĩa kỹ thuật vectơ tái tổ hợp EHV-1 và EHV-4

Thuật ngữ “equid” hoặc “equine” hoặc “equin” có nghĩa là thuộc họ Equidae, mà bao gồm ngựa, lừa, và ngựa vằn, tốt hơn là ngựa. Ngoài ra, thuật ngữ “equid” hoặc “equine” hoặc “equin” cũng bao gồm con lai của các thành viên trong họ Equidae (ví dụ con la, lừa la, v.v).

“Virus Herpes” hoặc “vectơ virus Herpes” đề cập đến loài thuộc họ *Herpesviridae* trong bộ *Herpesvirales*.

Thuật ngữ “vectơ virus herpes Equid” hoặc “virus herpes Equid” hoặc “EHV” có nghĩa là thành viên thuộc họ *Herpesviridae* ảnh hưởng đến ngựa. Đến nay có tám loài khác nhau của equid herpesvirus được xác định, nằm trong số đó thuộc phân họ *Alphaherpesvirinae* (EHV-1, EHV-3, EHV-4, EHV-8 và EHV-9) và ba trong số đó thuộc *Gammaherpesvirinae*. (<http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp> Virus Taxonomy: 2015 Release EC 47, London, UK, July 2015; Email ratification 2016 (MSL #30))

Thuật ngữ “EHV-1” có nghĩa là Equid Alphaherpesvirus 1, thành viên của phân chi *Varicellovirus* trong giống *Alphaherpesvirinae* trong họ *Herpesviridae*. Trình tự tham chiếu không giới hạn của EHV-1 có thể ví dụ là chủng EHV-1 kiểu đại ab4 (mã số truy cập Genbank AY665713.1) hoặc RacH (Hübner 1996).

Thuật ngữ “EHV-4” có nghĩa là Equid Alphaherpesvirus 4, thành viên của phân chi *Varicellovirus* trong chi *Alphaherpesvirinae* trong họ *Herpesviridae*.

Thuật ngữ “được gắn chèn vào trong ORF70” có nghĩa là mảnh ADN được gắn chèn vào trong ADN hệ gen ở vị trí mã hóa khung đọc mở 70 của Equid herpesvirus 1. Theo một khía cạnh cụ thể của sáng chế, việc gắn chèn đề cập đến việc dẫn đến việc xóa 801 cặp bazơ ở đầu 5' của ORF70 để lại 423 bp còn lại của đầu 3' nguyên vẹn nhưng làm mất sự biểu hiện của sản phẩm gen orf70 glycoprotein G.

Glycoprotein G của một vài Alphaherpesviruses bao gồm EHV-1 đã thể hiện là được tiết ra từ tế bào bị nhiễm và có chức năng làm protein điều biến miễn dịch bằng cách gắn kết xytokin tiền viêm. Việc làm mất sự biểu hiện của nó trong vectơ virus có thể làm tăng tính sinh miễn dịch của việc nhiễm virus so với EHV-1 kiểu đại có sự biểu hiện glycoprotein G nguyên vẹn.

Thuật ngữ “được gắn chèn vào trong ORF1/3” có nghĩa là mảnh ADN được gắn chèn trong hệ gen virus ở vị trí mà bằng cách vô tình xóa khi chuyển tiếp trong quá trình làm giảm độc lực của chủng vaccine EHV-1 RacH mảnh 1283 bp chứa 90% ORF1 và toàn bộ ORF2 bị mất đi. Vị trí gắn chèn này được chọn do khả năng mà sự biểu hiện của gen chuyển từ vị trí này có thể can thiệp vào sự sao chép của virus được dự kiến sẽ cực kỳ thấp.

Các định nghĩa vaccine

“Chế phẩm sinh miễn dịch hoặc chế phẩm miễn dịch” đề cập đến chế phẩm chứa ít nhất một kháng nguyên hoặc phần sinh miễn dịch của nó, chế phẩm này gây ra đáp ứng miễn dịch trong vật chủ thuộc đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào hoặc qua trung gian kháng thể với chế phẩm này.

Thuật ngữ "kháng nguyên" được sử dụng trong bản mô tả này được hiểu rõ trong lĩnh vực này và bao gồm các chất mà có tính sinh miễn dịch, tức là chất sinh miễn dịch, cũng như các chất gây ra tính không đáp ứng miễn dịch, hoặc trở, tức là thiếu phản ứng bởi cơ chế phòng vệ của cơ thể với các chất lạ. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "kháng nguyên" được dự định bao gồm protein có chiều dài đầy đủ cũng như mảnh peptit của nó chứa hoặc bao gồm epitop.

Thuật ngữ “động vật sản xuất thực phẩm” có nghĩa là động vật được sử dụng cho sự tiêu thụ của người như lợn, trâu bò, gia cầm, cá và các động vật tương tự, tốt hơn là động vật sản xuất thực phẩm có nghĩa là lợn và gia súc, tốt nhất là lợn.

“Chế phẩm sinh miễn dịch” như được sử dụng trong bản mô tả này có thể chỉ polypeptit hoặc protein, chẳng hạn như protein bề mặt của virus mà gây ra đáp ứng miễn dịch như được mô tả trong bản mô tả này. Thuật ngữ “mảnh sinh miễn dịch” hoặc “phần sinh miễn dịch” để chỉ mảnh hoặc dạng bị cắt và/hoặc được thể của

protein hoặc polypeptit mà bao gồm một hoặc nhiều epitop và vì thế gây ra đáp ứng miễn dịch được mô tả trong bản mô tả này. Nói chung, dạng bị cắt và/hoặc được thể hoặc các mảnh như vậy sẽ bao gồm ít nhất là sáu axit amin liên tiếp từ protein có chiều dài đầy đủ. Các mảnh như vậy có thể được xác định bằng cách sử dụng nhiều kỹ thuật lập bản đồ epitop, đã biết rõ trong lĩnh vực. Xem, ví dụ Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, New Jersey. Ví dụ, epitop thẳng có thể được xác định bằng cách đồng thời tổng hợp số lượng lớn các peptit trên giá thể rắn, peptit tương ứng với các phần của phân tử protein, và cho peptit phản ứng với kháng thể trong khi peptit vẫn gắn với giá thể. Các kỹ thuật này đã biết và được mô tả trong lĩnh vực này, xem ví dụ, Patent Mỹ số 4,708,871; Geysen et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998-4002; và Geysen et al. (1986) Molec. Immunol. 23:709-715. Tương tự, epitop cấu hình dễ dàng được nhận biết bằng cách xác định cấu hình không gian của axit amin như bằng, ví dụ, tinh thể học tia x và cộng hưởng từ hạt nhân hai chiều. Xem Epitope Mapping Protocols, nêu trên. Các kháng nguyên tổng hợp cũng được bao gồm trong định nghĩa này, ví dụ, polyepitop, epitop gắn sườn, và các kháng nguyên tái tổ hợp hoặc thu được theo cách tổng hợp khác. Ví dụ xem trong Bergmann et al. (1993) Eur. J. Immunol. 23:2777-2781; Bergmann et al. (1996), J. Immunol. 157:3242-3249; Suhrbier, A. (1997), Immunol. and Cell Biol. 75:402-408; and Gardner et al., (1998) 12th World AIDS Conference, Geneva, Switzerland, June 28-July 3, 1998. (Toàn bộ nội dung của tài liệu này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn).

Thuật ngữ “vacxin” như được sử dụng trong bản mô tả này đề cập đến được phẩm chứa ít nhất một thành phần có hoạt tính miễn dịch mà cảm ứng đáp ứng miễn dịch ở động vật và có thể nhưng không nhất thiết một hoặc nhiều thành phần bổ sung mà tăng cường hoạt tính miễn dịch của thành phần hoạt tính. Vacxin có thể còn chứa các thành phần khác thường có trong dược phẩm. Bằng cách phân biệt, thành phần có hoạt tính miễn dịch của vacxin có thể chứa các hạt virut hoàn chỉnh ở dạng ban đầu của chúng hoặc là các hạt đã giảm độc lực trong cái được gọi là vacxin sống được cải biến (MLV) hoặc các hạt được bất hoạt bằng các phương pháp thích hợp trong cái gọi là vacxin chết (KV). Ở dạng khác, thành phần có hoạt tính miễn dịch của vacxin có thể bao gồm các yếu tố thích hợp của sinh vật (vacxin dưới đơn vị) trong đó các

yếu tố này được tạo ra bằng cách phân hủy hạt hoàn chỉnh hoặc môi trường tăng trưởng chứa các hạt này và tùy ý các bước tinh chế tiếp theo để thu được (các) cấu trúc mong muốn, hoặc bằng cách quy trình tổng hợp bao gồm thao tác thích hợp bằng cách sử dụng hệ thống thích hợp trên cơ sở, ví dụ, vi khuẩn, côn trùng, động vật có vú, hoặc các loài khác cộng với các quy trình tách và tinh chế tiếp theo tùy ý, hoặc bằng cách cảm ứng quá trình tổng hợp ở động vật cần vaccin bằng cách kết hợp trực tiếp vật liệu di truyền bằng cách sử dụng được phẩm thích hợp (chủng ngừa polynucleotit). Vaccin có thể bao gồm một hoặc đồng thời nhiều hơn một trong các yếu tố được mô tả ở trên. Như được sử dụng trong các khía cạnh cụ thể của sáng chế “vaccin” đề cập đến vaccin sống hoặc virus sống, còn gọi là vaccin tái tổ hợp. Theo một khía cạnh cụ thể khác của sáng chế “vaccin” đề cập đến virus bất hoạt hoặc chết bao gồm các hạt giống virus (virus like particles - VLP). Vì thế, vaccin có thể là vaccin dưới đơn vị hoặc vaccin chết (KV) hoặc bất hoạt.

Thuật ngữ “tỷ lệ gây nhiễm (Multiplicity of Infection - M.O.I.)” đề cập đến số lượng đơn vị gây nhiễm, ví dụ TCID₅₀, của chế phẩm virus được sử dụng trên một tế bào để gây nhiễm tế bào nuôi cấy. Ví dụ, M.O.I. bằng 0,01 có nghĩa là đối với mỗi 100 tế bào trung bình nuôi cấy, một đơn vị gây nhiễm được cấy truyền.

Thuật ngữ “chủng ngừa bằng ADN” hoặc “chủng ngừa bằng polynucleotit” có nghĩa là cấy truyền trực tiếp vật liệu di truyền bằng cách sử dụng được phẩm thích hợp.

Các phương pháp vật lý và hóa học khác nhau để bất hoạt đã được biết đến trong lĩnh vực này. Thuật ngữ “đã bất hoạt” chỉ virus hoặc vi khuẩn có độc tính hoặc không có độc tính trước đó mà đã được chiếu xạ (cực tím (UV), tia X, chùm tia điện tử hoặc bức xạ gamma), gia nhiệt, hoặc xử lý hóa học để bất hoạt hoặc tiêu diệt virus hoặc vi khuẩn này, trong khi vẫn giữ được tính sinh miễn dịch của nó. Các tác nhân bất hoạt thích hợp bao gồm beta-propiolacton, etylenimin cặp đôi hoặc beta- hoặc axetyl-etylenimin, gluteraldehyt, ozon, và formalin (formaldehyt).

Để bất hoạt bằng formalin hay formaldehyt, formaldehyt thường được trộn với nước và rượu metylic để tạo ra formalin. Việc bổ sung rượu metylic ngăn chặn sự thoái hóa hoặc phản ứng chéo trong quá trình hoạt hóa. Một phương án sử dụng

khoảng 0,1 đến 1% của dung dịch formaldehyt 37% để bất hoạt virus hoặc vi khuẩn. Điều quan trọng là phải điều chỉnh lượng formalin để đảm bảo vật liệu bị bất hoạt nhưng không nhiều đến mức xảy ra các tác dụng phụ do liều lượng cao.

Cụ thể hơn là, thuật ngữ "bất hoạt" trong ngữ cảnh này nghĩa là virus không còn khả năng sao chép *in vivo* hoặc *in vitro* và, tương ứng, thuật ngữ "bất hoạt" trong ngữ cảnh về vi khuẩn có nghĩa là vi khuẩn không còn khả năng sinh sôi *in vivo* hoặc *in vitro*. Ví dụ, thuật ngữ "bất hoạt" có thể chỉ virus mà đã được nhân lên *in vitro*, và sau đó đã được bất hoạt bằng biện pháp hóa học hoặc vật lý sao cho nó không còn khả năng sao chép. Theo ví dụ khác, thuật ngữ "bất hoạt" có thể đề cập đến vi khuẩn mà đã được nhân lên, sau đó và đã được bất hoạt bằng cách sử dụng biện pháp hóa học hoặc vật lý dẫn đến huyền phù của vi khuẩn, mảnh hoặc các thành phần của vi khuẩn, sao cho thu được bacterin mà có thể được sử dụng làm thành phần của vaccin.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, các thuật ngữ "bất hoạt", "chết" hoặc "KV" được sử dụng thay đổi cho nhau.

Thuật ngữ "vaccin sống" đề cập đến vaccin chứa sinh vật sống hoặc virus hoặc vectơ virus có khả năng sao chép.

"Dược phẩm" về cơ bản chứa một hoặc nhiều thành phần có khả năng cải biến các chức năng sinh lý ví dụ chức năng miễn dịch, của sinh vật mà sử dụng nó, hoặc của sinh vật sống trong hoặc trên sinh vật này. Thuật ngữ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chất kháng sinh hoặc chất chống ký sinh trùng, cũng như các thành phần khác thường được sử dụng để đạt được các mục đích nhất định khác như, nhưng không giới hạn ở, các đặc điểm xử lý, độ vô trùng, độ ổn định, độ tiện lợi cho đối tượng dùng chế phẩm qua đường ruột hoặc ngoài đường tiêu hóa như đường miệng, trong mũi, trong tĩnh mạch, trong cơ, dưới da, trong da, hoặc các đường dùng thích hợp khác, dung nạp sau khi dùng, hoặc đặc tính được giải phóng có kiểm soát. Một ví dụ không nhằm mục đích giới hạn về dược phẩm như vậy, nêu chỉ nhằm mục đích chứng minh, có thể được bào chế như sau: dịch nổi giống nuôi cấy tế bào của giống nuôi cấy tế bào bị nhiễm được trộn với chất làm ổn định (ví dụ, spermidin và/hoặc albumin huyết thanh bò (BSA) và hỗn hợp sau đó được đông khô hoặc khử nước bằng các phương pháp khác. Trước khi chủng ngừa, hỗn hợp sau đó được hydrat lại trong nước

(ví dụ dung dịch nước muối, dung dịch muối đệm phosphat (PBS) hoặc dung dịch không chứa nước (ví dụ, nhũ tương dầu, tá dược trên cơ sở alumin).

Như sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “chất mang được dụng hoặc chấp nhận được trong thú y” bao gồm bất kỳ trong số và tất cả các dung môi, môi trường phân tán, chất bao, chất phụ gia, chất làm ổn định, chất pha loãng, chất bảo quản, chất kháng khuẩn và chất kháng nấm, chất tạo đẳng trương, chất làm chậm hấp phụ và chất tương tự. Theo một số phương án ưu tiên và đặc biệt là các phương án bao gồm chế phẩm sinh miễn dịch đông khô, chất làm ổn định để sử dụng trong sáng chế bao gồm chất làm ổn định để làm đông khô hoặc sấy thăng hoa.

Theo một số phương án, chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế chứa tá dược. “Tá dược” như được sử dụng ở đây, có thể bao gồm nhôm hydroxit và nhôm phosphat, saponin chẳng hạn, Quil A, QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA), GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, AL), nhũ tương nước trong dầu, nhũ tương dầu trong nước, nhũ tương nước trong dầu trong nước. Cụ thể, nhũ tương có thể dựa trên cơ sở dầu parafin lỏng nhẹ (loại trong Dược điển châu Âu); dầu isoprenoit như squalan hoặc squalen; dầu thu được từ quá trình oligome hóa các alken, cụ thể là isobuten hoặc dexten; các este của axit hoặc rượu chứa nhóm alkyl mạch thẳng, cụ thể hơn là dầu thực vật, etyl oleat, propylen glycol di-(caprylat/caprat), glyxeryl tri-(caprylat/caprat) hoặc propylen glycol dioleat; các este của axit béo hoặc rượu béo phân nhánh, cụ thể là este của axit isostearic. Dầu được sử dụng kết hợp với chất nhũ hóa để tạo thành nhũ tương. Chất nhũ hóa tốt hơn là chất hoạt động bề mặt không ion, cụ thể là este của sorbitan, este của manit (chẳng hạn anhydromanitol oleat), este của glycol, este của polyglyxerol, este của propylen glycol và este của axit oleic, isostearic, rixinoleic hoặc hydroxystearic, tùy ý được etoxyl hóa, và các copolyme khối polyoxypropylen-polyoxyetylen, cụ thể là các sản phẩm Pluronic, đặc biệt là L121. Xem Hunter et al., *The Theory and Practical Application of Adjuvants* (Ed. Stewart-Tull, D. E. S.), John Wiley and Sons, NY, pp51-94 (1995) và Todd et al., *Vaccine* 15:564-570 (1997). Tá dược được nêu làm ví dụ là nhũ tương SPT được mô tả ở trang 147 trong tài liệu “Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach” được biên tập bởi tác giả M. Powell và M. Newman, Plenum Press, 1995, và nhũ tương MF59 được mô tả ở trang 183 của cùng tài liệu này.

Một ví dụ khác nữa về tá dược là hợp chất được chọn từ các polyme của axit acrylic hoặc metacrylic và các copolyme của anhydrit maleic và dẫn xuất alkenyl. Hợp chất tá dược có lợi đó là các polyme của axit acrylic hoặc metacrylic mà được liên kết ngang, đặc biệt là với các polyalkenyl ete của đường hoặc rượu đa chức. Các hợp chất này được biết đến bằng thuật ngữ carbome (Pharmeuropa Vol. 8, No. 2, June 1996). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực cũng có thể đề cập đến patent Mỹ số 2,909,462 mô tả các acrylic polyme như vậy được liên kết ngang với hợp chất được polyhydroxyl hóa có ít nhất 3 nhóm hydroxyl, tốt hơn là không nhiều hơn 8, nguyên tử hydro của ít nhất ba nhóm hydroxyl được thay bằng các gốc béo chưa bão hòa có ít nhất 2 nguyên tử cacbon. Các gốc được ưu tiên là gốc chứa từ 2 đến 4 nguyên tử cacbon, ví dụ vinyl, allyl và các nhóm chưa bão hòa về liên kết etylen khác. Bản thân các gốc chưa bão hòa có thể chứa các phần tử thế khác, ví dụ như methyl. Các sản phẩm được bán dưới tên CARBOPOL®; (BF Goodrich, Ohio, USA) đặc biệt thích hợp. Chúng được liên kết ngang với allyl sucroza hoặc với allyl pentaerythritol. Trong số chúng, đáng lưu ý là Carbopol 974P, 934P và 971P. Tốt nhất là sử dụng CARBOPOL® 971P. Trong số các copolyme của các dẫn xuất anhydrit maleic và alkenyl có các copolyme EMA (Monsanto) mà chúng là copolyme của anhydrit maleic và etylen. Việc hòa tan các polyme này trong nước dẫn tới dung dịch axit mà dung dịch này sẽ được trung hòa, tốt hơn tới độ pH sinh lý, để tạo ra dung dịch chất phụ gia mà chính các chế phẩm sinh miễn dịch, chế phẩm miễn dịch hoặc chế phẩm vacxin sẽ được kết hợp vào trong đó.

Các tá dược thích hợp khác bao gồm, nhưng không giới hạn ở, hệ tá dược RIBI (Ribi Inc.), co-polyme khối (CytRx, Atlanta GA), SAF-M (Chiron, Emeryville CA), monophosphoryl lipid A, tá dược Avridine lipid-amin, độc tố đường ruột từ E. coli dễ bị phân hủy bởi nhiệt (dạng tái tổ hợp hoặc dạng khác), độc tố gây bệnh tả, IMS 1314, hoặc muramyl dipeptit, hoặc các xytokin có trong tự nhiên hoặc tái tổ hợp hoặc các chất tương tự của nó hoặc chất kích thích giải phóng xytokin nội sinh, trong số nhiều tá dược khác.

Tá dược được kỳ vọng là có thể được bổ sung với lượng nằm trong khoảng từ 100µg đến 10mg mỗi liều, tốt hơn với lượng nằm trong khoảng từ 100µg đến 10mg mỗi liều, tốt hơn nữa với lượng nằm trong khoảng từ 500µg đến 5mg mỗi liều, thậm

chỉ tốt hơn nữa với lượng nằm trong khoảng từ 750µg đến 2,5mg mỗi liều và tốt nhất với lượng khoảng 1mg mỗi liều. Theo cách khác, tá dược có thể có mặt ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,01 đến 50%, tốt hơn ở nồng độ nằm trong khoảng từ 2% đến 30%, tốt hơn nữa ở nồng độ nằm trong khoảng từ 5% đến 25%, thậm chí tốt hơn nữa ở nồng độ nằm trong khoảng từ 7% đến 22% và tốt nhất ở nồng độ nằm trong khoảng từ 10% đến 20% tính theo thể tích của sản phẩm cuối cùng.

Chất pha loãng có thể bao gồm nước, nước muối, dextroza, etanol, glyxerol và chất tương tự. Chất đẳng trương có thể bao gồm natri clorua, dextroza, manitol, sorbitol và lactoza, ngoài các chất khác. Chất làm ổn định bao gồm albumin và các muối kiềm của axit etylendiamintetraxetic, ngoài các chất khác.

“Được phân lập” có nghĩa là được thay đổi “bởi bàn tay con người” từ trạng thái tự nhiên của nó, nghĩa là, nếu nó xuất hiện trong tự nhiên, nó được thay đổi hoặc loại bỏ khỏi môi trường ban đầu của nó, hoặc cả hai. Ví dụ, polynucleotit hoặc polypeptit có mặt tự nhiên trong sinh vật sống không “được phân lập” nhưng polynucleotit hoặc polypeptit tương tự được tách từ vật chất đồng tồn tại của trạng thái tự nhiên của nó lại “được phân lập”, như là thuật ngữ được sử dụng ở đây.

“Làm giảm độc lực” có nghĩa là làm giảm độc lực của mầm bệnh. Trong sáng chế này “sự giảm độc lực” đồng nghĩa với “không có tính độc”. Trong sáng chế này, virus được giảm độc lực là virus trong đó tính độc được giảm đến mức không gây ra triệu chứng lâm sàng của sự nhiễm nhưng có khả năng tạo ra đáp ứng miễn dịch ở động vật đích, nhưng có thể cũng có nghĩa là triệu chứng lâm sàng được giảm cả về tỷ lệ mắc phải và độ nặng ở động vật bị nhiễm virus được giảm độc lực, đặc biệt là vector virus EHV-1 RacH theo sáng chế, so với “nhóm đối chứng” gồm các động vật bị nhiễm virus không được giảm độc lực hoặc mầm bệnh và không nhận virus được giảm độc lực. Trong ngữ cảnh này, thuật ngữ “giảm/được giảm” có nghĩa là giảm ít nhất 10%, tốt hơn là 25%, thậm chí tốt hơn nữa là 50%, cũng tốt hơn nữa là 60%, thậm chí tốt hơn nữa là 70%, cũng tốt hơn nữa là 80%, thậm chí tốt hơn nữa là 90% và tốt nhất là 100% so với nhóm đối chứng như được xác định trên đây. Vì thế, mầm bệnh được làm giảm độc lực, không độc như, ví dụ, vector virus được làm giảm độc lực theo sáng chế, đặc biệt là vector virus EHV-1 (tốt hơn là RacH) theo sáng chế, là

thích hợp để tạo ra vacxin sống được cải biến (MLV) hoặc chế phẩm sinh miễn dịch sống được cải biến.

Ở đây, “liều lượng hiệu quả” có nghĩa là, nhưng không chỉ giới hạn ở, lượng kháng nguyên mà gây ra hoặc có khả năng gây ra, đáp ứng miễn dịch để làm giảm triệu chứng lâm sàng trên động vật mà kháng nguyên được dùng cho động vật này.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “lượng hiệu quả” có nghĩa là, theo ngữ cảnh của chế phẩm, một lượng chế phẩm sinh miễn dịch có khả năng gây ra đáp ứng miễn dịch làm giảm tỷ lệ mắc hoặc làm giảm mức độ nặng của bệnh nhiễm hoặc tỷ lệ mắc bệnh ở động vật. Cụ thể, lượng hiệu quả đề cập đến đơn vị tạo thành khuẩn lạc (CFU) trên mỗi liều. Theo cách khác, trong ngữ cảnh của thuật ngữ trị liệu, thuật ngữ “lượng hiệu quả” đề cập đến lượng trị liệu mà lượng này đủ để làm giảm hoặc cải thiện mức độ nặng hoặc khoảng thời gian của bệnh hoặc rối loạn, hoặc một hoặc nhiều triệu chứng của chúng, ngăn chặn sự tiến triển của bệnh hoặc rối loạn, dẫn đến sự thoái triển của bệnh hoặc rối loạn, ngăn chặn sự tái phát, phát triển, sự khởi phát hoặc tiến triển của một hoặc nhiều triệu chứng kết hợp với bệnh hoặc rối loạn, hoặc tăng cường hoặc cải thiện sự phòng ngừa hoặc điều trị của liệu pháp trị liệu hoặc tác nhân trị liệu khác.

“Đáp ứng miễn dịch” hoặc “đáp ứng về miễn dịch” có nghĩa là, nhưng không chỉ giới hạn ở, sự phát triển đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào và/hoặc kháng thể đối với chế phẩm (sinh miễn dịch) hoặc vacxin quan tâm. Thông thường, “đáp ứng miễn dịch” hoặc “đáp ứng về miễn dịch” bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, một hoặc nhiều tác dụng sau: sản sinh hoặc hoạt hóa kháng thể, tế bào B, tế bào T hỗ trợ, tế bào T ức chế, và/hoặc tế bào T gây độc tế bào, hướng cụ thể đến kháng nguyên hoặc các kháng nguyên được chứa trong chế phẩm hoặc vacxin quan tâm. Tốt hơn là, vật chủ sẽ thể hiện đáp ứng (trí nhớ) miễn dịch điều trị hoặc bảo vệ, sao cho khả năng kháng lại sự nhiễm mới sẽ được tăng lên và/hoặc mức độ nặng về mặt lâm sàng của bệnh được giảm xuống. Việc bảo vệ này sẽ được chứng minh bằng sự giảm về số lượng triệu chứng, mức độ nặng của triệu chứng, hoặc không bị một hoặc nhiều triệu chứng kết hợp với sự nhiễm tác nhân gây bệnh, làm chậm sự khởi phát của virus huyết, giảm sự tồn tại dai dẳng của virus, giảm tải lượng virus nói chung và/hoặc giảm sự tiết của virus.

Các thuật ngữ “bảo vệ chống lại bệnh”, “miễn dịch bảo vệ”, “miễn dịch chức năng”, “giảm triệu chứng lâm sàng”, “cảm ứng/tạo ra kháng thể trung hòa và/hoặc chuyển hóa huyết thanh”, và các cụm từ tương tự, có nghĩa là đáp ứng một phần hoặc hoàn toàn chống lại bệnh hoặc tình trạng bệnh được sinh ra bằng cách sử dụng một hoặc nhiều chế phẩm trị liệu theo sáng chế hoặc hỗn hợp của chúng, việc sử dụng này dẫn đến ít tác động có hại hơn so với kỳ vọng ở một đối tượng không được gây miễn dịch mà đối tượng này đã được tiếp xúc với bệnh hoặc nguồn lây nhiễm. Tức là, mức độ nặng của các tác động có hại của bệnh nhiễm được giảm thiểu ở đối tượng được chủng ngừa. Nhiễm trùng có thể được làm giảm, làm chậm lại hoặc có thể được ngăn chặn hoàn toàn, ở đối tượng được chủng ngừa. Ở đây, sẽ có thông báo cụ thể nếu việc lây nhiễm được ngăn chặn hoàn toàn. Nếu việc ngăn chặn hoàn toàn không được thông báo, thì thuật ngữ bao gồm cả việc ngăn chặn một phần.

Ở đây, “việc làm giảm tỷ lệ mắc và/hoặc mức độ nặng của các dấu hiệu lâm sàng” hoặc “làm giảm các triệu chứng lâm sàng” có nghĩa là, nhưng không chỉ giới hạn bởi, làm giảm số lượng đối tượng bị nhiễm trong nhóm, làm giảm hoặc loại bỏ số lượng đối tượng biểu hiện các dấu hiệu lâm sàng về bệnh nhiễm hoặc làm giảm mức độ nặng của dấu hiệu lâm sàng bất kỳ có mặt ở một hoặc nhiều đối tượng, so với bệnh nhiễm kiểu tự nhiên. Ví dụ, thuật ngữ này đề cập đến bất kỳ sự giảm thiểu nào về tải lượng mầm bệnh, sự thải loại mầm bệnh, làm giảm về sự lan truyền mầm bệnh hoặc sự giảm về triệu chứng lâm sàng bất kỳ thuộc triệu chứng của bệnh sốt rét. Tốt hơn là các dấu hiệu lâm sàng này được giảm ở một hoặc nhiều đối tượng tiếp nhận chế phẩm trị liệu theo sáng chế ít nhất là 10% so với các đối tượng không được tiếp nhận chế phẩm và trở nên bị nhiễm trùng. Tốt hơn nữa là các dấu hiệu lâm sàng được giảm ở đối tượng tiếp nhận chế phẩm theo sáng chế ít nhất là 20%, tốt hơn là ít nhất 30%, tốt hơn nữa là ít nhất 40% và thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 50%.

Thuật ngữ “bảo vệ tăng cường” ở đây có nghĩa là, nhưng không chỉ giới hạn ở, làm giảm có ý nghĩa thống kê về một hoặc nhiều triệu chứng lâm sàng có liên quan đến sự nhiễm tác nhân lây nhiễm ở nhóm đối tượng được chủng ngừa so với nhóm đối tượng không được chủng ngừa. Thuật ngữ “làm giảm có ý nghĩa thống kê về các triệu chứng lâm sàng” có nghĩa là, nhưng không chỉ giới hạn ở, tần suất về tỷ lệ mắc ít nhất một triệu chứng lâm sàng ở nhóm đối tượng được chủng ngừa thấp hơn ít nhất

là 10%, tốt hơn là 20%, tốt hơn nữa là 30%, thậm chí tốt hơn nữa là 50%, và thậm chí tốt hơn nữa là 70% so với nhóm đối chứng không được chủng ngừa sau khi thử thách bởi tác nhân lây nhiễm.

“Bảo vệ kéo dài” đề cập đến “hiệu lực cải thiện” kéo dài ít nhất 3 tuần, nhưng tốt hơn nữa ít nhất 3 tháng, thậm chí tốt hơn nữa ít nhất 6 tháng. Trong trường hợp ở động vật nuôi, tốt nhất là sự bảo vệ kéo dài tồn tại cho tới tuổi trung bình mà tại thời điểm đó, động vật được đưa ra thị trường.

Thuật ngữ “giảm virus huyết” có nghĩa là, nhưng không chỉ giới hạn ở, giảm virus đi vào dòng máu của động vật, trong khi mức độ virus huyết, nghĩa là, số lượng bản sao ARN hoặc ADN virus trong một ml huyết thanh máu hoặc số lượng khuẩn lạc tạo đám hoại tử trong một đề-xi-lít huyết thanh máu, trong huyết thanh máu của động vật nhận chế phẩm theo sáng chế giảm ít nhất 50% so với đối tượng không nhận chế phẩm và có thể bị nhiễm. Tốt hơn nữa là, mức độ virus huyết ở động vật nhận chế phẩm theo sáng chế giảm ít nhất 90%, tốt hơn là ít nhất 99,9%, tốt hơn là ít nhất 99,99%, và thậm chí tốt hơn là ít nhất 99,999%.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “virus huyết” được hiểu cụ thể là tình trạng bệnh trong đó các hạt virus sinh sôi và/hoặc tuần hoàn trong dòng máu của động vật, cụ thể là động vật có vú, chim, hoặc côn trùng.

“Độ an toàn” đề cập đến việc không có các hậu quả bất lợi ở động vật được chủng ngừa sau khi chủng ngừa, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở: sự đảo ngược hiệu lực của vaccin trên cơ sở virus thành tính độc, các tác dụng phụ đáng kể về mặt lâm sàng như bệnh dai dẳng, toàn thân hoặc viêm không chấp nhận được tại vị trí dùng vaccin.

Thuật ngữ “sự chủng ngừa” hoặc “việc chủng ngừa” hoặc các biến thể của thuật ngữ này, theo sử dụng ở đây có nghĩa là, nhưng không chỉ giới hạn ở, quy trình bao gồm bước sử dụng chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế mà, khi được dùng cho động vật, sẽ gây ra hoặc có khả năng gây ra - trực tiếp hoặc gián tiếp -, đáp ứng miễn dịch ở động vật này.

“Tỷ lệ tử vong”, theo ngữ cảnh của sáng chế, đề cập đến lượng tử vong gây ra bởi bệnh nhiễm và bao gồm cả tình huống trong đó việc bệnh nhiễm nghiêm trọng đến mức động vật được gây chết nhẹ nhàng để không phải chịu đựng và khiến con người chấm dứt cuộc sống của nó.

Chế phẩm phối chế

Đối tượng mà dùng chế phẩm phối chế tốt hơn là động vật, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, gia súc, ngựa, cừu, lợn, gia cầm (ví dụ, gà), dê, mèo, chó, chuột hamster, chuột nhắt và chuột cống, tốt nhất là động vật là lợn.

Chế phẩm theo sáng chế chứa lượng gây miễn dịch hữu hiệu của một hoặc nhiều thành phần sinh miễn dịch và chất dẫn thuốc được dụng. Vacxin chứa lượng gây miễn dịch hữu hiệu của một hoặc nhiều thành phần sinh miễn dịch và chất dẫn thuốc được dụng. Chế phẩm phối chế nên thích hợp cho phương thức dùng.

Chế phẩm sinh miễn dịch, nếu cần, cũng có thể chứa lượng nhỏ các tác nhân tạo ẩm hoặc tạo nhũ hoặc tác nhân đệm pH. Chế phẩm sinh miễn dịch có thể là dung dịch lỏng, hỗn dịch, nhũ tương, viên nén, viên tròn, viên nang, chế phẩm giải phóng kéo dài hoặc bột. Chế phẩm dùng qua đường miệng có thể bao gồm các chất mang tiêu chuẩn như manitol, lactoza, tinh bột, magie stearat, natri sacarin, xenluloza, magie cabonat loại dùng cho dược phẩm, v.v.

Phương pháp điều trị

Các đường dùng ưu tiên bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở đường dùng trong mũi, đường uống, đường trong da và trong cơ. Dùng trong nước uống, tốt nhất là trong liều đơn, được mong muốn. Người có kỹ năng sẽ nhận thấy rằng, chế phẩm theo sáng chế cũng có thể được sử dụng làm một, hai hoặc nhiều liều, cũng như theo các đường dùng khác. Ví dụ, các đường dùng khác như vậy bao gồm dưới da, trong da, trong phúc mạc, trong da, và phụ thuộc vào thời gian và hiệu quả mong muốn của quá trình điều trị, chế phẩm theo sáng chế có thể được dùng một hoặc vài lần, cả gián đoạn, ví dụ dùng trên cơ sở hằng ngày trong vài ngày, tuần hoặc tháng và với các liều khác nhau như khoảng 10^3 đến 10^8 TCID₅₀ (xem độ chuẩn virus ở trên). Theo khía

cạnh cụ thể của sáng chế, liều lượng là khoảng 10^3 đến 10^8 TCID₅₀, đặc biệt là đối với virut sống / vacxin sống.

Các chế phẩm có thể, nếu muốn, được trình bày trong gói hoặc dụng cụ phân phối mà có thể chứa một hoặc nhiều dạng liều đơn vị chứa thành phần hoạt tính. Gói này có thể ví dụ bao gồm màng kim loại hoặc chất dẻo, như vỉ phòng. Gói hoặc dụng cụ phân phối có thể kèm theo hướng dẫn sử dụng tốt hơn là để dùng cho động vật có vú, đặc biệt là lợn. Đi kèm với (các) vật chứa đó có thể là một thông báo theo mẫu do cơ quan chính phủ quy định về việc sản xuất, sử dụng hoặc bán dược phẩm hoặc sản phẩm sinh học, thông báo này phản ánh sự chấp thuận của cơ quan này về việc sản xuất, sử dụng hoặc bán để dùng cho người.

Các trình tự:

Các trình tự dưới đây được mô tả chi tiết và được bộc lộ trong sáng chế:

Vùng khởi đầu:

SEQ ID NO.: 1	Trình tự axit desoxyribonucleic 600bp	EHV-4 4pgG600
SEQ ID NO.: 2	Trình tự axit desoxyribonucleic 600bp	EHV-4 4pMCP600
SEQ ID NO.: 3	Trình tự axit desoxyribonucleic 430bp	EHV-4 pG430
SEQ ID NO.: 4	Trình tự axit desoxyribonucleic 449bp	EHV-4 p455
SEQ ID NO.: 5	đoạn môi số 1130 đặc hiệu đối với orf72	
SEQ ID NO.: 6	đoạn môi số 1131 đặc hiệu đối với orf72	
SEQ ID NO.: 7	đoạn môi số 1079 đặc hiệu đối với mCherry	
SEQ ID NO.: 8	đoạn môi số 1080 đặc hiệu đối với mCherry	

Vị trí gắn chèn:

SEQ ID NO.: 9	đoạn môi PCR axit nucleic trình tự nhân tạo 1017 cho vùng gắn chèn orf70
---------------	--

- SEQ ID NO.: 10 đoạn môi PCR axit nucleic trình tự nhân tạo 1018 cho vùng gắn chèn orf70
- SEQ ID NO.: 11 đoạn môi PCR axit nucleic trình tự nhân tạo 1007 cho vùng gắn chèn orf1/3
- SEQ ID NO.: 12 đoạn môi PCR axit nucleic trình tự nhân tạo 1008 cho vùng gắn chèn orf1/3
- SEQ ID NO.: 13 vùng gắn sườn trái (Up70) (417 bp)
- SEQ ID NO.: 14 vùng gắn sườn phải (Up71) (431 bp)
- SEQ ID NO.: 15 vùng gắn sườn trái (up orf70) ở chủng EHV-1 kiểu đại ab4 (mã số truy cập Genbank AY665713.1), được nằm ở các nucleotit 127264 – 127680
- SEQ ID NO.: 16 vùng gắn sườn phải (up orf71) trong chủng EHV-1 kiểu đại ab4 (mã số truy cập Genbank AY665713.1), được nằm ở các nucleotit 128484 – 128913
- SEQ ID NO.: 17 vùng gắn sườn bị cắt trong hệ RED: vùng gắn sườn trái (Up70) (283 bp) = giống với 283 bp đầu 3' của vùng gắn sườn “cổ điển” 417 bp
- SEQ ID NO.: 18 vùng gắn sườn bị cắt trong hệ RED: vùng gắn sườn phải (Up71) (144 bp) = giống với 144 bp đầu 5' của vùng gắn sườn “cổ điển” 431 bp
- SEQ ID NO.: 19 Phần bị xóa trong trình tự hệ gen ab4 kiểu đại (mã số truy cập Genbank AY665713.1), nt 127681 - 128482
- SEQ ID NO.: 20 Phần bị xóa trong trình tự hệ gen RacH (không có số nt do trình tự hệ gen hoàn chỉnh không được thể hiện)

Trình tự plasmit/vector:

- SEQ ID NO.: 21 Trình tự nucleotit của plasmit chuyển pU-mC70-BGH

- SEQ ID NO.: 22 Trình tự nucleotit của vector chuyển pU70-p455-71K71
- SEQ ID NO.: 23 Trình tự nucleotit của plasmit chuyển pU70-p455-H3-71K71
- SEQ ID NO.: 24 Trình tự nucleotit của vector chuyển pU-1-3-p430-BGHKBGH
- SEQ ID NO.: 25 Trình tự nucleotit của plasmit chuyển pU1-3-p430-H1av-BGHKBGH

Trình tự hemagglutinin

SEQ ID NO.:26 hemagglutinin [virut cúm A (A/swine/Italy/116114/2010(H1N2))]

GenBank: ADR01746.1 H1pdm

SEQ ID NO.:27 hemagglutinin [virut cúm A (A/swine/Italy/7680/2001(H3N2))]

GenBank: ABS50302.2 H3:

SEQ ID NO.:28 hemagglutinin [virut cúm A (A/swine/Gent/132/2005(H1N1))]

GenBank: AFR76623.1 H1av:

SEQ ID NO.:29 hemagglutinin [virut cúm A (A/swine/Italy/4675/2003(H1N2))]

GenBank: ADK98476.1* H1hu

*Xin lưu ý rằng axit amin 531 (X, codon kết thúc, được thay đổi bởi các tác giả thành I):

Các trình tự cấu trúc SBV

SEQ ID NO.:30 trình tự tác nhân liên kết GS

SEQ ID NO.: 31 Trình tự ADN tổng hợp chứa các vị trí giới hạn để tách dòng phụ

SEQ ID NO.:32 mảnh ADN được sử dụng để tái tổ hợp RED để tạo ra pRacH-SE-70-455-SBVGc

SEQ ID NO.:33 đoạn mồi up70 F

SEQ ID NO.:34 đoạn mồi up71 R

SEQ ID NO.:35 đoạn mồi seq455-F1

SEQ ID NO.:36 đoạn mồi SBV Gc F1

SEQ ID NO.:37 đoạn mỗi SBV Gc R1

Ví dụ thực hiện sáng chế

Phần ví dụ tiếp sau đây được bao gồm để chứng minh các phương án ưu tiên của sáng chế. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ hiểu rằng, các kỹ thuật bộc lộ trong phần ví dụ tiếp theo dưới đây đại diện cho các kỹ thuật được phát hiện bởi các tác giả sáng chế để thực hiện tốt trong thực hành sáng chế và do đó, có thể được xem là cấu thành phương thức ưu tiên trong thực hành sáng chế. Tuy nhiên, với sự bộc lộ này, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ hiểu rằng, nhiều thay đổi có thể được thực hiện trong các phương án cụ thể mà chúng được bộc lộ và vẫn thu được kết quả tương tự hoặc giống hệt mà không trệch khỏi tinh thần và phạm vi bảo hộ của sáng chế.

VÍ DỤ 1: Tạo ra vị trí gắn chèn mới orf70

Để tăng cường khả năng của vector EHV-1, các tác giả sáng chế đã nỗ lực tìm ra cách để biểu hiện hai gen chuyển khác nhau từ một khung vector mà không ghép cặp hai gen chuyển này bằng các chức năng có nguồn gốc từ ARN-virut dưới sự kiểm soát của một vùng khởi đầu. Các tác giả sáng chế đã giả thiết rằng hệ gen của virut herpes có thể chịu được việc sử dụng song song hai vị trí gắn chèn gen chuyển độc lập. Để xác định EHV-1 ORF70 có phải là vị trí gắn chèn gen chuyển thích hợp hay không, 801 cặp bazơ của đầu 5' của orf70 (1236 bp) được thay thế bằng catxet biểu hiện mã hóa cho protein mCherry tự phát huỳnh quang (Shaner et al. 2004) bằng cách tái tổ hợp tương đồng cổ điển (Fig.2). Bản đồ của plasmit pU-mC70-BGH được thể hiện trên Fig.3 (SEQ ID NO.21) Mảnh ADN được sử dụng để tái tổ hợp tương đồng được cắt từ pU-mC70-BGH bằng XbaI. Mảnh được tinh chế bằng gel được chuyển nhiễm đồng thời bằng ADN hệ gen virut của EHV-1 RacH vào trong các tế bào RK13. Việc giải phóng có hiệu quả vector virut tái tổ hợp và sao chép có hiệu quả trong tế bào được nuôi cấy được thể hiện bằng mức phát huỳnh quang sống và xác định nồng độ virut chuẩn (không được thể hiện). Việc xóa hai phần ba orf70 có lợi ích bổ sung là sự biểu hiện của glycoprotein G được mã hóa bởi orf70 được loại bỏ. Glycoprotein G của EHV-1 đã thể hiện là chemokin được tiết không có cấu trúc gắn kết protein làm mất tác dụng đáp ứng miễn dịch của vật chủ (Drummer et al., 1998; Bryant et al.,

2003). Do vaccin vector được dự định để kích thích đáp ứng miễn dịch của đối tượng được chủng ngừa bằng vaccin, việc loại bỏ chức năng ức chế miễn dịch cụ thể này của vector virus có thể cải thiện thêm hiệu lực của nền vector virus EHV-1 RacH-SE.

VÍ DỤ 2: Sử dụng vị trí gắn chèn ORF70 mới với vùng khởi đầu p455 trong vaccin vector EHV-1 tái tổ hợp và tạo cấu trúc virus tái tổ hợp

Vùng khởi đầu p455:

Đối với thử nghiệm thứ nhất trên động vật, hemagglutinin virus cúm kiểu phụ H3 từ virus cúm A có nguồn gốc từ lợn (A/swine/Italy/7680/2001(H3N2), số truy cập GenBank: ABS50302.2) được sử dụng. Trình tự mã hóa của nó được tổng hợp và tách dòng phụ trong vector chuyển pU70-p455-71K71 (Fig.4, SEQ ID NO. 22) tạo ra plasmid chuyển pU70-p455-H3-71K71, đặt H3 dưới sự kiểm soát của vùng khởi đầu p455 mới và tín hiệu polyadenyl hóa 71pA mới và đóng khung catxet bằng các vùng tái tổ hợp để gắn chèn vào trong orf70 (Fig.5, SEQ ID NO. 23).

Bằng cách gây đột biến en-passant sử dụng hệ thống tái tổ hợp RED (Tischer et al. 2006) catxet biểu hiện p455-H3-71 được gắn chèn trong orf70 của pRacH-SE để tạo ra pRacH-SE70-p455-H3 (Fig.6).

Tế bào PK/WRL được chuyển nhiễm với pRacH-SE70-p455-H3, virus tái tổ hợp rEHV-1 RacH-SE70-p455-H3 được giải phóng và được tinh chế vết tan hai lần. Việc gắn chèn chính xác catxet biểu hiện được xác nhận bằng cách giải trình tự sản phẩm PCR độ trung thực cao của vùng gắn chèn. Việc biểu hiện của gen chuyển trong tế bào bị nhiễm được phân tích bằng thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang gián tiếp (IFA, Fig.7).

Việc khôi phục orf71 mã hóa EHV-1 gpII được khẳng định bằng IFA (không được thể hiện) và thẩm tách Western (Fig.8) sử dụng kháng thể đơn dòng Ai2G7 (thuộc sở hữu của BI). Việc xuất hiện các trime của H3 trên màng sinh chất của tế bào bị nhiễm được thử nghiệm bằng thử nghiệm hấp phụ hồng cầu lên tế bào (hemadsorption) sử dụng tế bào hồng cầu gà (không được thể hiện). Độ chuẩn cực đại được xác định là TCID₅₀/ml trong các tế bào PK/WRL là trong khoảng giống như độ chuẩn của virus rEHV-1 RacH-SE ban đầu, điều này chỉ ra rằng việc biểu hiện gen

chuyển không gây ảnh hưởng bất lợi cho sự sao chép của virus (không được thể hiện). Điều này được khẳng định bằng cách cấy chuyển rEHV-1 RacH-SE70-p455-H3 trong các tế bào PK/WRL sang tới lần cấy chuyển 20 (P20) sau khi giải phóng. Ở lần cấy chuyển P5, P10, P15, và P20 virus được mô tả đặc điểm bằng cách xác định nồng độ chuẩn, giải trình tự, và thẩm tách Western (Fig.8), ở P10 và P20 bổ sung bằng IFA, và sự biểu hiện HA và độ ổn định di truyền của đoạn gắn chèn mã hóa HA cùng với vùng khởi đầu và trình tự polyA được khẳng định.

Hai điểm được thể hiện trên Fig.8 là các sản phẩm sao chép được ủ với kháng thể đơn dòng Ai2G7 (trái) mà phát hiện một cách đặc hiệu glycoprotein EHV-1 II (gpII) hoặc với kháng thể đa dòng thương mại từ thỏ (PA5-34930) tạo ra kháng hemagglutinin virus cúm có kiểu phụ H3 (phải). gpII được phát hiện ở tất cả các giống nuôi cấy tế bào bị nhiễm EHV-1 tái tổ hợp như dự kiến. H3 có chiều dài đầy đủ được phát hiện trong tất cả các tế bào bị nhiễm bởi các lần cấy chuyển khác nhau của rEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3 như dự kiến. Tính đặc hiệu của kháng huyết thanh H3 được thể hiện trong cùng thử nghiệm thẩm tách Western, xem dòng gG430mC. Ở đây chỉ có gpII mAb tạo ra phản ứng, như mong đợi, trong khi kháng thể kháng H3 không gắn kết trong làn bản sao tương ứng.

Bằng thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang kép (dIFA) vết tan virus trong tế bào bị nhiễm P20 bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng kháng H3 và kháng huyết thanh ngựa kháng EHV, đã khẳng định được rằng hầu như toàn bộ các vết tan được cảm ứng EHV-1 cũng biểu hiện H3 (không được thể hiện). Tất cả các thử nghiệm đã khẳng định độ ổn định của EHV-1 RacH-SE-70-p455-H3 tái tổ hợp.

VÍ DỤ 3: Kiểm chứng khái niệm nghiên cứu trên động vật (POC I) bằng cách sử dụng vị trí gắn chèn ORF70 mới và đánh giá đáp ứng huyết thanh:

Động vật thử nghiệm: Tiêu chuẩn lựa chọn và thiết kế thí nghiệm:

Năm nhóm gồm mười lợn con được sinh ra từ lợn mẹ chưa từng bị nhiễm cúm A được bao gồm trong thử nghiệm POC-I như được tổng kết trong bảng 2.

Bảng 2

Nhóm	Điều trị bằng vaccin	Số con vật	Đường dùng	Liều
1	1x NaCl; 1x vaccin vectơ EHV1	10	trong cơ	2 ml NaCl; 2 ml EHV1, $1,00 \times 10^7$ TCID ₅₀
2	2x vaccin vectơ EHV1	10	trong cơ	2x 2 ml EHV1, $1,00 \times 10^7$ TCID ₅₀
3	2x NaCl	10	trong cơ	2x 2 ml NaCl
4	2x vaccin bất hoạt	10	trong cơ	2x 2 ml IDT
5	2x NaCl	10	trong cơ	2x 2 ml NaCl
Nhóm	Điều trị thử thách	Số con vật	Đường dùng	Liều
1	VIRUT CÚM A H3N2 TỪ LỢN	10	Trong khí quản	8 ml; $1,00 \times 10^7$ TCID ₅₀ /ml
2	VIRUT CÚM A H3N2 TỪ LỢN	10	Trong khí quản	8 ml; $1,00 \times 10^7$ TCID ₅₀ /ml
3	VIRUT CÚM A H3N2 TỪ LỢN	10	Trong khí quản	8 ml; $1,00 \times 10^7$ TCID ₅₀ /ml
4	VIRUT CÚM A H3N2 TỪ LỢN	10	Trong khí quản	8 ml; $1,00 \times 10^7$ TCID ₅₀ /ml
5	Môi trường nuôi cấy tế bào (đối chứng âm tính)	10	Trong khí quản	8 ml

Liều gây nhiễm là 1×10^7 TCID₅₀ của rEHV-1 RacH-70-p455-H3 (EHV-1) được dùng một lần lúc năm tuần tuổi hoặc hai lần lúc hai và năm tuần tuổi. Để so sánh, vaccin bất hoạt có bán trên thị trường được dùng hai lần lúc hai và năm tuần tuổi. Tất cả các lợn con không có kháng thể có nguồn gốc từ mẹ để không loại trừ tác dụng của vaccin bất hoạt (Inact). Hai nhóm không được chủng ngừa nhưng được tiêm dung dịch natri clorua sinh lý (NaCl) để dùng lần lượt làm đối chứng thử thách hoặc đối chứng âm tuyệt đối. 21 ngày sau khi chủng ngừa lần hai tất cả các nhóm ngoại trừ nhóm đối chứng âm tuyệt đối được thử thách bằng 1×10^7 TCID₅₀ của các chủng cúm A khác loại (IVA) (cúm A H3N2 từ lợn R452-14, thể phân lập thử thách do BI sở hữu). Trong khi nhóm đối chứng thử thách không được chủng ngừa (Chall ctrl) tất cả các con lợn có độ chuẩn virus cúm cao trong phổi vào một và ba ngày sau khi thử

thách lây nhiễm, tất cả các con lợn trong nhóm đối chứng âm tuyệt đối (neg ctrl) và nhóm được chủng ngừa hai lần (EHV 2x) bằng rEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3 đều là âm tính đối với IAV ở cả hai ngày. Trong nhóm được chủng ngừa hai lần bằng vaccin đối chứng bất hoạt (Inact 2x), một trong năm con vật có độ chuẩn IVA thấp vào ngày thứ ba sau khi thử thách. Trong nhóm được chủng ngừa một lần (EHV 1x) vào 21 ngày trước khi thử thách bằng rEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3, hai trong năm con vật có độ chuẩn IVA thấp trong phổi lúc một ngày sau khi thử thách lây nhiễm và một trong năm con vật lúc ba ngày sau khi thử thách. (Fig.9).

Hai lần chủng ngừa bằng 1×10^7 TCID₅₀ của rEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3 bảo vệ lợn một cách hoàn toàn chống lại thử thách lây nhiễm bằng IVA khác loại, kiểu phụ H3N2. Đã chứng minh được rằng vector EHV-1 RacH-SE là thích hợp để chủng ngừa cho lợn và vùng khởi đầu mới p455 có chức năng điều khiển sự biểu hiện sinh miễn dịch của hemagglutinin IVA ở lợn được chủng ngừa.

VÍ DỤ 4: Sử dụng vùng khởi đầu p430 mới trong vaccin vector EHV-1 tái tổ hợp và tạo cấu trúc virus tái tổ hợp

Vùng khởi đầu p430:

Vùng khởi đầu p430 mới được xác định được sử dụng để điều khiển sự biểu hiện của hemagglutinin virus cúm khác từ virus H1N1 ((A/swine/Gent/132/2005(H1N1), số truy cập GenBank: AFR76623.1). Do gen hemagglutinin trong thể phân lập virus này là có nguồn gốc từ IAV chim nên nó được gọi là H1av. H1av được tổng hợp và tách dòng phụ trong vector chuyển đổi với vùng gắn chèn orf1/3 (Fig.10, SEQ ID NO. 24) để tạo ra pU1/3-p430-H1av-BGH_K_BGH (Fig.11, SEQ ID NO. 25). Việc biểu hiện của H1av được đặt dưới sự kiểm soát của vùng khởi đầu p430 và tín hiệu polyA hormon tăng trưởng bò (BGH).

Bằng cách gây đột biến en-passant bằng cách sử dụng hệ thống tái tổ hợp RED (Tischer et al. 2006) catxet biểu hiện p430-H1av-BGH được gắn chèn trong orf1/3 của pRacH-SE để tạo ra pRacH-SE1/3-p430-H1av (Fig.12).

Tế bào PK/WRL được chuyển nhiễm với pRacH-SE1/3-p430-H1av, virus tái tổ hợp rEHV-1 RacH-SE1/3-p430-H1av được giải phóng và được tinh chế vết tan hai

lần. Việc gắn chèn chính xác catxet biểu hiện được xác nhận bằng cách giải trình tự sản phẩm PCR độ trung thực cao của vùng gắn chèn. Việc biểu hiện của gen chuyển trong tế bào bị nhiễm được phân tích bằng thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang gián tiếp (IFA) và thẩm tách Western bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng và đa dòng có bán trên thị trường (Fig.13).

Việc khôi phục orf71 mã hóa EHV-1 gpII được xác nhận bằng IFA và thẩm tách Western bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng Ai2G7 (do BI sở hữu), (không được thể hiện). Việc xử lý chính xác và vận chuyển H1av và định vị trong màng sinh chất của tế bào bị nhiễm được thử nghiệm bằng thử nghiệm hấp phụ hồng cầu lên tế bào bằng cách sử dụng hồng cầu gà (không được thể hiện). Độ chuẩn cực đại được xác định là TCID₅₀/ml ở các tế bào PK/WRL là trong khoảng giống như độ chuẩn của virus RacH-SE ban đầu, điều này chỉ ra rằng việc biểu hiện gen chuyển không gây ảnh hưởng bất lợi cho sự sao chép của virus (không được thể hiện).

Việc phát hiện đặc hiệu sự di chuyển dải rộng ở 75 kDa bằng kháng thể PA-34929 là phù hợp với sự xuất hiện được mong đợi của glycoprotein HA tái tổ hợp như được dự đoán từ trình tự của nó. Việc nhuộm biểu kiến màng tế bào bằng kháng thể đơn dòng C102 là phù hợp với việc định vị dưới mức tế bào như mong đợi (Fig.13).

Để kiểm tra liệu hemagglutinin tái tổ hợp được biểu hiện có được xử lý và vận chuyển như mong đợi hay không, các tế bào VERO được cho nhiễm rEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1av, rEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3, rEHV-1 RacH-SE (ban đầu) ở mức m.o.i. bằng 0,01, hoặc không để bị nhiễm. 24 giờ sau khi nhiễm (p.i.), tế bào bị nhiễm và không bị nhiễm sống sót được ủ với thể huyền phù của hồng cầu gà trong PBS, được rửa bằng PBS và được nhuộm bằng thuốc nhuộm nhân Hoechst 33342 huỳnh quang. Do hồng cầu của gia cầm chứa nhân tế bào nên chúng có thể được nhuộm bằng Hoechst33342 và xuất hiện như những đốm nhỏ màu xanh bằng hiển vi huỳnh quang, so sánh với các tế bào bị nhiễm rEHV-1 RacH-SE mà không biểu hiện hemagglutinin, việc hấp phụ của hồng cầu gà tăng lên đáng kể trên các tế bào bị nhiễm rEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1av hoặc rEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3 (không được thể hiện). Từ đó có thể kết luận rằng hemagglutinin được dịch mã, xử

lý và vận chuyển đến màng sinh chất của tế bào bị nhiễm virus vectơ theo cách như thể chúng được tạo ra bởi nhiễm virus cúm đích thực.

Kiểu hình rõ ràng của việc hấp phụ hồng cầu lên tế bào của tế bào bị nhiễm hỗ trợ cho việc phát hiện của các thử nghiệm thẩm tách Westerns và miễn dịch huỳnh quang thể hiện sự biểu hiện hiệu quả của protein chuyển gen và gợi ý sự hình thành trimer HA chức năng trên bề mặt tế bào của tế bào bị nhiễm vectơ EHV-1.

VÍ DỤ 5: Sử dụng song song vị trí gắn chèn ORF70 mới và vị trí gắn chèn ORF1/3 trong vacxin vectơ EHV-1 tái tổ hợp

Để thể hiện rằng hai vùng khởi đầu mới này có thể được sử dụng song song, EHV-1 RacH tái tổ hợp được tạo ra biểu hiện hai hemagglutinin khác nhau của hai kiểu phụ virus cúm A khác nhau.

Tính đặc hiệu và thiếu khả năng phản ứng chéo của kháng thể đa dòng thương mại với H3 (PA5-34930) và H1 (PA5-34929) được xác nhận bằng thử nghiệm thẩm tách Westerns đối với tế bào bị nhiễm đã nhiễm virus gắn chèn đơn rEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3 và rEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1av (không được thể hiện).

Khung đọc mở mã hóa hemagglutinin của virus cúm A (A/swine/Gent/132/2005(H1N1)) được tổng hợp và tách dòng vào trong vectơ chuyển pU1-3-p430-BGHKBGH (Fig.10) dẫn đến pU1-3-p430-H1av-BGHKBGH (Fig.11). Bắt đầu bằng pRacH-SE-70-p455-H3 BAC tái tổ hợp, catxet biểu hiện p430-H1av-BGH như được lắp ráp trong pU1/3-p430-H1av-BGHKBGH (Fig.11, SEQ ID NO. 25) được gắn chèn vào vị trí gắn chèn orf1/3 bằng việc tái tổ hợp RED hai bước để tạo ra pRacH-SE-1/3-p430-H1av-70-p455-H3. Các tế bào PK/WRL được chuyển nhiễm với pRacH-SE1/3-p430-H1av-70-p455-H3, và virus tái tổ hợp rEHV-1 RacH-SE1/3-p430-H1av-70-p455-H3 được giải phóng và được tinh chế vết tan hai lần (Fig.12).

Tên gọi ngắn của virus tái tổ hợp này là rEHV-1 RacH-SE_B. Việc gắn chèn chính xác catxet biểu hiện được xác nhận bằng cách giải trình tự sản phẩm PCR độ trung thực cao của các vùng gắn chèn cùng với các trình tự gắn sườn. Việc biểu hiện của gen chuyển trong tế bào bị nhiễm được phân tích bằng thử nghiệm miễn dịch

huỳnh quang gián tiếp (IFA, không được thể hiện) và thử nghiệm thẩm tách Western bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng và đa dòng có bán trên thị trường (Fig.13). Việc khôi phục orf71 mã hóa EHV-1 gpII được khẳng định bằng IFA (không được thể hiện) và thẩm tách Western bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng Ai2G7 (sở hữu của BI), (Fig.13).

Như được thể hiện trên Fig.13 cả hai gen chuyển H3 và H1av được biểu hiện song song trong giống nuôi cấy tế bào bị nhiễm rEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1av-70-p455-H3 (B) tái tổ hợp gắn chèn kép. Việc biểu hiện của gen chuyển là ổn định và không làm suy giảm độ chuẩn của virus được thử nghiệm cho đến lần cấy chuyển 11 trong tế bào PK/WRL (không được thể hiện).

Hai vùng khởi đầu mới p430 và p455 được thể hiện là có chức năng trong phạm vi sao chép rEHV1-RacH trong nuôi cấy tế bào. Mức hoạt tính trong chu kỳ sao chép của virus thể hiện là rất giống với mức hoạt tính được suy ra từ thử nghiệm động học vùng khởi đầu in vitro. Các đặc điểm này cho phép tạo ra vacxin vectơ tái tổ hợp trên cơ sở EHV-1 RacH hoặc các nền vectơ khác biểu hiện song song hai kháng nguyên khác nhau với hiệu quả tương đương. Nếu đích vacxin gồm có hai tác nhân gây bệnh khác nhau thì việc áp dụng hai vùng khởi đầu mới trong hai vị trí gắn chèn được kết hợp với hai trình tự polyadenyl hóa có thể làm giảm đáng kể chi phí hàng hóa và có ưu điểm rõ ràng so với vectơ chỉ biểu hiện một thành phần kháng nguyên.

VÍ DỤ 6: Tạo ra, mô tả đặc điểm in vitro và thử nghiệm in vivo vacxin virus cúm A được tạo vectơ EHV-1 đơn giá (vacxin H3) cho lợn

Hemagglutinin virus cúm IAV lợn có kiểu huyết thanh H3 (SEQ ID NO. 27) (A/swine/Italy/7680/2001(H3N2), số truy cập GenBank: ABS50302.2) được chọn làm kháng nguyên để thử nghiệm cho nghiên cứu chủng ngừa ở lợn. Vacxin mới kháng IAV lợn này có đặc điểm DIVA, ví dụ bằng cách phát hiện kháng thể kháng protein NP hoặc NA của IAV lợn ở động vật bị nhiễm chủng thực địa IAV lợn nhưng không ở động vật chỉ được chủng ngừa bằng vacxin được mô tả ở đây do nó chỉ biểu hiện một protein HA của IAV lợn. Trình tự mã hóa của nó được tổng hợp và tách dòng phụ tạo ra vectơ chuyển pU70-p455-H3-71K71, đặt H3 dưới sự kiểm soát của

vùng khởi đầu p455 mới và tín hiệu polyadenyl hóa 71pA mới và đóng khung catxet bằng các vùng tái tổ hợp để gắn chèn vào trong orf70 (Fig.2).

Bằng cách gây đột biến *en-passant* sử dụng hệ thống tái tổ hợp RED, catxet biểu hiện p455-H3-71 được gắn chèn trong orf70 của pRacH-SE để tạo ra pRacH-SE70-p455-H3 (Fig.6).

Tế bào PK/WRL được chuyển nhiễm với pRacH-SE70-p455-H3, virus tái tổ hợp rEHV-1 RacH-SE70-p455-H3 được giải phóng và được tinh chế vết tan hai lần.

Việc gắn chèn chính xác catxet biểu hiện được xác nhận bằng cách giải trình tự sản phẩm PCR độ trung thực cao của vùng gắn chèn. Việc biểu hiện của gen chuyển trong tế bào bị nhiễm được phân tích bằng thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang gián tiếp (IFA, Fig.7) và thấm tách Western (Fig.8) bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng và đa dòng có bán trên thị trường.

Việc khôi phục orf71 mã hóa EHV-1 gpII được khẳng định bằng IFA (không được thể hiện) và thấm tách Western (Fig.8) sử dụng kháng thể đơn dòng Ai2G7 (thuộc sở hữu của BI). Việc xuất hiện các trime của H3 trên màng sinh chất của tế bào bị nhiễm được thử nghiệm bằng thử nghiệm hấp phụ hồng cầu lên tế bào sử dụng tế bào hồng cầu gà (không được thể hiện). Độ chuẩn cực đại được xác định là TCID₅₀/ml trong các tế bào PK/WRL là trong khoảng giống như độ chuẩn của virus RacH-SE ban đầu, điều này chỉ ra rằng việc biểu hiện gen chuyển không gây ảnh hưởng bất lợi cho sự sao chép của virus (không được thể hiện). Điều này được khẳng định bằng cách cấy chuyển rEHV-1 RacH-SE70-p455-H3 trong các tế bào PK/WRL sang tới lần cấy chuyển 20 (P20) sau khi giải phóng. Ở lần cấy chuyển P5, P10, P15, và P20 virus được mô tả đặc điểm bằng cách xác định nồng độ chuẩn, giải trình tự, và thấm tách Western (Fig.8), ở P10 và P20 bổ sung bằng IFA, và sự biểu hiện HA và độ ổn định di truyền của đoạn gắn chèn mã hóa HA cùng với vùng khởi đầu và trình tự polyA được khẳng định.

Hai điểm được thể hiện trên Fig.9 là các sản phẩm sao chép được ủ với kháng thể đơn dòng Ai2G7 (trái) mà phát hiện một cách đặc hiệu glycoprotein EHV-1 II (gpII) hoặc với kháng thể đa dòng thương mại từ thỏ (PA5-34930) tạo ra kháng hemagglutinin virus cúm có kiểu phụ H3 (phải). gpII được phát hiện ở tất cả các giống

nuôi cấy tế bào bị nhiễm EHV-1 tái tổ hợp như trong đơi. H3 có chiều dài đầy đủ được phát hiện trong tất cả các tế bào bị nhiễm với các lần cấy chuyển khác nhau của rEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3 như trong đơi. Tính đặc hiệu của kháng huyết thanh H3 cũng được thể hiện bằng thử nghiệm thấm tách Westerns đối với các tế bào bị nhiễm RacH SE EHV-1 tái tổ hợp khác biểu hiện hemagglutinin virut cúm từ virut kiểu phụ H1, xem dưới đây, Fig.15.

Bằng thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang kép (dIFA) vết tan virut trong tế bào bị nhiễm P20 bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng kháng H3 và kháng huyết thanh ngựa kháng EHV, đã khẳng định được rằng hầu như toàn bộ các vết tan được cảm ứng EHV-1 cũng biểu hiện H3 (không được thể hiện). Tất cả các thử nghiệm đã khẳng định độ ổn định của EHV-1 RacH-SE-70-p455-H3 tái tổ hợp.

Để kiểm tra đặc tính của nó để làm vaccin được tạo vectơ ở lợn con, rEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3 được thử nghiệm trong nghiên cứu thử thách chủng ngừa. Cụ thể, lợn con không có tính miễn dịch kháng IAV lợn mà có nguồn gốc từ mẹ (không có kháng thể từ mẹ) được chủng ngừa hai lần bằng dịch nổi giống nuôi cấy tế bào chứa RacH-SE-70-p455-H3 ở liều là 1×10^7 TCID₅₀ trong cơ ở độ tuổi hai và năm tuần (chủng ngừa hai mũi, 2x EHV-1), hoặc chỉ ở độ tuổi năm tuần tuổi (chủng ngừa một mũi, 1x EHV-1). Nhóm không được chủng ngừa được sử dụng làm đối chứng âm và nhóm động vật được chủng ngừa lúc hai và năm tuần tuổi bằng vaccin IAV lợn vô hoạt có bán trên thị trường theo hướng dẫn của nhà sản xuất (nhưng trong các thời điểm chủng ngừa) được sử dụng làm đối chứng dương (vaccin chết). Lúc 8 tuần tuổi, tất cả các động vật ngoài đối chứng âm được thử thách bằng liều được sử dụng trong khí quản là 1×10^7 TCID₅₀ của chủng thử thách IAV lợn H3N2 (thể phân lập virut thực địa châu Âu R452-14 mà H3 của nó khác loại với kháng nguyên vaccin H3 được sử dụng trong RacH-SE-70-p455-H3). Các động vật không được chủng ngừa và không thử thách được sử dụng làm đối chứng âm, trong khi các động vật không được chủng ngừa nhưng được thử thách được sử dụng làm đối chứng thử thách. Tại thời điểm và sau khi chủng ngừa và trước và sau khi thử thách, thân nhiệt được đo và mẫu máu được lấy tại các thời điểm khác nhau. Một ngày sau khi thử thách, một nửa số động vật mỗi nhóm bị giết và phổi được tính điểm theo mức độ tổn thương thường thấy đối với bệnh nhiễm IAV lợn, ba mẫu phổi tương ứng từ mỗi phổi trái và phải

được lấy từ mỗi con vật để xác định độ chuẩn IAV lợn lây nhiễm trong chất đồng nhất phổi, và dịch rửa phế quản phế nang (bronchioalveolar lavage fluid - BALF) được lấy mẫu. Quy trình tương tự được thực hiện với nửa số con vật còn lại trong mỗi nhóm ba ngày sau khi thử thách.

Khi khảo sát sự tăng thân nhiệt sau khi áp dụng virus thử thách IAV lợn, các con vật không được chủng ngừa thể hiện thân nhiệt tăng khoảng 1°C 1 ngày sau khi thử thách. Sự tăng thân nhiệt 1 ngày sau khi thử thách này được ngăn chặn đối với nhóm được chủng ngừa hai lần bằng vaccin RacH-SE-70-p455-H3 (Fig.16).

Việc đánh giá điểm số phổi từ các con vật bị giết vào 1 hoặc 3 ngày sau khi áp dụng thử thách virus IAV lợn cho thấy rằng đối chứng âm thể hiện không có tổn thương phổi điển hình cho bệnh nhiễm IAV lợn, đối chứng thử thách thể hiện tổn thương phổi trong khoảng trung bình là 6-7%, và thấy rằng liên quan đến các giá trị trung bình nhóm, điểm số tổn thương phổi được giảm mạnh xuống còn một đến nhỏ hơn 4% đối với nhóm được chủng ngừa hai lần bằng vaccin RacH-SE-70-p455-H3 (Fig.17).

Độ chuẩn IAV lợn trong phổi trung bình từ các con vật bị giết lúc 1 hoặc 3 ngày sau khi áp dụng virus thử thách IAV lợn đã cho thấy rằng đối chứng âm thể hiện không có IAV lợn trong các mẫu phổi, trong khi đó đối chứng thử thách thể hiện độ chuẩn virus trong mỗi gam mô phổi trong khoảng lớn hơn 5 (ngày 3) đến lớn 7 logs (ngày 1). Ngược lại hoàn toàn, giá trị trung bình nhóm giảm mạnh đến khoảng hai logs hoặc nhỏ hơn đối với nhóm được chủng ngừa một lần bằng vaccin RacH-SE-70-p455-H3 và giảm đến mức không phát hiện được đối với nhóm được chủng ngừa hai lần bằng vaccin RacH-SE-70-p455-H3 (Fig.9).

Khi thử nghiệm việc cảm ứng kháng thể trung hòa IAV lợn sau khi chủng ngừa, huyết thanh từ động vật được chủng ngừa một lần bằng vaccin RacH-SE-70-p455-H3 đã thể hiện độ chuẩn trung hòa nghịch đảo trong khoảng 160 ba tuần sau lần chủng ngừa thứ nhất và huyết thanh từ động vật được chủng ngừa hai lần bằng vaccin RacH-SE-70-p455-H3 đã thể hiện độ chuẩn trung hòa là khoảng 2560 ba tuần sau khi chủng ngừa lần hai, trong khi huyết thanh từ các nhóm không được chủng ngừa có mức kháng thể trung hòa IAV lợn không phát hiện được (Fig.18).

Khi xác định lượng xytokin tiền viêm IL-1 β trong BALF từ các động vật vào 1 hoặc 3 ngày sau khi thử thách IAV lợn, mức IL-1 β lớn hơn 100 pg/ml đến 900 pg/ml được phát hiện thấy ở ba trong bốn động vật thử nghiệm vào ngày 1, trong khi đó các mức này được giảm xuống 100-300 pg/ml IL-1 β đối với BALF từ động vật được chủng ngừa một lần bằng vaccin RacH-SE-70-p455-H3 và thậm chí còn giảm thêm xuống mức bằng 0 đến nhỏ hơn 100 pg/ml IL-1 β đối với tất cả các động vật được chủng ngừa hai lần bằng vaccin RacH-SE-70-p455-H3 (Fig.19). Điều này cho thấy rằng việc chủng ngừa bằng vaccin RacH-SE-70-p455-H3 đã ngăn chặn hữu hiệu việc cảm ứng xytokin tiền viêm IL-1 β sau khi nhiễm IAV lợn.

Khi thử nghiệm việc kích thích lại tế bào máu đơn nhân ngoại vi (PBMC) được lấy mẫu vào ngày nghiên cứu thứ 28 và sử dụng các tác nhân kích thích khác nhau, việc kích thích PBMC từ động vật không được chủng ngừa cho thấy số lượng nhỏ hơn $75/1 \times 10^6$ trong IFN γ -ELISpot không phụ thuộc vào kích thích được sử dụng (Fig.20 A). PBMC của các động vật được nhận vaccin bất hoạt hai lần (vaccin chết) đã thể hiện số lượng khoảng $150/1 \times 10^6$ khi chúng được kích thích lại bằng nucleoprotein NP IAV lợn tái tổ hợp và số lượng khoảng $3000/1 \times 10^6$ trong IFN γ -ELISpot khi chúng được kích thích lại bằng chủng thử thách IAV lợn H3N2 R452-14, nhưng thể hiện không kích thích lại PBMC (mức số lượng $75/1 \times 10^6$ hoặc thấp hơn) khi HA IAV lợn tái tổ hợp hoặc virus EHV-1 được sử dụng (Fig.20 B). Ngược lại, động vật được chủng ngừa một lần hoặc hai lần bằng vaccin RacH-SE-70-p455-H3 cũng thể hiện số lượng khoảng 200 (1x EHV-1) đến 300 (2x EHV-1)/ 1×10^6 trong IFN γ -ELISpot khi chúng được kích thích lại bằng chủng thử thách IAV lợn H3N2 R452-14, nhưng không kích thích lại PBMC (mức số lượng là $75/1 \times 10^6$ hoặc thấp hơn) khi NP IAV lợn tái tổ hợp được sử dụng (Fig.20 C và D). Khi virus EHV-1 được sử dụng để kích thích lại, động vật được chủng ngừa một lần hoặc hai lần bằng vaccin RacH-SE-70-p455-H3 đã thể hiện số lượng khoảng $300/1 \times 10^6$ trong IFN γ -ELISpot khi chúng được kích thích lại bằng vaccin EHV-1 trống RacH-SE, và giá trị này còn được tăng đến số lượng lớn hơn $400/1 \times 10^6$ khi vaccin RacH-SE-70-p455-H3 biểu hiện H3 IAV lợn được sử dụng, tương ứng (Fig.20 C và D). Do đó, khi HA IAV lợn tái tổ hợp được sử dụng để kích thích lại, chỉ có động vật được chủng ngừa một lần hoặc hai lần bằng vaccin RacH-SE-70-p455-H3 thể hiện số lượng

khoảng 100-150 (1xEHV-1) đến 150-200 (2x EHV-1)/ 1×10^6 trong IFN γ -ELISpot (Fig.20 C và D).

VÍ DỤ 7: Tạo ra, mô tả đặc điểm in vitro và thử nghiệm in vivo vaccin virut cúm A được tạo vector EHV-1 tứ giá cho lợn

Như được mô tả dưới đây, trong sáng chế được mô tả, bốn kháng nguyên hemagglutinin (HA) IAV lợn được mô tả ở trên thu được từ kiểu phụ/kiểu huyết thanh IAV gia cầm H1N2, H3N2, H1N1, và IAV lợn đại dịch H1N1 được biểu hiện bởi hai virut vector tái tổ hợp EHV-1. Vaccin tứ giá mới kháng IAV lợn này có đặc điểm DIVA, ví dụ bằng cách phát hiện kháng thể kháng protein NP hoặc NA của IAV lợn ở động vật bị nhiễm chủng thực địa IAV lợn nhưng không ở động vật chỉ được chủng ngừa bằng vaccin được mô tả ở đây do nó chỉ biểu hiện các protein HA của IAV lợn.

Vaccin IAV lợn tứ giá mới được mô tả đặc điểm in vitro và được thử nghiệm in vivo về hiệu quả kháng IAV lợn của nó.

Trình tự khởi đầu p430 mới được xác định được sử dụng để điều khiển sự biểu hiện của H1N1 IAV lợn (A/swine/Gent/132/2005(H1N1), số truy cập GenBank: AFR76623.1). Do gen hemagglutinin trong thể phân lập virut này là có nguồn gốc từ IAV chim nên nó được gọi là H1av. H1av được tổng hợp và tách dòng phụ trong vector chuyển đổi với vùng gắn chèn orf1/3 để tạo ra pU1/3-p430-H1av-BGH_K_BGH. Việc biểu hiện của H1av được đặt dưới sự kiểm soát của trình tự khởi đầu p430 và tín hiệu polyA hormon tăng trưởng bò (BGH) và được đóng khung bằng các vùng tái tổ hợp để gắn chèn vào trong orf1/3 (Fig.11, SEQ ID NO. 25).

Bằng cách gây đột biến *en-passant* sử dụng hệ thống tái tổ hợp RED catxet biểu hiện p430-H1av-BGH được gắn chèn vào trong orf1/3 của pRacH-SE để tạo ra pRacH-SE1/3-p430-H1av Fig.12). Tế bào PK/WRL được chuyển nhiễm với pRacH-SE1/3-p430-H1av, virut tái tổ hợp rEHV-1 RacH-SE1/3-p430-H1av được giải phóng và được tinh chế vết tan hai lần. Việc gắn chèn chính xác catxet biểu hiện được xác nhận bằng cách giải trình tự sản phẩm PCR độ trung thực cao của vùng gắn chèn. Việc biểu hiện của gen chuyển trong tế bào bị nhiễm được phân tích bằng thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang gián tiếp (IFA) và thẩm tách Western bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng và đa dòng có bán trên thị trường (Fig.13). Việc khôi phục orf71

mã hóa EHV-1 gpII được xác nhận bằng IFA và thẩm tách Western bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng Ai2G7 (do BI sở hữu), (không được thể hiện). Việc xử lý chính xác và vận chuyển H1av và định vị trong màng sinh chất của tế bào bị nhiễm được thử nghiệm bằng thử nghiệm hấp phụ hồng cầu lên tế bào bằng cách sử dụng hồng cầu gà (không được thể hiện). Độ chuẩn cực đại được xác định là TCID₅₀/ml ở các tế bào PK/WRL là trong khoảng giống như độ chuẩn của virus RacH-SE ban đầu, điều này chỉ ra rằng việc biểu hiện gen chuyển không gây ảnh hưởng bất lợi cho sự sao chép của virus (không được thể hiện).

Việc phát hiện đặc hiệu sự di chuyển dài rộng ở 75 kDa bằng kháng thể PA-34929 là phù hợp với sự xuất hiện được mong đợi của glycoprotein HA tái tổ hợp như được dự đoán từ trình tự của nó. Việc nhuộm biểu kiến màng tế bào bằng kháng thể đơn dòng C102 là phù hợp với việc định vị dưới mức tế bào như mong đợi.

Để kiểm tra liệu hemagglutinin tái tổ hợp được biểu hiện có được xử lý và vận chuyển như mong đợi hay không, các tế bào VERO được cho nhiễm rEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1av, rEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3, rEHV-1 RacH-SE (ban đầu) ở mức m.o.i. bằng 0,01, hoặc không để bị nhiễm. 24 giờ sau khi nhiễm (p.i.), tế bào bị nhiễm và không bị nhiễm sống sót được ủ với thể huyền phù của hồng cầu gà trong PBS, được rửa bằng PBS và được nhuộm bằng thuốc nhuộm nhân Hoechst 33342 huỳnh quang. Do hồng cầu của gia cầm chứa nhân tế bào nên chúng có thể được nhuộm bằng Hoechst33342 và xuất hiện như những đốm nhỏ màu xanh bằng hiển vi huỳnh quang, so sánh với các tế bào bị nhiễm rEHV-1 RacH-SE mà không biểu hiện hemagglutinin, việc hấp phụ của hồng cầu gà tăng lên đáng kể trên các tế bào bị nhiễm rEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1av hoặc rEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3 (không được thể hiện). Từ đó có thể kết luận rằng hemagglutinin được dịch mã, xử lý và vận chuyển đến màng sinh chất của tế bào bị nhiễm virus vectơ theo cách như thể chúng được tạo ra bằng việc sao chép virus cúm đích thực. Kiểu hình của việc hấp phụ hồng cầu lên tế bào của tế bào bị nhiễm hỗ trợ cho việc phát hiện của thử nghiệm thẩm tách Westerns và thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang (đối với H1av, Fig.13), điều này thể hiện sự biểu hiện hiệu quả của protein chuyển gen và gợi ý sự hình thành trimer HA chức năng trên bề mặt tế bào của tế bào bị nhiễm vectơ EHV-1.

Tính đặc hiệu và thiếu khả năng phản ứng chéo của kháng thể đa dòng thương mại với H3 (PA5-34930) và H1 (PA5-34929) được xác nhận bằng thử nghiệm thấm tách Western đối với tế bào bị nhiễm đã nhiễm virus gắn chèn đơn rEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3 và rEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1av (không được thể hiện).

Tiếp theo, EHV-1 RacH-SE tái tổ hợp được tạo ra biểu hiện hai hemagglutinin khác nhau của hai kiểu phụ/kiểu huyết thanh virus cúm A khác nhau.

Bắt đầu bằng BAC pRacH-SE-70-p455-H3 tái tổ hợp, catxet biểu hiện p430-H1av-BGH khi được lắp ráp trong vector chuyển pU1/3-p430-H1av-BGH_K_BGH (Fig.12) được gắn chèn vào trong vị trí gắn chèn orf1/3 bằng cách tái tổ hợp RED hai bước để tạo ra pRacH-SE-1/3-p430-H1av-70-p455-H3. Các tế bào PK/WRL được chuyển nhiễm với pRacH-SE1/3-p430-H1av-70-p455-H3, và virus tái tổ hợp rEHV-1 RacH-SE1/3-p430-H1av-70-p455-H3 được giải phóng và được tinh chế vết tan hai lần. Tên gọi ngắn của virus tái tổ hợp này là rEHV-1 RacH-SE_B (Fig.14). Việc gắn chèn chính xác catxet biểu hiện được xác nhận bằng cách giải trình tự sản phẩm PCR độ trung thực cao của các vùng gắn chèn cùng với các trình tự gắn sườn.

Việc biểu hiện của gen chuyển trong tế bào bị nhiễm được phân tích bằng thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang gián tiếp (IFA, không được thể hiện) và thử nghiệm thấm tách Western bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng và đa dòng có bán trên thị trường (Fig.15). Việc khôi phục orf71 mã hóa EHV-1 gpII được khẳng định bằng IFA (không được thể hiện) và thấm tách Western bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng Ai2G7 (sở hữu của BI), (Fig.15).

Cả hai gen chuyển H3 và H1av đều được biểu hiện song song trong giống nuôi cấy tế bào bị nhiễm rEHV-1 RacH-SE_B tái tổ hợp gắn chèn kép. Việc biểu hiện của gen chuyển là ổn định và không làm suy giảm độ chuẩn của virus được thử nghiệm cho đến lần cấy chuyển 11 trong tế bào PK/WRL.

Vector EHV-1 được tăng cường với hai vị trí gắn chèn và hai vùng khởi đầu mới đã thể hiện là biểu hiện song song hai hemagglutinin virus cúm. Việc định vị dưới mức tế bào như được xác định bằng IFA và khả năng di động trong SDS-PAGE như được xác định bằng thử nghiệm thấm tách Western tương ứng với hemagglutinin đích thực được biểu hiện ở tế bào bị nhiễm virus cúm A đã biết trong tài liệu.

Tiếp theo, rEHV-1 RacH gắn chèn kép thứ hai biểu hiện các hemagglutinin H1hu, SEQ ID NO.:29, (A/swine/Italy/4675/2003(H1N2); số truy cập GenBank ADK98476.1) và H1pdm, SEQ ID NO.:26, (A/swine/Italy/116114/2010(H1N2); số truy cập GenBank ADR01746.1) được tạo ra.

Trình tự mã hóa của H1hu được tổng hợp và tách dòng phụ trong vector chuyển cho vùng gắn chèn orf1/3 để tạo ra pU1/3-p430-H1hu-BGHKBGH. Việc biểu hiện của H1hu được đặt dưới sự kiểm soát của trình tự khởi đầu p430 và tín hiệu polyA hormon tăng trưởng bò (BGH) và được đóng khung bằng các vùng tái tổ hợp để gắn chèn vào trong orf1/3 (Fig.21).

Trình tự mã hóa của H1pdm được tổng hợp và tách dòng phụ tạo ra vector chuyển pU70-p455-H1pdm-71K71, đặt H1pdm dưới sự kiểm soát của trình tự khởi đầu mới p455 và tín hiệu polyadenyl hóa mới 71pA và đóng khung catxet bằng các vùng tái tổ hợp để gắn chèn vào trong orf70 (Fig.22).

Tiếp theo, catxet biểu hiện p430-H1av-BGH và p455-H1pdm-71 được cài xen vào trong pRacH-SE bằng cách gây đột biến *en-passant* bằng cách sử dụng hệ thống tái tổ hợp RED, tạo ra pRacH-SE-1/3-p430-H1hu thứ nhất. Bằng cách sử dụng BAC được cải biến làm đích, p455-H1pdm-71 được gắn chèn bằng cách gây đột biến *en-passant* sử dụng hệ thống tái tổ hợp RED, tạo ra pRacH-SE-1/3-p430-H1hu-70-p455-H1pdm. pRacH-SE-1/3-p430-H1hu-70-p455-H1pdm được chuyển nhiễm trong các tế bào PK/WRL và rEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1hu-70-p455-H1pdm được giải phóng và được tinh chế vết tan ba lần. Tên gọi ngắn của virus vector tái tổ hợp mới này là rEHV-1 RacH-SE_D (Fig.23).

Việc biểu hiện của gen chuyển trong tế bào bị nhiễm được phân tích bằng thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang gián tiếp (IFA, không được thể hiện) và thử nghiệm thấm tách Western bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng và đa dòng có bán trên thị trường (Fig.24). Việc khôi phục orf71 mã hóa EHV-1 gpII được khẳng định bằng IFA (không được thể hiện) và thấm tách Western bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng Ai2G7 (sở hữu của BI), (Fig.24).

Độ ổn định di truyền và kiểu hình của rEHV-1 tái tổ hợp được thể hiện bằng cách cấy chuyển giống nuôi cấy tế bào, xác định độ chuẩn virus mỗi 5 lần cấy chuyển.

Các trình tự của các vùng gắn chèn được xác nhận mỗi mười lần cấy chuyển cũng như biểu hiện gen chuyển bằng thử nghiệm thấm tách Western (không được thể hiện). Độ tin cậy biểu hiện được đánh giá bằng IFA kép đối với các vết tan dưới việc xếp chồng methocel, đếm các vết tan được nhuộm bằng kháng thể kháng EHV và kháng thể đặc hiệu với gen chuyển (không được thể hiện).

Để nghiên cứu đặc tính của nó khi sử dụng làm vaccin được tạo vector ở lợn con, vaccin IAV lợn tứ giá chứa rEHV-1 RacH-SE_B và rEHV-1 RacH-SE_D được thử nghiệm trong nghiên cứu thử thách chủng ngừa. Cụ thể, lợn con có tính miễn dịch kháng IAV lợn mà có nguồn gốc từ mẹ (dương tính với kháng thể từ mẹ) được chủng ngừa hai lần vào trong cơ bằng rEHV-1 RacH-SE_B và rEHV-1 RacH-SE_D ở liều bằng 1×10^7 TCID₅₀ cho mỗi chủng vaccin lúc một và bốn tuần tuổi (chủng ngừa hai mũi, 2x EHV-1) hoặc chỉ lúc bốn tuần tuổi (chủng ngừa một mũi, 1x EHV-1). Nhóm không được chủng ngừa dùng làm đối chứng âm. Lúc 11 tuần tuổi, tất cả các động vật ngoài đối chứng âm được thử thách bằng cách dùng trong khí quản liều lượng 1×10^6 TCID₅₀ của chủng thử thách IAV lợn H3N2 (thể phân lập virus thực địa châu Âu R452-14 mà H3 của nó khác loại với kháng nguyên vaccin H3 được sử dụng trong rEHV-1 RacH-SE_B). Các động vật không được chủng ngừa và không thử thách được sử dụng làm đối chứng âm, trong khi các động vật không được chủng ngừa nhưng được thử thách được sử dụng làm đối chứng thử thách. Tại thời điểm và sau khi chủng ngừa và trước và sau khi thử thách, thân nhiệt được đo và mẫu máu được lấy tại các thời điểm khác nhau. Một ngày sau khi thử thách, một nửa số động vật mỗi nhóm bị giết và phổi được tính điểm theo mức độ tổn thương thường thấy đối với bệnh nhiễm IAV lợn, ba mẫu phổi từ mỗi phổi trái và phải lần lượt được lấy từ mỗi động vật, để xác định độ chuẩn IAV lợn lây nhiễm trong chất đồng nhất phổi, và dịch rửa phế quản phế nang (bronchioalveolar lavage fluid - BALF) được lấy mẫu. Quy trình tương tự được thực hiện với nửa số động vật còn lại trong mỗi nhóm ba ngày sau khi thử thách. Nguyên liệu mẫu và dữ liệu thu thập được phân tích để xác định, trong số các thông số khác, sự thay đổi thân nhiệt sau khi thử thách, các dấu hiệu lâm sàng sau khi nhiễm IAV lợn, điểm số phổi, độ chuẩn IAV lợn trong phổi, sự thay đổi mô học ở mô phổi, độ chuẩn trung hòa huyết thanh IAV lợn, mức cytokin trong BALF, sự kích thích lại PBMC như đo được bằng IFN γ -ELISpot, và sự hoạt hóa tế bào B.

VÍ DỤ 8: Cảm ứng đáp ứng kháng thể trung hòa kháng hai kháng nguyên ở chuột nhắt được chủng ngừa bằng vacxin vector rEHV-1 RacH nhị giá

rEHV-1 RacH SE B (rEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1av-7-p455-H3 xem Fig. 14) được sử dụng để gây miễn dịch cho chuột Balb/c để chứng tỏ rằng gen chuyển được biểu hiện làm sinh miễn dịch ở các loài khác lợn và kháng thể trung hòa được cảm ứng kháng một trong hai kháng nguyên bằng cách sử dụng trong mũi.

Chi tiết, ba nhóm mỗi nhóm gồm năm con chuột Balb/c, 3-5 tuần tuổi, lần lượt được chủng trong mũi vào các ngày nghiên cứu 0 và 21 bằng 40µl rEHV-1 RacH SE B (rEHV-1 RacH-SE-1/3-430-H1av-7-455-H3, nhóm 1), hoặc 40 µl vector trống (rEHV-1 RacH-SE, nhóm 2, đối chứng vector), hoặc 40 µl môi trường nuôi cấy mô (nhóm 3 đối chứng âm). Đối với các nhóm 1 và 2, liều lượng EHV-1 tái tổ hợp gây nhiễm tương ứng là 1×10^5 TCID₅₀/40 µl. Chuột được lấy máu vào các ngày nghiên cứu 0 (trước khi chủng lần thứ nhất), 7, 14, 21 (trước khi chủng lần thứ hai), 28, và 35. Huyết thanh được chuẩn bị từ mẫu máu và được trữ đông ở -80°C.

Thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang để phát hiện kháng thể kháng virut vector

Các tế bào AI-ST được cho nhiễm ở tỷ lệ gây nhiễm (MOI) là 0,001 bằng rEHV-1 RacH-SE1212, virut được giải phóng khỏi vector trống BAC pRacH-SE1.2. 24 giờ sau khi nhiễm các vết tan phân biệt được quan sát và tế bào được xử lý cho thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang gián tiếp (IFA). Huyết thanh của máu cuối cùng từ cả ba nhóm (thu được 14 ngày sau khi chủng ngừa lần hai) được pha loãng 1:50 trong PBS được thử nghiệm. Để làm đối chứng dương, huyết thanh từ ngựa được chủng ngừa EHV-1 được sử dụng với độ pha loãng là 1:500. Kháng thể thứ cấp là IgG thỏ được tiếp hợp FITC kháng chuột có bán trên thị trường đối với huyết thanh chuột nhắt và IgG dê được tiếp hợp Cy5 kháng ngựa đối với huyết thanh ngựa có bán trên thị trường và được sử dụng ở độ pha loãng là 1:200. Khả năng gắn kết kháng thể được đánh giá bằng hiển vi huỳnh quang. Tất cả các con chuột được chủng ngừa đã phát triển kháng thể phản ứng trong IFA với tế bào bị nhiễm rEHV-1 RacH-SE. Tế bào không bị nhiễm không được gắn kết bởi huyết thanh thử nghiệm bất kỳ. Huyết thanh từ nhóm chuột đối chứng âm không thể hiện gắn kết đặc hiệu cả với tế bào bị nhiễm và tế bào không bị nhiễm. Dữ liệu được tổng kết trong bảng dưới đây.

Bảng 3. Kết quả hiển vi huỳnh quang của IFA đối với kháng thể kháng EHV-1

Điều trị	Số con chuột nhất	ID trong thử nghiệm	Mức pha loãng	Tế bào không bị nhiễm	Tế bào bị nhiễm
Nhóm 3 (đối chứng âm tính)	1	1	1:50	âm tính	âm tính
	2	2	1:50	âm tính	âm tính
	3	3	1:50	âm tính	âm tính
	4	4	1:50	âm tính	âm tính
	5	5	1:50	âm tính	âm tính
Nhóm 2 (vector trống)	1	6	1:50	âm tính	dương tính
	2	7	1:50	âm tính	dương tính
	3	8	1:50	âm tính	dương tính
	4	9	1:50	âm tính	dương tính
	5	10	1:50	âm tính	dương tính
Nhóm 1 (rEHV-1 RacH SE B)	1	11	1:50	âm tính	dương tính
	2	12	1:50	âm tính	dương tính
	3	13	1:50	âm tính	dương tính
	4	14	1:50	âm tính	dương tính
	5	15	1:50	âm tính	dương tính
Kháng thể đối chứng	Đặc hiệu đối với				
Huyết thanh ngựa	EHV-1	22	1:500	âm tính	dương tính
Kháng thể thứ cấp	Đặc hiệu đối với				
FITC của dê kháng	chuột nhất	23	1:200	âm tính	âm tính
Cy5 của dê kháng	ngựa	24	1:200	âm tính	âm tính

Từ kết quả này có thể kết luận rằng việc chủng rEHV-1 vào trong lỗ mũi của chuột dẫn đến sự nhiễm và sao chép của virus, làm cho hệ thống miễn dịch của chuột bị kích thích để sản xuất kháng thể kháng EHV-1.

Thử nghiệm trung hòa virus (VNT)

Để thể hiện việc cảm ứng tính miễn dịch bảo vệ kháng gen chuyển được biểu hiện có nguồn gốc từ virus cúm A (IAV) (A/swine/Italy/7680/2001(H3N2)) hoặc (A/swine/Gent/132/2005(H1N1)) huyết thanh chuột nhất được thử nghiệm hoạt tính trung hòa kháng các virus tương ứng (Allwinn et al. 2010; Trombetta et al. 2014). IAV được sử dụng cho thử nghiệm trung hòa được phân lập từ lợn ở Đức từ năm 2014, cụ thể là A/swine/Germany/AR452/2014 (H3N2) và A/swine/Germany/AR1181/2014 (H1N1). Do chúng khác loại với các chủng mà các dịch vắc xin có nguồn gốc từ đó, việc trung hòa bất kỳ các virus này bằng huyết thanh chuột sẽ là dấu hiệu cho thấy việc cảm ứng rộng rãi và hiệu quả sinh ra tính miễn dịch bảo vệ bằng việc chủng ngừa rEHV-1. Để làm huyết thanh đối chứng âm, huyết thanh từ lợn mà được thể hiện là âm tính với kháng thể virus cúm được sử dụng.

Thử nghiệm trung hòa virus cúm A:

Các tế bào MDCK để trung hòa virus cũng như chuẩn độ ngược trong các đĩa 96 lỗ được ủ trong hai ngày ở 37°C/5%CO₂ trước khi sử dụng. Dung dịch gốc IAV tương ứng H3N2 và H1avN1 được rải đông trên đá và pha loãng trong MEM chứa Gentamycin và nồng độ gấp đôi của trypsin (MEM/Genta/2x trypsin).

Huyết thanh được thử nghiệm là từ các mẫu máu cuối cùng của nhóm 1 (rEHV-1 Rach SE B), nhóm 2 (vector trống), đối chứng dương (huyết thanh từ lợn được chủng ngừa bằng vắc xin IAV đa giá bất hoạt, và đối chứng âm).

Huyết thanh được làm bất hoạt bằng nhiệt và trong hai và ba thử nghiệm độc lập, lần lượt được pha loãng theo chuỗi với tỷ lệ 1:2 bắt đầu từ 1:16 đến 1:4096. IAV được pha loãng đến khoảng 100 TCID₅₀/phản ứng trung hòa. Sản phẩm phản ứng trung hòa được ủ trong 2 giờ ở 37°C, 5% CO₂. Việc chuẩn độ ngược virus được sử dụng được thực hiện bốn lần giống nhau. Môi trường tăng trưởng được loại bỏ và các tế bào MDCK được rửa bằng môi trường chứa Gentamycin và trypsin trước khi bỏ

sung sản phẩm phản ứng trung hòa hoặc sản phẩm pha loãng virus của chuẩn độ ngược. VNT và các đĩa chuẩn độ được ủ ở 37°C /5% CO₂ trong 1 giờ sau khi lần lượt bổ sung sản phẩm phản ứng trung hòa hoặc sản phẩm pha loãng virus vào tế bào MDCK. Sau đó, dịch chủng ngừa được loại bỏ và các tế bào được phủ bằng môi trường mới chứa Gentamycin và trypsin. Năm ngày sau khi chủng ngừa CPE được theo dõi và ghi nhận. Độ chuẩn virus được sử dụng thực tế trong thử nghiệm được tính là TCID₅₀/ml theo Reed và Munch và độ pha loãng mà tại đó huyết thanh thử nghiệm đã ngăn chặn sự cảm ứng CPE điển hình của virus cúm được báo cáo, xem các bảng dưới đây.

Bảng 4: Kết quả của VNT cúm H1avN1

H1avN1	VNT#1		VNT#2		VNT#3		Khả năng trung hòa trung bình	SD (độ lệch chuẩn - standard deviation)
	146 TCID ₅₀ /lỗ	Khả năng	32 TCID ₅₀ /lỗ	Khả năng	181 TCID ₅₀ /lỗ	Khả năng		
chuột nhất	Mức pha loãng trung hòa nghịch đảo		Mức pha loãng trung hòa nghịch đảo		Mức pha loãng trung hòa nghịch đảo			
rEHV-1 RacH SE B -1	32	4672	128	4096	32	5792	4853	862
rEHV-1 RacH SE B -2	16	2336	64	2048	âm tính		2192	204
rEHV-1 RacH SE B -3	32	4672	128	4096	16	2896	3888	906
rEHV-1 RacH SE B -4	128	18688	512	16384	64	11584	15552	3624
rEHV-1 RacH SE B -5	32	4672	256	8192	16	2896	5253	2695
Vector trống-1	n.d.	n/a	âm tính	n/a	âm tính	n/a	n/a	n/a
Vector trống-2	n.d.	n/a	âm tính	n/a	âm tính	n/a	n/a	n/a
Vector trống-3	n.d.	n/a	âm tính	n/a	âm tính	n/a	n/a	n/a

Vecto trống-4	âm tính	n/a	âm tính	n/a	âm tính	n/a	n/a	n/a
Vecto trống-5	n.d.	n/a	âm tính	n/a	âm tính	n/a	n/a	n/a
Huyết thanh lợn đối chứng dương	32	n/a	n.d	n/a	n.d	n/a	n/a	n/a

Bảng 5: Kết quả của VNT cúm H3N2

H3N2	VNT#1		VNT#2		VNT#3		Khả năng trung hòa trung bình	SD (độ lệch chuẩn)
	16 TCID ₅₀ /l ổ	khả năng	24 TCID ₅₀ /l ổ	khả năng	15 TCID ₅₀ /l ổ	khả năng		
chuột nhất	Mức pha loãng trung hòa nghịch đảo		Mức pha loãng trung hòa nghịch đảo		Mức pha loãng trung hòa nghịch đảo			
rEHV -1 RacH SE B -1	4096	6553 6	1024	2457 6	2048	3072 0	40277	22089
rEHV -1 RacH SE B -2	1024	1638 4	512	1228 8	128	1920	10197	7455
rEHV -1 RacH SE B -3	1024	1638 4	512	1228 8	256	3840	10837	6397
rEHV -1 RacH SE B -4	256	4096	256	6144	64	960	3733	2611
rEHV -1 RacH SE B -5	256	4096	128	3072	64	960	2709	1599

Vector trống- 1	âm tính	n/a	âm tính	n/a	âm tính	n/a	n/a	n/a
Vector trống- 2	âm tính	n/a	âm tính	n/a	âm tính	n/a	n/a	n/a
Vector trống- 3	âm tính	n/a	âm tính	n/a	âm tính	n/a	n/a	n/a

Để so sánh kết quả của các thử nghiệm độc lập, khả năng trung hòa được tính bằng cách nhân độ pha loãng huyết thanh nghịch đảo và độ chuẩn tương ứng mà nó được trung hòa bởi huyết thanh này. Sau đó lấy giá trị trung bình của ba thử nghiệm chia cho 100 để phản ánh giá trị trung hòa của 100 TCID₅₀. (Các bảng 3, 4, và 5). Dữ liệu được tổng kết và thể hiện dưới dạng đồ thị trong Fig.25.

Tất cả các con chuột được chủng ngừa bằng rEHV-1 RacH SE B đã phát triển kháng thể trung hòa kháng IAV tương ứng, các chủng khác loại của kiểu phụ H3N2 và H1avN1. Do đó, việc dùng trong mũi hai lần rEHV-1 RacH-SE biểu hiện hemagglutinin của IAV từ vị trí gắn chèn orf70 dưới sự kiểm soát của vùng khởi đầu p455 (H3) và song song từ vị trí gắn chèn orf1/3 dưới sự kiểm soát của vùng khởi đầu p430 (H1av), kích thích thành công đáp ứng miễn dịch bảo vệ ở chuột BALB/c.

Có thể kết luận được rằng vector rEHV-1 RacH-SE có thể được sử dụng để biểu hiện song song hai gen chuyển khác nhau để kích thích đáp ứng miễn dịch sau khi chủng ngừa trong mũi.

VÍ DỤ 9: Tạo ra, mô tả đặc điểm in vitro và thử nghiệm in vivo vacxin virus Schmallerberg (SBV) được tạo vector EHV-1 cho gia súc

Một trong số các bunyavirus mới nổi là virus Schmallerberg (SBV), virus nhóm huyết thanh Simbu châu Âu đầu tiên (chi *Orthobunyavirus*), mà có thể gây ra sự sảy thai, lưu thai, và thai nhi dị tật khi động vật mang thai bị nhiễm trong pha quyết định của thai kỳ và hiện được sử dụng ngày càng nhiều làm virus mẫu để nghiên cứu orthobunyavirus (Bilk et al.,2012). Vì các virus Simbu được truyền bằng các vật truyền côn trùng và không có sẵn các lựa chọn điều trị nên việc chủng ngừa là yếu tố chính để kiểm soát bệnh. Các vacxin virus toàn phần bất hoạt kháng SBV và kháng

cả các virus Simbu như virus Akabane (AKAV) hoặc virus Aino là có sẵn và các vaccine sống được làm suy giảm độc lực kháng SBV đã được phát triển (Anonymous, 2013, 2015; Kraatz et al., 2015; Wernike et al., 2013b), tuy nhiên không có vaccine nào trong số các vaccine này cho phép biệt hóa giữa các động vật được chủng ngừa và bị nhiễm thực địa (nguyên tắc DIVA). Chỉ mới gần đây, các vaccine phân đơn vị tương thích DIVA trên cơ sở 234 axit amin (aa) từ đầu tận cùng amin của SBV glycoprotein Gc, mới được thử nghiệm trên mô hình thử thách động vật nhỏ gây tử vong và trên gia súc (Wernike et al., 2017). Khi được phân phát làm plasmid biểu hiện hoặc được biểu hiện trong hệ giống tế bào động vật có vú, miễn Gc cho sự bảo vệ ở mức lên tới 66% số động vật, trong khi tất cả các động vật được gây miễn dịch bằng miễn Gc của SBV được liên kết với miễn tương ứng của AKAV có liên quan được bảo vệ hoàn toàn (Wernike et al., 2017). Để nghiên cứu ứng dụng của rEHV-1 RacH-SE làm vaccine vector trên gia súc, 234 aa đầu tận cùng amin của SBV-Gc được gắn chèn vào vị trí gắn chèn orf70(US4) và được biểu hiện dưới sự kiểm soát của vùng khởi đầu p455 mới và tín hiệu poly A 71pA và được thử nghiệm trong thử nghiệm thử thách chủng ngừa trên gia súc.

Tạo ra EHV-1 tái tổ hợp biểu hiện kháng nguyên có nguồn gốc từ glycoprotein c (Gc) của virus Schmallerberg (SBV)

Phần 234 axit amin của vùng mã hóa của glycoprotein c (Gc) của virus Schmallerberg (SBV) được tối ưu hóa về mặt sử dụng codon để biểu hiện trong EHV-1 và được biến đổi thêm để đạt được sự truyền hiệu quả và sự gắn chèn hiệu quả vào màng sinh chất của các tế bào bị nhiễm. Theo đó, trình tự mã hóa peptit tín hiệu thu được từ hemagglutinin (HA) virus cúm A (IAV) kiểu phụ H1N2 (A/swine/Italy/116114/2010 (H1N2), số truy cập GenBank ADR01746.1) cũng như phần neo xuyên màng (transmembrane anchor - TM) và phần đầu tận cùng C của tế bào chất từ HA đó lần lượt được gắn vào các đầu 5' và 3'. Ngoài ra, tác nhân liên kết GS HMGGSGGGSGGGSGGGT (SEQ ID NO.:30) được gắn chèn vào giữa phần Gc và miền HA-TM. ADN (SEQ ID NO.:31) được tổng hợp và được tách dòng phụ vào các vị trí NotI/KpnI của pU70-455-71K71, vector chuyển để gắn chèn catxet biểu hiện gen chuyển vào orf70 (US4) của EHV-1 bằng cách tái tổ hợp qua trung gian RED đối với BAC pRacH-SE. Plasmid thu được pU70-455-SBVGc_71K71 (Fig.26)

được cắt bằng XbaI để giải phóng mảnh ADN 3056 bp (SEQ ID NO.:32), mà được biến nạp vào E.coli K12 GS1783 mang pRacH-SE.

SEQ ID NO.:31: Trình tự ADN tổng hợp chứa các vị trí giới hạn để tách dòng phụ

GCGGCCGCATGAAGGCGATCCTGGTTGTGCTGCTGTACACCTTTG
 CCACCGCCAACGCCGATACGCTGATCAACTGCAAGAACATCCAGAGCAC
 CCAGCTGACAATCGAGCACCTGAGCAAGTGCATGGCCTTCTACCAGAAC
 AAGACCAGCAGCCCCGTCGTGATCAACGAGATCATCTCCGACGCCAGCG
 TGGACGAACAGGAACTGATTAAGTCTCTGAACCTGAACTGCAACGTGAT
 CGACCGGTTTCATCAGCGAGTCCAGCGTGATCGAGACACAGGTGTACTAC
 GAGTATATCAAGAGCCAGCTGTGTCCACTGCAAGTGCACGATATCTTCA
 CCATCAACAGCGCCAGCAACATCCAGTGGAAGGCCCTGGCCCGCAGCTT
 TACCCTGGGCGTGTGCAACACCAACCCCCACAAGCACATCTGCCGGTGC
 CTGGAATCCATGCAGATGTGTACCAGCACCAAGACCGACCACGCCAGA
 GAGATGAGCATCTACTACGACGGCCACCCCGACAGATTCGAGCACGAC
 ATGAAGATTATCCTGAATATCATGCGGTACATCGTGCCCGGCCTGGGCA
 GAGTGCTGCTGGACCAGATCAAGCAGACCAAGGACTACCAGGCCCTGA
 GACACATCCAGGGCAAGCTGAGCCCCAAGTCCCAGAGCAACCTGCAGC
 TGAAGGGCTTCCTGGAATTCGTGGACTTCATCCTGGGCGCCAACGTGAC
 CATTGAGAAAACCCCCCAGACCCTGACCACCCTGAGCCTGATTCATATG
 GGAGGTTCCGGAGGTGGAGGTTCCGGAGGTGGAGGTTCCGGAGGTGGC
 ACCATACTGGCCATTTACAGCACAGTTGCGAGCAGCCTGGTCCTGATCG
 TGAGCCTGGGTGCTATATCATTCTGGATGTGCAGCAACGGCTCTCTCCA
 GTGCCGCATCTGTATCTGAGGTACC

SEQ ID NO.:32: Mảnh ADN được sử dụng để tái tổ hợp RED để tạo ra pRacH-SE-70-455-SBVGc

Các vị trí phân cắt enzym giới hạn được thể hiện bằng dấu hoa thị (*)

T*CTAGACTCGAGCGCAAGCCCTACACGCGCTACCCCTGCTTTCAA
 CGCGTCAACCTGCACATTGACGGGGAGTTTCTGGTTCACAAGATGCTAG
 CGTTCAATGCCGCGATGCGCCCATCGGCCGAGGAGCTGCTGTCATACCC
 AATGTTTGCTCAACTTTAGGATGACTAACCTGTTTCTGGGAGGAGACAG

CGTGGGCGACGGTGTATAAAGTTGGTCTGCTTTCAAGCCCTGCCACTGC
GCTACAGTGCCACCAACTGTAAAGCGGTAGTAAGCTGCAGTGGTCGACT
GGTGGTAGCATATACTACCTTATTTATACGCTCCGAGCTGTTTTTCAGCA
TGCTAGCACCCAACGCCGAGCGAGAGTATATAACTCCCATCATTGCCCA
CAAGCTTATGCCACTTATTAGCGTCCGCTCTGCCGTTTGCTTAGTCATAA
TATCTACCGCCGTTTACGCAGCAGACGCTATCTGCGACACAATTGGATTT
GCGATACCGCGCATGTGGATGTGTATTTTAATGAGATCAACCTCCATGA
AGCGTAACTAGGGGGCCTCCCACTGAGGCACTACCGGCTTAGCAGCTGA
CTAACACAGTATAAAACGTGAGAAGAAATCAGTCTCATGCGCCATTAGC
GCTAGGCTAGTTAGCGTGGAGGACCGGAGCGCTACCGCCAGCAGTTTCA
TCCGCTGGTTACGGGTTTGTTAACACCTACCGGTGTTTTACCGCTACCA
TAGGATCCGATCCATGGGCGGCCGCATGAAGGCGATCCTGGTTGTGCTG
CTGTACACCTTTGCCACCGCCAACGCCGATACGCTGATCAACTGCAAGA
ACATCCAGAGCACCCAGCTGACAATCGAGCACCTGAGCAAGTGCATGG
CCTTCTACCAGAACAAGACCAGCAGCCCCGTCGTGATCAACGAGATCAT
CTCCGACGCCAGCGTGGACGAACAGGAACTGATTAAGTCTCTGAACCTG
AACTGCAACGTGATCGACCGGTTTCATCAGCGAGTCCAGCGTGATCGAGA
CACAGGTGTACTACGAGTATATCAAGAGCCAGCTGTGTCCACTGCAAGT
GCACGATATCTTCACCATCAACAGCGCCAGCAACATCCAGTGGAAGGCC
CTGGCCCGCAGCTTTACCCTGGGCGTGTGCAACACCAACCCCCACAAGC
ACATCTGCCGGTGCCTGGAATCCATGCAGATGTGTACCAGCACCAAGAC
CGACCACGCCAGAGAGATGAGCATCTACTACGACGGCCACCCCGACAG
ATTCGAGCACGACATGAAGATTATCCTGAATATCATGCGGTACATCGTG
CCCGGCCTGGGCAGAGTGCTGCTGGACCAGATCAAGCAGACCAAGGAC
TACCAGGCCCTGAGACACATCCAGGGCAAGCTGAGCCCCAAGTCCCAG
AGCAACCTGCAGCTGAAGGGCTTCCTGGAATTCGTGGACTTCATCCTGG
GCGCCAACGTGACCATTGAGAAAACCCCCAGACCCTGACCACCCTGAG
CCTGATTCATATGGGAGGTTCCGGAGGTGGAGGTTCCGGAGGTGGAGGT
TCCGGAGGTGGCACCATACTGGCCATTTACAGCACAGTTGCGAGCAGCC
TGGTCCTGATCGTGAGCCTGGGTGCTATATCATTCTGGATGTGCAGCAA
CGGCTCTCTCCAGTGCCGCATCTGTATCTGAGGTACCAATAAACGCGGT
ATGTCTACCTTCAAGCCTATGATGAACGGATGTTTGGTGTGTTGCGGCTAT

TATAACGCTCTTGAGTTTTATGCTATCTCTGGGAACATGCGAAAATTACA
 GGCGTGTGGTTCGGGATCCTAGGGATAACAGGGTAATCGATTTATTCAA
 CAAAGCCACGTTGTGTCTCAAAATCTCTGATGTTACATTGCACAAGATA
 AAAATATATCATCATGAACAATAAACTGTCTGCTTACATAAACAGTAA
 TACAAGGGGTGTTATGAGCCATATTCAACGGGAAACGTCTTGCTCGAGG
 CCGCGATTAAATTCCAACATGGATGCTGATTTATATGGGTATAAATGGG
 CTCGCGATAATGTCGGGCAATCAGGTGCGACAATCTATCGATTGTATGG
 GAAGCCCGATGCGCCAGAGTTGTTTCTGAAACATGGCAAAGGTAGCGTT
 GCCAATGATGTTACAGATGAGATGGTCAGACTAACTGGCTGACGGAAT
 TTATGCCTCTTCCGACCATCAAGCATTTTATCCGTACTCCTGATGATGCA
 TGGTTACTCACCCTGCGATCCCCGGGAAAACAGCATTCCAGGTATTAG
 AAGAATATCCTGATTCAGGTGAAAATATTGTTGATGCGCTGGCAGTGTT
 CCTGCGCCGGTTGCATTCGATTCCTGTTTGTAAATTGTCCTTTTAACAGCG
 ATCGCGTATTTCTGCTCGCTCAGGCGCAATCACGAATGAATAACGGTTT
 GGTGATGCGAGTGATTTTGATGACGAGCGTAATGGCTGGCCTGTTGAA
 CAAGTCTGGAAAGAAATGCATAAGCTTTTGCCATTCTCACCGGATTCAG
 TCGTCACTCATGGTGATTTCTCACTTGATAACCTTATTTTTGACGAGGGG
 AAATTAATAGGTTGTATTGATGTTGGACGAGTCGGAATCGCAGACCGAT
 ACCAGGATCTTGCCATCCTATGGAACCTGCTCGGTGAGTTTTCTCCTTCA
 TTACAGAAACGGCTTTTTCAAAAATATGGTATTGATAATCCTGATATGA
 ATAAATTGCAGTTTCATTTGATGCTCGATGAGTTTTTCTAAAATAAACGC
 GGTATGTCTACCTTCAAGCCTATGATGAACGGATGTTTGGTGTTTGCGGC
 TATTATAACGCTCTTGAGTTTTATGCTATCTCTGGGAACATGCGAAAATT
 ACAGGCGTGTGGTTCGGGATCCGACCCTGTTGGTGGGTGCGGTTGGACT
 CAGAATCTTGGCGCAGGCATGGAAGTTTGTCTGGTGACGAAACATACGAC
 ACCATCCGCGCAGAAGCAAAGAATTTAGAGACCCACGTACCCTCAAGTG
 CTGCAGAGTCGT*CTAGA

ADN pRacH-SE-70-455-SBVGc tái tổ hợp được chuẩn bị và sự gắn chèn chính xác catxet biểu hiện và độ đồng nhất về trình tự được xác nhận bằng PCR độ tin cậy cao bằng cách sử dụng phương pháp giải trình tự Herculase™ và Sanger đối với các sản phẩm PCR. Các đoạn môi được sử dụng, xem bảng 6, SEQ ID NO.:33 đến SEQ ID NO.:37.

Bảng 6: Các đoạn mồi được sử dụng cho PCR và giải trình tự

Số	tên	trình tự	sử dụng
SEQ ID NO.:33	up70_F	5'-CGTGC GCGGATACATCG-3'	PCR & giải trình tự
SEQ ID NO.:34	up71_R	5'-CGCTTCGCAGGTGGGC-3'	PCR & giải trình tự
SEQ ID NO.:35	seq455-F1	5'-GACTGGTGGTAGCATATAC-3'	giải trình tự
SEQ ID NO.:36	SBV Gc F1	5'-GATCAACGAGATCATCTCC-3'	giải trình tự
SEQ ID NO.:37	SBV Gc R1	5'-CTGGAGAGAGCCGTTGC-3'	giải trình tự

Giải phóng và mô tả đặc điểm của RacH-SE-70-455-SBVGc EHV-1 tái tổ hợp

ADN BAC được chuẩn bị từ bốn dòng khác nhau của pRacH-SE-70-455-SBVGc. Các tế bào AI-ST (dòng tế bào tinh hoàn lợn của Boehringer-Ingelheim) được gieo cấy vào các đĩa 6 lỗ (Corning Incorporated – Life Sciences, One Becton Circle, Durham, NC 27712, USA; REF 353046) ở mật độ 10^5 tế bào/lỗ trong MEM (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Munich, Germany, SAFC62892-1000M3056) chứa 10% FBS (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Munich, Germany, SAFC, Cat 12003C-1000ml). Khi các tế bào hợp dòng ở mức 60-70%, thường là ở ngày tiếp theo, chúng được chuyển nhiễm bằng 2µg ADN BAC sử dụng kit chuyển nhiễm mARN Mirus™ (Mirus Bio LLC, 545 Science Drive, Madison, WI 53711 USA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Ngắn gọn là, 200 µl môi trường Optimem™ (Thermo Fisher Scientific) được bổ sung vào các ống polystyren dung tích 5 ml. ADN được bổ sung và được trộn. Tiếp theo 3 µl chất phản ứng Boost được bổ sung và được trộn bằng cách xoay sau đó bổ sung thể tích tương tự của chất phản ứng chuyển nhiễm và lại trộn bằng cách xoay. Hỗn hợp được ủ trong 3 phút ở nhiệt độ trong phòng và sau đó được bổ sung từng giọt trực tiếp vào giếng nuôi cấy tế bào. Các tế bào được ủ ở 37°C/5%CO₂ trong năm ngày. Các tế bào được súc rửa vào môi trường và thu gom để lưu trữ ở -80°C. Các dịch pha loãng theo chuỗi tỷ lệ 1:10 của virus được giải phóng được chuẩn bị trong MEM và gieo cấy trên các đơn lớp tế bào AI-ST hợp dòng trong các đĩa 6 lỗ. Sau khi hấp thụ trong 1 giờ ở 37°C/5%CO₂, dịch chủng ngừa được loại bỏ và các tế bào được phủ bằng môi trường bán rắn chứa 0,5% Methocel (Methyl cellulose Ph.Eur., Fluka 64632-500G) và 5%FBS (MEM-Methocel). Sau khi ủ ở 37°C/5%CO₂

trong hai đến ba ngày (cấy chuyển lần 1), các vết tan riêng rẽ, nếu có thể, nằm ở xa các vết tan lân cận được hút với thể tích 10 μ L và được nuôi cấy trong môi trường tế bào AI-ST mới trong các đĩa 6 lỗ. Các tế bào bị nhiễm được ủ trong hai đến ba ngày cho đến khi thấy có CPE lớn (lần cấy chuyển 2). Các tế bào được súc rửa vào môi trường và thu gom để lưu trữ ở -80°C . Quy trình tinh chế vết tan này được lặp lại hai lần. Các tế bào AI-ST bị nhiễm virus được tinh chế vết tan ba lần được xử lý để lần lượt dùng cho thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang gián tiếp (IFA) hoặc thẩm tách Western.

ADN virus được chuẩn bị từ các tế bào bị nhiễm được sử dụng làm khuôn cho PCR độ tin cậy cao bằng cách sử dụng HerculaseTM. Các sản phẩm PCR thu được được phân tích bằng cách giải trình tự Sanger và độ đồng nhất của vùng gắn chèn với trình tự lý thuyết và trình tự của sản phẩm PCR tương ứng của BAC được xác nhận.

Thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang gián tiếp

Các tế bào AI-ST trong các đĩa 24 lỗ (Corning Incorporated – Life Sciences, One Becton Circle, Durham, NC 27712, USA; REF 353047) được nhiễm virus tinh chế vết tan ba lần mà đã được pha loãng theo chuỗi trong MEM. Môi trường sinh trưởng được hút ra khỏi các tế bào và các tế bào được phủ bằng 250 μ L virus pha loãng (mức độ pha loãng là 10^{-2} đến 10^{-7}). Các tế bào được ủ trong 1 giờ ở $37^{\circ}\text{C}/5\%\text{CO}_2$ để hấp thụ virus, sau đó dịch chủng ngừa được loại bỏ và các tế bào được phủ bằng 1000 μ L MEM-Methocel/lỗ và được ủ ở $37^{\circ}\text{C}/5\%\text{CO}_2$ trong 2 ngày. Khi sự tạo thành vết tan được quan sát bằng kính hiển vi, các tế bào được xử lý để IFA. Môi trường được hút ra và các tế bào được rửa một lần bằng 1ml PBS (Gibco Life Technologies, Paisley PA49RF, UK, DPBS (1x) REF 14190-136) /lỗ. PBS được loại bỏ và các tế bào được cố định bằng cách bổ sung vào mỗi lỗ 1ml etanol lạnh ở -20°C (Carl Roth GmbH, Schoemperlenstr. 3-5, D-76185 Karlsruhe, Art. Nr. 5054.1) và ủ trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng. Etanol được hút ra và các tế bào được làm khô bằng không khí. Sau khi tái hydrat hóa các tế bào bằng 1ml PBS/lỗ trong 10 phút ở nhiệt độ trong phòng, các kháng thể sơ cấp được pha loãng trong PBS được bổ sung (150 μ L/lỗ) và ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Các kháng thể sơ cấp được loại bỏ và tế bào được rửa ba lần trong 2 phút bằng 1ml PBS/lỗ trước khi bổ sung dịch pha loãng kháng thể thứ cấp (150 μ L/lỗ). Sau 1 giờ ủ ở nhiệt độ trong phòng được bảo

vệ tránh ánh sáng, các dịch pha loãng kháng thể thứ cấp được loại bỏ và tế bào được rửa ba lần trong 2 phút bằng 1ml PBS/lỗ và cuối cùng được phủ 500 μ l PBS/lỗ để kiểm tra bằng kính hiển vi huỳnh quang. Các kháng thể được sử dụng được liệt kê trong bảng 7.

Bảng 7

Kháng thể	được pha loãng
Huyết thanh tăng miễn dịch của ngựa kháng EHV-1 (Boehringer Ingelheim Veterinary Research Centre proprietary)	1:400
Kháng thể đơn dòng kháng SBV-Gc (Wernike et al., 2015a)	1:50
IgG của dê được liên hợp với FITC kháng chuột Jackson Immuno Research cat.no.115-095-003	1:200
IgG của dê được liên hợp với Cy TM 5 kháng ngựa Jackson Immuno Research cat.no.108-175-003	1:200

Thẩm tách Western

1. Gây nhiễm: Ba lỗ mỗi đơn lớp hợp dòng của tế bào AI-ST trong các đĩa 6 lỗ được nhiễm ở tỷ lệ M.O.I. xấp xỉ bằng 1 bằng hai dịch phân lập vết tan khác nhau của rEHV-1 RacH-SE-455-SBVGc (#121.131 P6 và #121.232 P6) và dịch phân lập vết tan rEHV-1 RacH-SE1212 P9 (được giải phóng từ BAC pRacH-SE1.2 trồng ban đầu) bằng cách trực tiếp bổ sung lần lượt 50 μ l và 10 μ l dung dịch virus đã đông vào môi trường sinh trưởng. Ba lỗ này được để không bị nhiễm. Các tế bào bị nhiễm và không bị nhiễm được ủ trong hai ngày và sau đó được xử lý để thẩm tách Western.

2. Chuẩn bị sản phẩm phân giải: Dung dịch đệm RIPA được bổ sung hỗn hợp chất ức chế proteaza (RIPA+PI) được chuẩn bị như sau: 0,7ml 10x dung dịch đệm phân giải RIPA Millipore Cat#20-188 được bổ sung vào 6,3ml H₂O, Fisher Scientific Cat# BP2470-1, và 1 viên nén hỗn hợp chất ức chế Mini Protease CompleteTM (Roche cat#11 836 153 001) được hòa tan trong 7 ml dung dịch đệm 1xRIPA. Đối chứng không bị nhiễm được loại bỏ vào môi trường và huyền phù từ ba lỗ sao chép được gộp lại trong các ống ly tâm dung tích 15ml và được đặt trên đá. Các tế bào bị nhiễm được súc rửa trong môi trường và huyền phù từ ba lỗ bản sao được gộp lại vào trong ống ly tâm dung tích 15 ml và đặt trên đá. Các tế bào được lắng đọng

bằng cách ly tâm ở tốc độ 1000xg ở 4°C trong 5 phút. Dịch nổi được cẩn thận hút ra và viên kết tủa bào được tái tạo huyền phù trong RIPA +PI (các tế bào không bị nhiễm trong 300 µl, các tế bào bị nhiễm trong 150 µl). Các huyền phù được ủ trên đá trong 30 phút và xoay mạnh mỗi 10 phút. Các huyền phù được chuyển vào các ống ly tâm dung tích 1,5 ml và vật liệu không được hòa tan được lắng đọng bằng cách ly tâm ở tốc độ 15000 vòng/phút, 4°C, trong 10 phút trong máy vi ly tâm. Dịch nổi tế bào được chuyển vào các ống ly tâm dung tích 1,5 ml mới và được lưu trữ ở -80°C cho đến khi sử dụng.

3. SDS-PAGE và chuyển trên các màng nylon: Nguyên liệu: Các gel Precast không có vết TGX BioRad Criterion, 4-20%, 26 lỗ Cat#_567-8095; dầu chuẩn màu kép Bio Rad Precision Plus, Cat#161-0374; dầu chuẩn màu xanh toàn bộ Bio Rad Precision Plus, Cat# 161-0373; kit chuyển Bio Rad Trans Blot Turbo, Midi format Cat# 170-4159; dung dịch đệm mẫu Bio Rad 4x Laemmli (Cat no. 161-0747) (Bio Rad Laboratories GmbH, Heidemannstrasse 164, D-80939 München); dung dịch đệm chạy TGS (Sambrook et al.), dung dịch phong bế 1: 5% FBS trong PBST (Sambrook et al.); PBST. Các mẫu được chuẩn bị không bổ sung chất khử. Các mẫu được rửa đông trên đá và trộn với 1 thể tích của 4x dung dịch đệm Laemmli, đun sôi trong 6 phút ở 96°C, và giữ ở nhiệt độ trong phòng cho đến khi tải lên gel. Gel được chạy trong 30 phút ở 230 mA và sau đó được lắp ráp để điện di sử dụng hệ thống BioRad Trans Blot Turbo. Việc điện di được cài đặt ở chế độ 2,5 A 25 V 10 phút. Màng được rửa trong nước cất vô trùng và được ủ bằng 25 mL dung dịch phong bế 5% FBS trong PBST trong 30 phút ở 4°C.

Ủ và phát hiện kháng thể

Nguyên liệu: Kit Immun-Star WesternC Chemiluminescent (Bio Rad Laboratories GmbH, Heidemannstrasse 164, D-80939 München) Cat#170-5070 các kháng thể sơ cấp:

- A: Kháng thể đơn dòng đặc hiệu với SBV-Gc-protein (Wernike et al., 2015a) 1:20
- B: Kháng thể đơn dòng của chuột nhắt Ai2G7 kháng EHV-1 gpII (Boehringer Ingelheim proprietary)

Kháng thể thứ cấp: Của dê được liên hợp peroxidaza kháng chuột nhất, (Jackson Immune Research #115-035-146) 1:5000.

Tất cả các mẫu ủ được thực hiện với thể tích đủ trong điều kiện lắc ổn định. Các kháng thể được pha loãng trong 5%FBS/TBST. Các kháng thể sơ cấp được ủ qua đêm ở 4°C. Dung dịch kháng thể được loại bỏ và các vết được rửa ba lần bằng TBST trong 5-10 phút. Kháng thể thứ cấp được pha loãng được ủ với các vết này trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng, lấy ra và các vết được rửa ba lần bằng TBST trong 5-10 phút. Các vết được đặt vào thiết bị bảo vệ tấm nhựa trong. Các dung dịch peroxid và Lumino/chất tăng cường được trộn 1ml +1ml (tổng cộng 2ml cho mỗi vết), hút bằng pipet cho vào các vết và ủ trong 3 đến 5 phút. Sau đó các màng được đặt vào hệ thống chụp ảnh ChemiDocXRS (Bio Rad Laboratories GmbH, Heidemannstrasse 164, D-80939 München) và các tín hiệu được ghi lại bằng cách sử dụng phần mềm Image Lab.

Chuẩn độ virus

Các tế bào AI-ST được gieo cấy vào các đĩa 96 lỗ (Corning Incorporated – Life Sciences, One Becton Circle, Durham, NC 27712, USA; REF 353072) ở 2×10^4 tế bào/lỗ trong MEM được bổ sung 10% FBS một ngày trước khi nhiễm. Các dung dịch gốc virus được nhanh chóng rã đông và đặt trên đá. Mười dịch pha loãng theo chuỗi tỷ lệ 1:10 được chuẩn bị trong MEM với thể tích 1,2 ml trên một dịch pha loãng. 100 µl dịch pha loãng virus trên mỗi lỗ được bổ sung vào các tế bào, 8 lỗ trong một hàng dọc đối với một dịch pha loãng. Các hàng dọc 11 và 12 của mỗi đĩa dùng làm đối chứng môi trường bằng cách bổ sung 100 µl MEM/lỗ. Việc chuẩn độ được thực hiện ba lần giống nhau và các tế bào được ủ trong 5 ngày ở 37°C/5%CO₂. Các môi trường giống tế bào được kiểm tra bằng kính hiển vi và ghi lại các lỗ thấy có CPE điển hình của EHV-1 RacH. Các độ chuẩn được tính dưới dạng TCID₅₀/ml theo phương pháp của Reed và Muench (1938).

Mô tả đặc điểm của EHV-1 tái tổ hợp được sử dụng để chủng ngựa

Sự biểu hiện của Gc234 SBV được biến đổi trong các tế bào bị nhiễm được thể hiện bằng phương pháp thấm tách Western và thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang kép (DIFA) đối với sản phẩm phân lập vết tan của rEHV-1 RacH-SE-70-455-SBVGc

121.232. DIFA với kháng huyết thanh đa dòng của ngựa kháng EHV và kháng thể đơn dòng kháng SBV xác nhận sự biểu hiện của gen chuyển ở mức độ biểu kiến 100% của các tế bào bị nhiễm rEHV-1. Khi DIFA đối với các tế bào bị nhiễm rEHV-1 RacH-SE-70-455-SBVGc_121.232 được thực hiện, các tế bào dương tính với kháng nguyên EHV-1 mà được nhuộm bằng kháng huyết thanh của ngựa kháng EHV (màu tím) cũng gắn kết kháng thể đơn dòng với SBV Gc. Thẩm tách Western được chạy trong điều kiện không khử đã xác nhận sự biểu hiện của SBVGc234 biến đổi trong các tế bào bị nhiễm EHV-1 RacH-SE-70-455-SBVGc tái tổ hợp. Thực hiện thẩm tách Western đối với sản phẩm phân giải của các tế bào bị nhiễm hoặc không bị nhiễm được thăm dò bằng kháng thể đơn dòng kháng SBV Gc hoặc kháng thể đơn dòng kháng EHV-1 gpII. Mặc dù EHV-1 gpII được biểu hiện ở tất cả các tế bào bị nhiễm, SBV Gc chỉ được biểu hiện ở các tế bào bị nhiễm rEHV-1 RacH-SE-70-455-SBVGc, mà không ở các tế bào bị nhiễm vector trống rEHV-1 RacH-SE1212. Protein virut cũng không được phát hiện trong các sản phẩm phân giải của các tế bào bị nhiễm giả. Sự ủ song song các vết đốm với kháng thể đơn dòng kháng gpII của EHV-1 đã xác nhận sự khôi phục của orf71 (US5) bằng quy trình tự cắt trong quá trình giải phóng virut tái tổ hợp sau khi chuyển nhiễm. Dung dịch gốc virut P7 thu được từ thể phân lập được tinh chế vết tan ba lần rEHV-1 RacH-SE-70-455-SBVGc_121.232 đã sao chép đến độ chuẩn rất cao là $1,85 \times 10^9$ TCID₅₀/ml trong các tế bào AI-ST, điều này chỉ ra rằng sự biểu hiện của gen chuyển không làm suy giảm sự sao chép EHV trong dòng tế bào này. Giá trị trung bình của sáu lần chuẩn độ rEHV-1 RacH-SE-70-455-SBVGc_121.232 để lấy kết quả TCID₅₀/ml thu được $1,85 \times 10^9$ TCID₅₀/ml với độ lệch chuẩn là $1,28 \times 10^9$ TCID₅₀/ml.

Các con vật và thiết kế thử nghiệm

Một số lượng 4 con gia súc thuộc giống vật nuôi trong nhà ở Đức được chủng ngựa hai lần cách nhau ba tuần bằng 10^8 TCID₅₀ rEHV-SBV-Gc; 4 con vật bổ sung không được chủng ngựa để làm đối chứng. Ba tuần sau khi gây miễn dịch lần thứ hai, tất cả các con vật được cấy truyền dưới da bằng 2 x 0,5 ml chủng thực địa SBV mà đã được cấy chuyển một lần duy nhất ở gia súc (Wernike et al., 2012). Trong suốt quá trình nghiên cứu, thân nhiệt tại trực tràng được đo hàng ngày và các con vật được kiểm tra các dấu hiệu lâm sàng bởi bác sỹ thú y. Huyết thanh được lấy hàng tuần và

được phân tích bằng phương pháp ELISA trên cơ sở N có sẵn trên thị trường (ID Screen® Schmollenberg virus Competition, ID vet, France) và bằng thử nghiệm vi trung hòa kháng lại thể phân lập SBV BH80/11 như đã nêu (Wernike et al., 2013a). Việc đánh giá được thực hiện bằng cách đánh giá tác dụng lây bệnh tế bào sau 3 ngày; tất cả các mẫu được thử nghiệm bốn lần giống nhau và độ chuẩn kháng thể được tính là ND₅₀ theo Behrens và Kaerber. Huyết thanh được lấy lần lượt ở các ngày gây miễn dịch, gây nhiễm thử thách, và ở cuối quá trình nghiên cứu, được phân tích bổ sung bằng các thử nghiệm vi trung hòa kháng lại chủng EHV RacH (các con vật nhóm rEHV-SBV-Gc và các con vật đối chứng không chủng ngựa).

Trong quá trình 10 ngày đầu tiên sau khi gây nhiễm thử thách, các mẫu máu được thu thập bổ sung hàng ngày. Từ các mẫu này, ARN virus được chiết bằng cách sử dụng King Fisher 96 Flex (Thermo Scientific, Braunschweig, Germany) kết hợp với kit MagAttract Virus Mini M48 (Qiagen, Hilden, Germany) theo các hướng dẫn của nhà sản xuất và được thử nghiệm bằng RT-PCR thời gian thực trên cơ sở đoạn S (Bilk et al., 2012).

Phương thức thử nghiệm đã được xem xét kỹ bởi ủy ban nguyên tắc xử thế quốc gia và được phê chuẩn bởi cơ quan có thẩm quyền (State Office for Agriculture, Food Safety and Fisheries of Mecklenburg-Vorpommern, Rostock, Germany, ref. LALLF M-VTSD/7221.3-1.1-004/12).

Quan sát trên lâm sàng và phát hiện ARN virus

Không có con vật nào trong số các con vật thể hiện các dấu hiệu lâm sàng đặc hiệu với SBV có liên quan trong suốt quá trình nghiên cứu và thân nhiệt vẫn duy trì trong khoảng bình thường đối với tất cả các con vật, khi được đo trong trực tràng.

Bắt đầu từ ngày một hoặc ngày hai sau lây nhiễm thử thách, ARN virus có thể phát hiện được trong các mẫu huyết thanh của mỗi con vật đối chứng không được chủng ngựa trong bốn ngày liên tiếp. Tất cả các con vật được chủng ngựa từ nhóm rEHV-SBV-Gc đều thể hiện nồng độ ARN virus giảm bằng RT-PCR định lượng (Fig.27A) trong suốt toàn bộ thời gian lấy mẫu. Hai con vật của nhóm rEHV-SBV-Gc được kiểm tra hoàn toàn âm tính bởi RT-PCR định lượng (Fig.27A) trong suốt

toàn bộ thời gian lấy mẫu. Ở hai con vật được gây miễn dịch bằng rEHV-SBV-Gc, hệ gen SBV được phát hiện ở mức giảm trong lần lượt ba hoặc năm ngày.

Đáp ứng kháng thể

Ở các con vật đối chứng không được chủng ngừa, không phát hiện thấy kháng thể đặc hiệu với SBV trong thử nghiệm trung hòa huyết thanh trước khi thử thách gây nhiễm. Từ một hoặc hai tuần sau khi gây nhiễm trở đi, độ chuẩn cao của các kháng thể trung hòa được phát hiện trên tất cả các con vật không được chủng ngừa (Fig.27B).

Ngược lại với nhóm đối chứng không được chủng ngừa, các kháng thể trung hòa đặc hiệu với SBV có thể phát hiện được vào ngày thử thách gây nhiễm ở hai trong số bốn con gia súc được gây miễn dịch bằng rEHV-SBV-Gc. Ở hai con vật còn lại trong nhóm này, không phát hiện được kháng thể trung hòa đặc hiệu với SBV trước khi thử thách gây nhiễm, nhưng từ hai tuần sau khi gây nhiễm, các kháng thể trung hòa lại có mặt (Fig.27B). Độ chuẩn của các kháng thể trung hòa đặc hiệu với SBV ở tất cả bốn con vật được chủng ngừa là thấp hơn ở đối chứng thử thách, điều này chỉ ra rằng sự sao chép virus của virus thử thách là kém hiệu quả hơn, và do đó hỗ trợ số liệu RT-PCR định lượng.

Thử nghiệm trung hòa EHV

Các dịch pha loãng hai lần của huyết thanh được chuẩn bị trong MEM, bắt đầu ở tỷ lệ 1:5. Năm mươi μ l MEM chứa 100 TCID₅₀ của SBV và 50 μ l huyết thanh đã pha loãng được ủ trong các đĩa nuôi cấy tế bào 96 lỗ trong 2 giờ. Sau đó, 100 μ l huyền phù mới được chuẩn bị của tế bào BHK (trong MEM chứa 10% huyết thanh thai bò) được bổ sung và các đĩa nuôi cấy được ủ trong 3–4 ngày ở 37°C/5%CO₂. Tác động gây bệnh tế bào được đánh giá bằng hiển vi quang học. Tất cả các huyết thanh được thử nghiệm với hai bản sao giống nhau, và độ chuẩn kháng thể được tính dưới dạng ND₅₀ theo Kaerber (1931) như được cải biến bởi Behrens (truyền thông cá nhân). Các kết quả như được thể hiện trên Fig.28 chỉ ra rằng việc chủng ngừa gia súc bằng rEHV-1 RacH-SE-70-455-SBVGc dẫn đến sự sao chép virus vector đủ hiệu quả để gây cảm ứng đáp ứng miễn dịch đặc hiệu. Ở một trong số bốn con vật EHV-1, độ chuẩn kháng thể trung hòa rất thấp (1:4) có thể phát hiện được ba tuần sau khi chủng ngừa lần đầu. Sau hai lần chủng ngừa, ba tuần sau khi chủng ngừa lần hai, tất cả bốn

con gia súc đều sản sinh kháng thể trung hòa ở độ chuẩn 1:128. Từ kết quả này, có thể kết luận rằng, EHV-1 RacH cũng có thể có chức năng như là vaccin vector trên gia súc.

VÍ DỤ 10: Hiệu quả của vaccin IAV lợn tứ giá chứa rEHV-1 RacH-SE_B và rEHV-1 RacH - SE_D kháng thử thách IAV lợn H3N2 ở lợn con

Để kiểm tra đặc điểm của nó khi làm vaccin được tạo vector ở lợn con non, vaccin IAV lợn tứ giá chứa rEHV-1 RacH-SE_B (rEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1av-70-p455-H3 xem Fig.14) và rEHV-1 RacH-SE_D (rEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1hu-70-p455-H1pdm xem Fig.23) được thử nghiệm trong nghiên cứu thử thách chủng ngừa thứ hai.

Trong nghiên cứu thứ hai này, lợn con từ lợn nái không được chủng ngừa và được thử nghiệm về mặt huyết thanh âm tính với kháng thể đặc hiệu IAV lợn bằng cách sử dụng ELISA đặc hiệu H3 (Fig.32) và bằng thử nghiệm trung hòa virus (dữ liệu không được thể hiện) ở thời điểm chủng ngừa lần thứ nhất được chủng ngừa hai lần bằng vaccin tứ giá chứa rEHV-1 RacH-SE_B và rEHV-1 RacH-SE_D. Động vật được chủng ngừa lần thứ nhất trong tuần tuổi đầu tiên của nó (ngày nghiên cứu 0, SD0) và lần hai trong tuần tuổi thứ tư của nó (ngày nghiên cứu 21, SD21), tương ứng, trong cơ và sau đó trong cơ (2X IM), hoặc lần thứ nhất trong mũi và sau đó trong cơ (IN+IM), hoặc hai lần trong mũi (2X IN), ở liều là 1×10^7 TCID₅₀ trong liều 2 ml lần lượt cho mỗi chủng vaccin, động vật, và lần chủng ngừa. Nhóm không được chủng ngừa dùng làm đối chứng âm và nhóm không được chủng ngừa khác dùng làm đối chứng thử thách ở tuần thứ bảy (các ngày nghiên cứu 69 hoặc 70, SD42/43), tất cả các con vật ngoài các con vật đối chứng âm được thử thách bằng cách dùng trong khí quản liều 2×10^7 TCID₅₀ của chủng thử thách IAV lợn H3N2 (thể phân lập virus thực địa châu Âu R452-14 mà H3 của nó khác loại với kháng nguyên vaccin H3 được sử dụng trong rEHV-1 RacH-SE_B). Các con vật không được chủng ngừa và không thử thách được sử dụng làm đối chứng âm (neg. ctrl.), trong khi các con vật không được chủng ngừa nhưng được thử thách được sử dụng làm đối chứng thử thách (chall. ctrl.). Tại thời điểm và sau khi chủng ngừa và trước thử thách, mẫu máu được lấy ở các thời điểm khác nhau.

Một ngày sau khi thử thách, một nửa số động vật mỗi nhóm bị giết và ba mẫu phổi từ mỗi phổi trái và mỗi phổi phải tương ứng được lấy từ mỗi động vật. Sau đó, độ chuẩn IAV lợn chuẩn lây nhiễm trên mỗi gam chất đồng nhất phổi được xác định cho mỗi con vật là giá trị trung bình của các phổi trái và phải cho mỗi con vật mà mỗi mẫu thu được từ các chất đồng nhất của ba mẫu được gộp lại từ mỗi phổi trái hoặc phải và được chuẩn hóa thành tổng khối lượng của ba mẫu của phổi trái hoặc phải tương ứng. Quy trình tương tự được thực hiện với nửa số động vật còn lại trong mỗi nhóm ba ngày sau khi thử thách. Đối với tất cả các nhóm được chủng ngừa, giá trị trung bình của độ chuẩn của IAV lợn lây nhiễm thu được từ các con vật riêng rẽ trong nhóm được giảm đáng kể về mặt thống kê đối với các mẫu được lấy vào ngày một sau khi thử thách (CH+1) khi so sánh với nhóm đối chứng thử thách, trong khi tất cả các con vật từ nhóm đối chứng âm đã thể hiện không có độ chuẩn virus IAV lợn lây nhiễm trong chất đồng nhất phổi của chúng (Fig.29). Ngoài ra, đối với tất cả các nhóm được chủng ngừa, giá trị trung bình của độ chuẩn của IAV lợn lây nhiễm thu được từ các con vật riêng rẽ trong nhóm này được giảm đáng kể về mặt thống kê đối với các mẫu được lấy vào ngày ba sau khi thử thách (CH+3) khi so sánh với nhóm đối chứng thử thách, trong khi tất cả các con vật từ nhóm đối chứng âm đã thể hiện không có độ chuẩn virus IAV lợn lây nhiễm trong chất đồng nhất phổi của chúng (Fig.30). Vì thế, việc chủng ngừa bằng vaccin IAV lợn tứ giá chứa rEHV-1 RacH-SE_B và rEHV-1 RacH-SE_D đã giảm đáng kể về mặt thống kê tải lượng IAV lợn trong phổi ở thời điểm tương ứng là một và ba ngày sau khi thử thách bằng chủng IAV lợn H3N2 khác loại ở lợn con. Do đó, vaccin được mô tả ở đây có hiệu quả kháng IAV lợn ở lợn.

Hơn nữa, huyết thanh được lấy từ động vật thử nghiệm ở ngày nghiên cứu 0 (SD0, trước khi chủng ngừa lần thứ nhất), ở ngày nghiên cứu 21 (SD21, trước khi chủng ngừa lần hai), và ở các ngày nghiên cứu 42 hoặc 43 (SD42/43, trước khi dùng vật liệu thử thách) được phân tích bằng thử nghiệm hấp thụ miễn dịch được liên kết enzym (ELISA) đặc hiệu đối với globulin miễn dịch G (IgG) của lợn được dẫn hướng kháng được kháng nguyên H3 của IAV lợn biểu hiện tái tổ hợp mà tương đồng với H3 được biểu hiện bởi chủng vaccin rEHV-1 RacH-SE_B. Trong khi các giá trị OD trung bình của huyết thanh từ nhóm đối chứng âm chỉ cho các giá trị rất thấp đối với tất cả các thời điểm được đo, huyết thanh từ các nhóm được chủng ngừa đã chứng tỏ việc tăng mạnh các giá trị OD sau hai lần dùng trong cơ (2X IM; SD21 và SD42/43),

sau khi dùng trong mũi lần thứ nhất và sau đó dùng trong cơ (IN+IM; SD42/43), và sau hai lần dùng trong mũi (2X IN; SD42/43); Fig.32. Do đó, việc chủng ngừa bằng vaccin IAV lợn tứ giá chứa rEHV-1 RacH-SE_B và rEHV-1 RacH-SE_D gây ra đáp ứng miễn dịch về mặt huyết thanh ở lợn con kháng hemagglutinin H3 IAV lợn được biểu hiện bởi chủng vaccin rEHV-1 RacH-SE_B, tương ứng.

Ngoài ra, tế bào đơn nhân máu ngoại vi (Peripheral blood mononuclear cells - PBMC) được tinh chế từ máu được lấy từ động vật thử nghiệm vào ngày nghiên cứu 28 (SD28). Sau đó PBMC được kích thích lại bằng chủng thử thách IAV lợn H3N2 R452-14 ở tỷ lệ gây nhiễm là 1 (H3N2 MOI 1) hoặc bằng kháng nguyên H3 IAV lợn được biểu hiện tái tổ hợp mà tương đồng với H3 được biểu hiện bởi chủng vaccin rEHV-1 RacH-SE_B ở nồng độ là 1µg/ml (rH3 1µg/ml). Bằng cách sử dụng PBMC được kích thích lại, thử nghiệm chấm hấp thụ miễn dịch được liên kết enzym đặc hiệu interferon gama (IFN γ ELISpot) được thực hiện, và các giá trị thu được được chuẩn hóa đến 10⁶ tế bào và được tính là giá trị trung bình cho mỗi nhóm, tương ứng (Fig.34). Trong khi PBMC được kích thích lại từ nhóm đối chứng lây nhiễm (được sử dụng làm đối chứng âm cho thử nghiệm này, động vật không được chủng ngừa) đã thể hiện các chấm trung bình cho nhóm nhỏ hơn 45 sau khi kích thích lại, PBMC kích thích lại từ động vật được chủng ngừa thể hiện các chấm trung bình cho mỗi nhóm trên 85 sau hai lần dùng trong cơ, lớn hơn 100 chấm sau khi dùng trong mũi lần thứ nhất và sau đó dùng trong cơ (IN+IM), và lớn hơn 150 chấm sau 2 lần dùng trong mũi (2X IN), và sau khi kích thích lại, tương ứng (Fig.34). Vì thế, việc chủng ngừa bằng vaccin IAV lợn tứ giá chứa rEHV-1 RacH-SE_B và rEHV-1 RacH-SE_D tương ứng gây ra đáp ứng miễn dịch tế bào ở lợn con kháng hemagglutinin H3 IAV lợn được biểu hiện bởi chủng vaccin rEHV-1 RacH-SE_B và kháng IAV lợn H3N2 R452-14 được sử dụng để lây nhiễm virus thử thách khác loại.

Vì thế, việc chủng ngừa cho lợn con bằng vaccin IAV lợn tứ giá chứa rEHV-1 RacH-SE_B và rEHV-1 RacH-SE_D cảm ứng đáp ứng miễn dịch về mặt huyết thanh và tế bào phát hiện được ở lợn con và đã chứng tỏ hiệu lực vaccin bằng cách giảm đáng kể về mặt thống kê tải lượng IAV lợn trong chất đồng nhất phổi một và ba ngày sau khi thử thách IAV lợn khác loại.

VÍ DỤ 11: Hiệu quả của vaccin IAV lợn tứ giá chứa rEHV-1 RacH-SE_B và rEHV-1 RacH-SE_D kháng thử thách IAV lợn H3N2 ở lợn con có kháng thể thu được từ mẹ

Để nghiên cứu đặc tính của nó khi sử dụng làm vaccin được tạo vector ở lợn con non, vaccin IAV lợn tứ giá chứa rEHV-1 RacH-SE_B và rEHV-1 RacH-SE_D được thử nghiệm trong nghiên cứu thử thách chủng ngừa thứ ba.

Trong nghiên cứu thứ ba này, lợn con sinh ra được ăn sữa non và sữa của lợn nái mà được chủng ngừa hai lần trong khi mang thai bằng vaccin bất hoạt có bán trên thị trường kháng IAV lợn được sử dụng. Lợn con được thử nghiệm về mặt huyết thanh dương tính với kháng thể đặc hiệu với IAV lợn bằng cách sử dụng ELISA đặc hiệu H3 (Fig.33) và bằng cách sử dụng ELISA kháng thể đặc hiệu với IAV lợn có bán trên thị trường (*IDEXX Influenza A (Virus Antibody Test)* ®; IDEXX, Westbrook, Maine 04092, USA) theo hướng dẫn thử nghiệm của nhà sản xuất (dữ liệu không được thể hiện) tại thời điểm chủng ngừa lần thứ nhất được chủng ngừa hai lần bằng vaccin tứ giá chứa rEHV-1 RacH-SE_B và rEHV-1 RacH-SE_D. Động vật được chủng ngừa lần thứ nhất trong tuần tuổi đầu tiên của nó (ngày nghiên cứu 0, SD0) và lần hai trong tuần tuổi thứ tư của nó (ngày nghiên cứu 21, SD21), tương ứng, trong cơ và sau đó trong cơ (2X IM), hoặc lần thứ nhất trong mũi và sau đó trong cơ (IN+IM), hoặc hai lần trong mũi (2X IN), ở liều là 1×10^7 TCID₅₀ trong liều 2 ml lần lượt cho mỗi chủng vaccin, động vật, và lần chủng ngừa. Nhóm không được chủng ngừa được sử dụng làm đối chứng âm và nhóm không được chủng ngừa khác được sử dụng làm đối chứng thử thách. Trong tuần tuổi thứ mười một (các ngày nghiên cứu 69 hoặc 70, SD69/70), tất cả các động vật ngoài đối chứng âm được thử thách bằng cách dùng trong khí quản liều 2×10^7 TCID₅₀ của chủng thử thách IAV lợn H3N2 (thể phân lập virus thực địa châu Âu R452-14 mà H3 của nó khác loại với kháng nguyên vaccin H3 được sử dụng trong rEHV-1 RacH-SE_B). Các con vật không được chủng ngừa và không thử thách được sử dụng làm đối chứng âm (neg. ctrl.), trong khi các con vật không được chủng ngừa nhưng được thử thách được sử dụng làm đối chứng thử thách (chall. ctrl.). Tại thời điểm và sau khi chủng ngừa và trước thử thách, mẫu máu được lấy ở các thời điểm khác nhau.

Năm ngày sau khi thử thách động vật bị giết và ba mẫu phổi từ mỗi phổi trái và phổi phải lần lượt được lấy từ mỗi động vật. Sau đó, độ chuẩn IAV lợn chuẩn lây nhiễm trên mỗi gam chất đồng nhất phổi được xác định cho mỗi con vật là giá trị trung bình của các phổi trái và phải cho mỗi con vật mà mỗi mẫu thu được từ các chất đồng nhất của ba mẫu được gộp lại từ mỗi phổi trái hoặc phải và được chuẩn hóa thành tổng khối lượng của ba mẫu của phổi trái hoặc phải tương ứng. Đối với tất cả các nhóm được chủng ngừa, giá trị trung bình của độ chuẩn của IAV lợn lây nhiễm thu được từ các con vật riêng rẽ trong nhóm được giảm đáng kể về mặt thống kê đối với các mẫu được lấy vào ngày năm sau khi thử thách (CH+5) khi so sánh với nhóm đối chứng thử thách, trong khi tất cả các con vật từ nhóm đối chứng âm đã thể hiện là không có độ chuẩn virus IAV lợn lây nhiễm trong chất đồng nhất phổi của chúng (Fig.31). Do đó, việc chủng ngừa bằng vacxin IAV lợn tứ giá tương ứng chứa rEHV-1 RacH-SE_B và rEHV-1 RacH-SE_D đã giảm đáng kể về mặt thống kê tải lượng IAV lợn trong phổi lúc năm ngày sau khi thử thách bằng chủng IAV lợn H3N2 khác loại ở lợn con. Do đó, vacxin được mô tả ở đây có hiệu quả kháng IAV lợn ở lợn.

Hơn nữa, huyết thanh được lấy từ động vật thử nghiệm ở ngày nghiên cứu 0 (SD0, trước khi chủng ngừa lần thứ nhất), ở ngày nghiên cứu 21 (SD21, trước khi chủng ngừa lần hai), và ở các ngày nghiên cứu 35 (SD35, hai tuần sau khi chủng ngừa lần hai) được phân tích bằng thử nghiệm hấp thụ miễn dịch được liên kết enzym (ELISA) đặc hiệu đối với globulin miễn dịch G (IgG) của lợn được dẫn hướng kháng được kháng nguyên H3 của IAV lợn biểu hiện tái tổ hợp mà tương đồng với H3 được biểu hiện bởi chủng vacxin rEHV-1 RacH-SE_B. Trong khi các giá trị OD trung bình của huyết thanh từ nhóm đối chứng âm chỉ cho các giá trị rất thấp đối với SD21 và SD35, huyết thanh từ các nhóm được chủng ngừa đã chứng tỏ việc tăng mạnh các giá trị OD sau hai lần dùng trong cơ (2X IM; SD35), sau khi dùng trong mũi lần thứ nhất và sau đó dùng trong cơ (IN+IM; SD35), và sau hai lần dùng trong mũi (2X IN; SD35); Fig.33. Do đó, việc chủng ngừa bằng vacxin IAV lợn tứ giá chứa rEHV-1 RacH-SE_B và rEHV-1 RacH-SE_D gây ra đáp ứng miễn dịch về mặt huyết thanh ở lợn con kháng hemagglutinin H3 IAV lợn được biểu hiện bởi chủng vacxin rEHV-1 RacH-SE_B, tương ứng.

Ngoài ra, tế bào đơn nhân máu ngoại vi (Peripheral blood mononuclear cells - PBMC) được tinh chế từ máu được lấy từ động vật thử nghiệm vào ngày nghiên cứu 28 (SD28). Sau đó PBMC được kích thích lại bằng chủng thử thách IAV lợn H3N2 R452-14 ở tỷ lệ gây nhiễm là 1 (H3N2 MOI 1) hoặc bằng kháng nguyên H3 IAV lợn được biểu hiện tái tổ hợp mà tương đồng với H3 được biểu hiện bởi chủng vaccin rEHV-1 RacH-SE_B ở nồng độ là 1 µg/ml (rH3 1 µg/ml). Bằng cách sử dụng PBMC được kích thích lại, thử nghiệm đếm hấp thụ miễn dịch được liên kết enzym đặc hiệu interferon gama (IFN γ ELISpot) được thực hiện, và các giá trị thu được được chuẩn hóa đến 10⁶ tế bào và được tính là giá trị trung bình cho mỗi nhóm, tương ứng (Fig.35). Trong khi PBMC được kích thích lại từ nhóm đối chứng thử thách (được sử dụng làm đối chứng âm cho thử nghiệm này, động vật không được chủng ngừa) đã thể hiện số đếm trung bình cho nhóm nhỏ hơn 15 sau khi kích thích lại, PBMC kích thích lại từ động vật được chủng ngừa lại thể hiện số đếm trung bình cho mỗi nhóm trên 30 sau hai lần dùng trong cơ, lớn hơn 55 đếm sau khi dùng trong mũi lần thứ nhất và sau đó dùng trong cơ (IN+IM), và lớn hơn 65 đếm sau 2 lần dùng trong mũi (2X IN), và sau khi kích thích lại, tương ứng (Fig.35). Vì thế, việc chủng ngừa bằng vaccin IAV lợn tứ giá chứa rEHV-1 RacH-SE_B và rEHV-1 RacH-SE_D tương ứng gây ra đáp ứng miễn dịch tế bào ở lợn con kháng hemagglutinin H3 IAV lợn được biểu hiện bởi chủng vaccin rEHV-1 RacH-SE_B và kháng IAV lợn H3N2 R452-14 được sử dụng để lây nhiễm virus thử thách khác loại.

Vì thế, việc chủng ngừa cho lợn con bằng vaccin IAV lợn tứ giá chứa rEHV-1 RacH-SE_B và rEHV-1 RacH-SE_D cảm ứng đáp ứng miễn dịch về mặt huyết thanh và tế bào phát hiện được ở lợn con và đã chứng tỏ hiệu lực vaccin bằng cách giảm đáng kể về mặt thống kê tải lượng IAV lợn trong chất đồng nhất phổi năm ngày sau khi thử thách IAV lợn khác loại.

Tất cả các chế phẩm và phương pháp được bộc lộ và yêu cầu bảo hộ ở đây có thể được tiến hành và thực hiện không cần thực nghiệm quá mức khi xem xét bộc lộ này. Trong khi chế phẩm và phương pháp theo sáng chế đã được mô tả liên quan đến các phương án ưu tiên, người có kỹ năng trong lĩnh vực sẽ hiểu rõ rằng, một số thay đổi có thể được áp dụng đối với chế phẩm và phương pháp và về các bước hoặc trình tự các bước của phương pháp được mô tả ở đây mà không trệch khỏi quan niệm, tinh

thần và phạm vi bảo hộ của sáng chế. Cụ thể hơn nữa, rõ ràng là, một số tác nhân mà chúng có quan hệ cả về mặt hóa học và về mặt sinh lý có thể được thay thế cho các tác nhân được mô tả ở đây trong khi vẫn đạt được các kết quả tương tự hoặc giống hệt. Tất cả các thay thế và cải biến như vậy là hiển nhiên đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực hình như nằm trong quan niệm, tinh thần và phạm vi của sáng chế như được xác định trong phần yêu cầu bảo hộ sau đây.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Các tài liệu tham khảo sau đây, trong chừng mực mà các tài liệu này cung cấp chi tiết về phương thức minh họa hoặc các chi tiết khác bổ sung cho các chi tiết được nêu trong sáng chế này, được kết hợp cụ thể ở đây bằng cách tham khảo.

1. Allwinn R, Geiler J, Berger A, Cinatl J, Doerr HW. 2010. Determination of serum antibodies against swine-origin influenza A virus H1N1/09 by immunofluorescence, haemagglutination inhibition, and by neutralization tests: how is the prevalence rate of protecting antibodies in humans? *Med Microbiol Immunol.* 199(2):117-21. doi: 10.1007/s00430-010-0143-4. Epub 2010 Feb 17.
2. **Anonymous** (2013). VMD authorizes SBV vaccine for use in the UK. *The Veterinary record* 172, 543
3. **Anonymous** (2015). Schmallerberg virus vaccine. *The Veterinary record* 177, 321
4. **Bilk S, Schulze C, Fischer M, Beer M, Hlinak A, Hoffmann B (2012).** Organ distribution of Schmallerberg virus RNA in malformed newborns. *Veterinary microbiology* 159, 236-238
5. **Boshart M, Weber F, Jahn G, Dorsch-Häsler K, Fleckenstein B, Schaffner W. 1985.** A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell* 41(2):521-30.
6. **Bryant, N. A., Davis-Poynter, N., Vanderplassen, A., and Alcamì, A. 2003.** Glycoprotein G isoforms from some alphaherpesviruses function as broad-spectrum chemokine binding proteins. *The EMBO Journal* Vol. 22 (4): 833-846.
7. **Bustin, S. 2000.** Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 25(2): 169-193.
8. **Charoensawan, V., Wilson, D., Teichmann, S.A. 2010.** Genomic repertoires of DNA-binding transcription factors across the tree of life. *Nucleic Acids Res.* 38(21):7364-77
9. **Colle, C.F. 3rd, O'Callaghan, D.J. 1995.** Transcriptional analyses of the unique short segment of EHV-1 strain Kentucky A. *Virus Genes*;9(3):257-68.
10. **Dorsch-Häsler, K., Keil, G.M., Weber, F., Jasin, M. Schaffner, W., and Koszinowski, U.H. 1985.** A long and complex enhancer activates transcription of the gene coding for the highly abundant immediate early mRNA in murine cytomegalovirus. *PNAS* Vol. 82: 8325-8329.
11. **Drummer, H.E., Studdert, M.J., Crabb, B.S. 1998.** Equine herpesvirus-4 glycoprotein G is secreted as a disulphide-linked homodimer and is present as two homodimeric species in the virion. *J. Gen. Virol.* 79: 1205-1213
12. **von Einem J, Smith PM, Van de Walle GR, O'Callaghan DJ, Osterrieder N (2007).** In vitro and in vivo characterization of equine herpesvirus type 1 (EHV-1)

mutants devoid of the viral chemokine-binding glycoprotein G (gG). *Virology* 362, (1) 151–162

13. Goodwin, E.C. & Rottman, F.M. **1992**. The 3' flanking sequence of the bovine growth hormone gene contains novel elements required for efficient and accurate polyadenylation. *J.Biol.Chem.* 267: 16330-16334.
14. Hübert, P. H., Birkenmaier, S., Rziha, H.-J. and Osterrieder, N. **1996**, Alterations in the Equine Herpesvirus Type-1 (EHV-1) Strain RacH During Attenuation. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 43: 1–14. doi:10.1111/j.1439-0450.1996.tb00282.x
15. **Kärber**, G (1931) Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Archiv f experiment Pathol u Pharmakol.*;162:480–483
16. **Kraatz** F, Wernike K, Hechinger S, König P, Granzow H, Reimann I, Beer, M (2015). Deletion mutants of Schmallenberg virus are avirulent and protect from virus challenge. *J Virol* 89, 1825-1837
17. Luke, GA and Ryan, MD. **2013**. The protein coexpression problem in biotechnology and biomedicine: virus 2A and 2A-like sequences provide a solution. *Future Virology*, Vol. 8, No. 10, Pages 983-996.
18. Ma, G., Eschbaumer, M., Said, A., Hoffmann, B., Beer, M., Osterrieder, N. **2012**. An equine herpesvirus type 1 (EHV-1) expressing VP2 and VP5 of serotype 8 bluetongue virus (BTV-8) induces protection in a murine infection model. *PLoS One*. 2012;7(4):e34425. doi: 10.1371/journal.pone.0034425. Epub 2012 Apr 12.
19. Ma, G., Azab, W., Osterrieder, N. **2013**. Equine herpesviruses type 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4)--masters of co-evolution and a constant threat to equids and beyond. *Vet Microbiol.* 167(1-2):123-34.
20. Nolan, T. Rebecca E Hands, R.E., and Bustin S.A. **2006**. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR *Nature Protocols* 1: 1559-1582
21. Osterrieder, N., Neubauer, A., Brandmüller, C., Kaaden, O.R., and O'Callaghan, D.J. **1996**. The equine herpesvirus 1 IR6 protein influences virus growth at elevated temperature and is a major determinant of virulence. *Virology* 226:243-251.
22. Ptashne, M. **2014**. *The Chemistry of Regulation of Genes and Other Things* The Journal of Biological Chemistry Vol. 289, (9) 5417–5435. Reed, L.J., and Muench, H. **1938**. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hyg.* (27) 3; 493-497.
23. **Reed** LJ and Muench H (1938). A simple method estimating fifty percent endpoints. *The American Journal of Hygiene* 27(3) 493-497
24. Rosas, C.T., König, P., Beer, M., Dubovi, E.J., Tischer, B.K., Osterrieder, N., **2007a**. Evaluation of the vaccine potential of an equine herpesvirus type 1 vector expressing bovine viral diarrhea virus structural proteins. *J. Gen. Virol.* 88 (3), 748–757.
25. Rosas, C.T., B.K. Tischer, G.A. Perkins, B. Wagner, L.B. Goodman, N. Osterrieder. **2007b** . Live-attenuated recombinant equine herpesvirus type 1 (EHV-1)

induces a neutralizing antibody response against West Nile virus (WNV) Virus Research, 125 , pp. 69–78.

26. Rosas, C.T., Van de Walle, G.R., Metzger, S.M., Loelzer, K., Dubovi, E.J., Kim, S.G., Parrish, C.R., Osterrieder, N., **2008**. Evaluation of a vectored equine herpesvirus type 1 (EHV-1) vaccine expressing H3 haemagglutinin in the protection of dogs against canine influenza. *Vaccine* 26 (19), 2335–3234.
27. Said, A., Elke Lange, E., Beer, M. Damiani, A., Osterrieder, N. **2013**. Recombinant equine herpesvirus 1 (EHV-1) vaccine protects pigs against challenge with influenza A(H1N1)pmd09 Virus Research 173: 371– 376
28. **Sambrook J and Russell DW (2001)**. Molecular Cloning, 3rd ed. Cold Spring harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; ISBN 978-087969-577-4
29. Shaner, N.C., Campbell, R.E., Steinbach, P.A., Giepmans, B.N., Palmer, A.E., Tsien, R.Y. **2004**. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol.* Dec;22(12):1567-72. Epub 2004 Nov 21.
30. Tischer, B.K., von Einem, J., Kaufer, B., Osterrieder, N., **2006**. Two-step red-mediated recombination for versatile high-efficiency markerless DNA manipulation in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Tech.* 40, 191–197.
31. Tischer, B.K., Kaufer, B.B., Sommer, M., Wussow, F., Arvin, A., and Osterrieder, N. A Self-Excisable Infectious Bacterial Artificial Chromosome Clone of Varicella-Zoster Virus Allows Analysis of the Essential Tegument Protein Encoded by *ORF9*. *J. Virol.* 81 (23), **2007**, 13200–13208.
32. Tischer, B.K, Smith, G.A.,and Osterrieder, N. in: Jeff Braman (ed.), *In Vitro Mutagenesis Protocols: Third Edition*, Methods in Molecular Biology, vol. 634, DOI 10.1007/978-1-60761-652-8_30, © Springer Science+Business Media, LLC **2010**, Chapter 30: *En Passant* Mutagenesis: A Two Step Markerless Red Recombination System.
33. Thompson, S.R. **2012**. Tricks an IRES uses to enslave ribosomes. *Trends Microbiol.* Nov;20(11):558-66.
34. Trapp, S., von Einem, J., Hofmann, H., Kostler, J., Wild, J., Wagner, R., Beer, M., Osterrieder, N., **2005**. Potential of equine herpesvirus 1 as a vector for immunization. *J. Virol.* 79, 5445–5454.
35. Trombetta CM, Perini D, Mather S, Temperton N, Montomoli E. **2014**. Overview of Serological Techniques for Influenza Vaccine Evaluation: Past, Present and Future. *Vaccines (Basel)* 13;2(4):707-34. doi: 10.3390/vaccines2040707.
36. Wellington, J.E., Allen, G.P., Gooley, A.A., Love, D.N., Packer, N.H., Yan, J.X., Whalley, J.M. **1996**. The highly O-glycosylated glycoprotein gp2 of equine herpesvirus 1 is encoded by gene 71. *J Virol.* 70(11):8195-8.
37. **Wernike K, Aebischer A, Roman-Sosa G, Beer M, (2017)**. The N-terminal domain of Schmallenberg virus envelope protein Gc is highly immunogenic and can provide protection from infection. *Scientific reports*.2017 Feb 13;7:42500.

38. **Wernike** K, Eschbaumer M, Breithaupt A, Hoffmann B, Beer M (2012). Schmallenberg virus challenge models in cattle: infectious serum or culture-grown virus? *Veterinary research* 43, 84
39. **Wernike** K, Eschbaumer M, Schirrmeier H, Blohm U, Breithaupt A, Hoffmann B, Beer M, (2013a). Oral exposure, reinfection and cellular immunity to Schmallenberg virus in cattle. *Veterinary microbiology* 165, 155-159
40. **Wernike** K, Nikolin VM, Hechinger S, Hoffmann B, Beer M (2013b). Inactivated Schmallenberg virus prototype vaccines. *Vaccine* 31, 3558-3563.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Vector Equid Alphaherpesvirus 1 (EHV-1), chủng RacH, chứa catxet biểu hiện chứa trình tự nucleotit ngoại sinh quan tâm, trong đó trình tự nucleotit quan tâm này được gắn chèn vào ORF70 trong vector EHV-1 (ORF70) và được liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự khởi đầu, và vùng gắn sườn ORF70 trái được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự có độ tương đồng ít nhất là 95% so với trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO.: 13, 15, và 17, và vùng gắn sườn ORF70 phải được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự có độ tương đồng ít nhất là 95% so với trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO.: 14, 16, và 18.
2. Vector EHV-1 theo điểm 1, trong đó ORF70 có sự xóa, cắt, thay thế, biến đổi một phần, và trong đó ORF71 vẫn giữ được chức năng.
3. Vector EHV-1 theo điểm 1, trong đó ORF70 có sự xóa khoảng 801bp tương ứng với SEQ ID NO.: 20 hoặc trình tự mà có độ tương đồng về trình tự ít nhất là 95% so với SEQ ID NO.: 20.
4. Vector EHV-1 theo điểm 1, trong đó vector EHV-1 này chứa (i) ít nhất là một vùng gắn sườn ORF70 trái được chọn từ nhóm bao gồm: SEQ ID NO.: 13, SEQ ID NO.: 15, và SEQ ID NO.: 17, và (ii) ít nhất một vùng gắn sườn ORF70 phải được chọn từ nhóm bao gồm: SEQ ID NO.: 14, SEQ ID NO.: 16, và SEQ ID NO.: 18.
5. Vector EHV-1 theo điểm 1, trong đó trình tự nucleotit quan tâm đã nêu là tái tổ hợp.
6. Vector EHV-1 theo điểm 1, trong đó trình tự nucleotit quan tâm đã nêu là tái tổ hợp và/hoặc khác loại.
7. Vector EHV-1 theo điểm 1, trong đó trình tự nucleotit quan tâm đã nêu là trình tự mã hóa kháng nguyên liên quan đến tác nhân gây bệnh gây nhiễm cho động vật sản xuất thực phẩm như lợn hoặc gia súc.
8. Vector EHV-1 theo điểm 1, trong đó vector này còn chứa các trình tự điều hòa bổ sung như trình tự tín hiệu kết thúc hoặc polyadenyl hóa.
9. Vector EHV-1 theo điểm 1, trong đó trình tự khởi đầu mà được liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự nucleotit quan tâm được chọn từ nhóm bao gồm: T lớn SV40, gen biểu hiện rất sớm 1 của HCMV và MCMV, vùng khởi đầu alpha yếu tố

kéo dài của người, vùng khởi đầu baculovirus polyhedrin, trình tự có mức độ đồng nhất về trình tự ít nhất là 95% so với trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO.: 1, 2, 3, và 4 hoặc các trình tự bổ trợ của chúng.

10. Tế bào chủ của động vật có vú khác biệt ở chỗ nó chứa vector theo điểm 1.
11. Phương pháp sản xuất chế phẩm miễn dịch hoặc vacxin bao gồm bước sử dụng vector theo điểm 1.
12. Phương pháp tạo ra chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vacxin để giảm tỷ lệ mắc hoặc mức độ nghiêm trọng của một hoặc nhiều dấu hiệu lâm sàng liên quan đến hoặc gây ra bởi sự nhiễm, bao gồm các bước sau:

- a. gây nhiễm tế bào chủ của động vật có vú bằng vector theo điểm 1,
- b. nuôi cấy tế bào đã nhiễm trong điều kiện thích hợp,
- c. thu gom giống nuôi cấy tế bào đã nhiễm,
- d. tùy ý tinh chế giống nuôi cấy tế bào đã nhiễm thu gom được trong bước c),
- e. tùy ý trộn giống nuôi cấy tế bào đã nhiễm thu gom được này với chất mang được dụng.

13. Chế phẩm miễn dịch chứa vector EHV-1 RacH theo điểm 1.

14. Chế phẩm miễn dịch chứa:

- a. vector theo điểm 1, và/hoặc
- b. polypeptit được biểu hiện bằng vector theo điểm 1, như virus, virus sống được biến đổi, hạt giống virus (virus like particle - VLP), và
- c. tùy ý chất mang được dụng hoặc chấp nhận được cho thú y hoặc tá dụng, trong đó chất mang này là thích hợp để dùng qua đường miệng, trong da, trong cơ hoặc trong mũi, và

chế phẩm miễn dịch này chứa virus, như virus lây nhiễm.

15. Vacxin chứa:

- a. vector theo điểm 1, và/hoặc

b. polypeptit được biểu hiện bằng vector theo điểm 1, được chọn từ nhóm bao gồm virus sống được biến đổi, hạt giống virus (VLP), và

c. chất mang được dụng hoặc chấp nhận được cho thú y hoặc tá được, trong đó chất mang này là thích hợp để dùng qua đường miệng, trong da, trong cơ hoặc trong mũi, và

tùy ý vacxin này còn chứa tá được.

16. Dược phẩm chứa:

a. vector theo điểm 1, và/hoặc

b. polypeptit được biểu hiện bằng vector theo điểm 1, được chọn từ nhóm bao gồm virus sống được biến đổi, hạt giống virus (VLP), và

c. chất mang được dụng hoặc chấp nhận được cho thú y hoặc tá được, trong đó chất mang này là thích hợp để dùng qua đường miệng, trong da, trong cơ hoặc trong mũi, và

tùy ý dược phẩm này còn chứa tá được.

17. Vector Equid Alphaherpesvirus 1 (EHV-1), chủng RacH, chứa trình tự nucleotit ngoại sinh quan tâm, trong đó trình tự nucleotit quan tâm này được liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự khởi đầu, và vùng gần sườn ORF70 trái được chọn từ nhóm bao gồm: các trình tự SEQ ID NO.: 13, 15, và 17, và vùng gần sườn ORF70 phải được chọn từ nhóm bao gồm: các trình tự SEQ ID NO.: 14, 16, và 18.

18. Vector Equid Alphaherpesvirus 1 (EHV-1), chủng RacH, chứa trình tự nucleotit quan tâm được gắn chèn vào ORF70.

19. Vector Equid Alphaherpesvirus 1 (EHV-1), chủng RacH, chứa trình tự nucleotit thứ nhất và thứ hai hoặc gen quan tâm được gắn chèn vào ORF70.

20. Vector EHV-1 theo điểm 18, trong đó gen quan tâm được liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự điều hòa, chẳng hạn như trình tự khởi đầu.

21. Vector EHV-1 theo điểm 19, trong đó các trình tự khởi đầu được liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự nucleotit thứ nhất và thứ hai hoặc gen quan tâm, và trong đó các trình tự khởi đầu này là khác nhau.

22. Vector EHV-1 theo điểm 19, trong đó trình tự khởi đầu được liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự nucleotit thứ nhất hoặc gen quan tâm là p455 (SEQ ID NO. 4) hoặc là trình tự có độ đồng nhất về trình tự ít nhất là 95% so với SEQ ID NO.: 4 hoặc trình tự bổ trợ của nó, và trong đó trình tự khởi đầu được liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự nucleotit thứ hai hoặc gen quan tâm là p430 (SEQ ID NO. 3) hoặc là trình tự có độ đồng nhất về trình tự ít nhất là 95% so với SEQ ID NO.: 3 hoặc trình tự bổ trợ của nó.

23. Kit để chủng ngừa cho động vật, như lợn hoặc gia súc, để chống lại bệnh có liên quan đến và/hoặc để giảm tỷ lệ mắc phải hoặc độ nghiêm trọng của một hoặc nhiều dấu hiệu lâm sàng có liên quan đến hoặc gây ra bởi tác nhân gây bệnh ở động vật, bao gồm:

- a) dụng cụ định lượng có khả năng đưa vacxin vào động vật đã nêu; và
- b) chế phẩm miễn dịch theo điểm 14, và
- c) tùy ý, tờ hướng dẫn sử dụng.

Fig.1

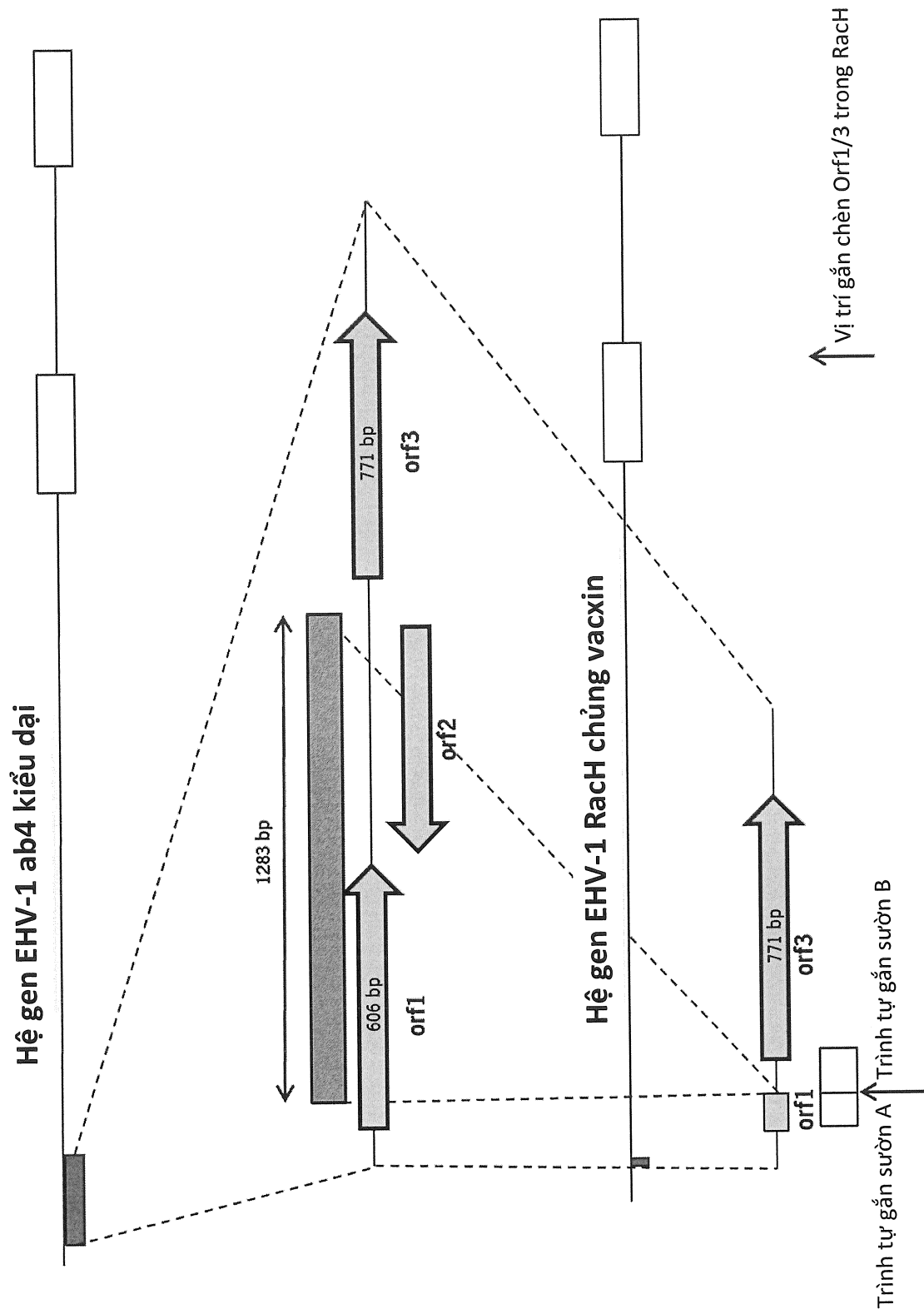


Fig.2

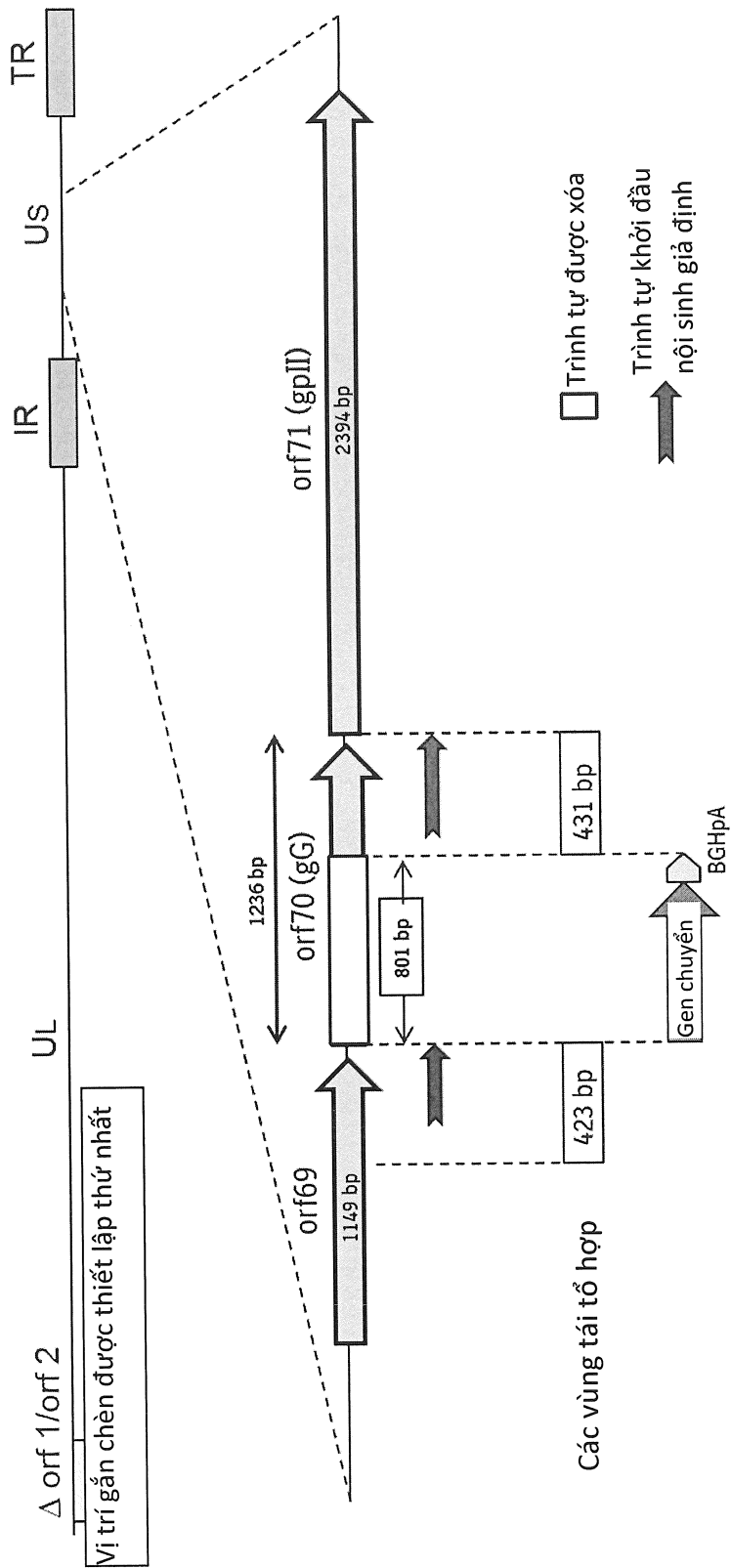
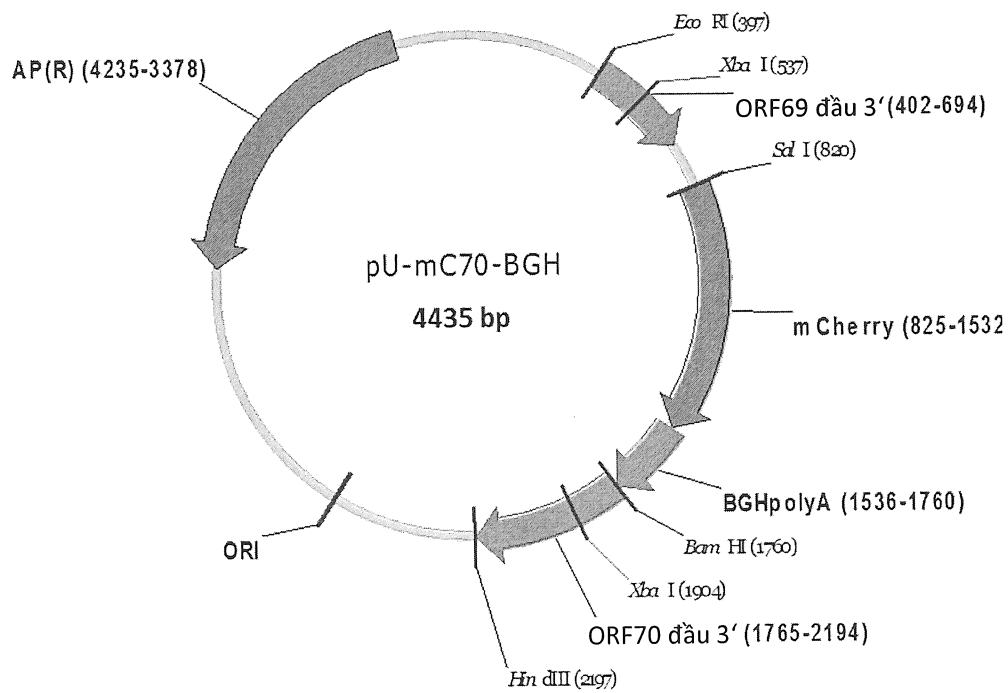
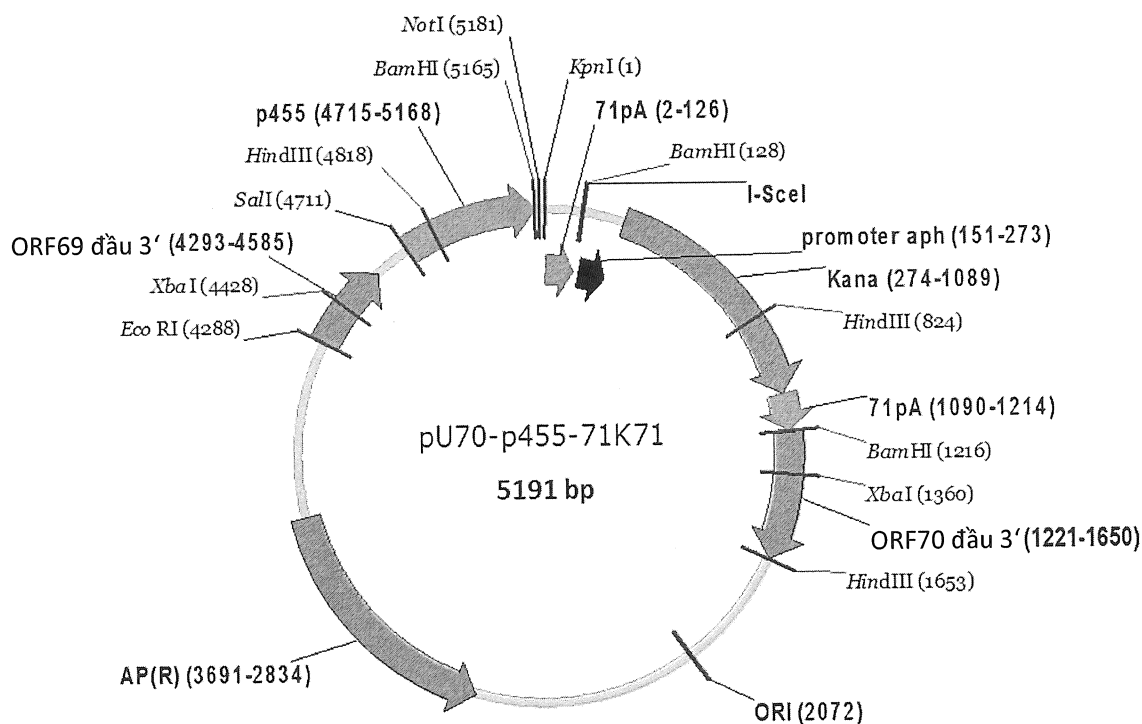


Fig.3



- ORF69 đầu 3'** trình tự ADN hệ gen virus gắn sườn vị trí gắn chèn ngược chiều
- ORF70 đầu 3'** trình tự ADN hệ gen virus gắn sườn vị trí gắn chèn xuôi chiều
- BGHpolyA** trình tự polyadenyl hóa
- ORI** nguồn gốc sao chép của vector plasmit
- Apr** Gen kháng ampicillin Betalactamaza
- BamHI, EcoRI, HindIII, SalI, XbaI** thể hiện các vị trí phân cắt endonucleaza giới hạn

Fig.4



ORF69 đầu 3' trình tự ADN hệ gen virus gắn sườn vị trí gắn chèn ngược chiều

ORF70 đầu 3' trình tự ADN hệ gen virus gắn sườn vị trí gắn chèn xuôi chiều

p455 vùng khởi đầu dẫn hướng sự biểu hiện gen chuyển

71pA trình tự polyadenyl hóa

I-SceI vị trí phân cắt đối với I-SceI

promoter aph vùng khởi đầu của sinh vật nhân sơ dẫn hướng sự biểu hiện của gen kháng Kanamycin

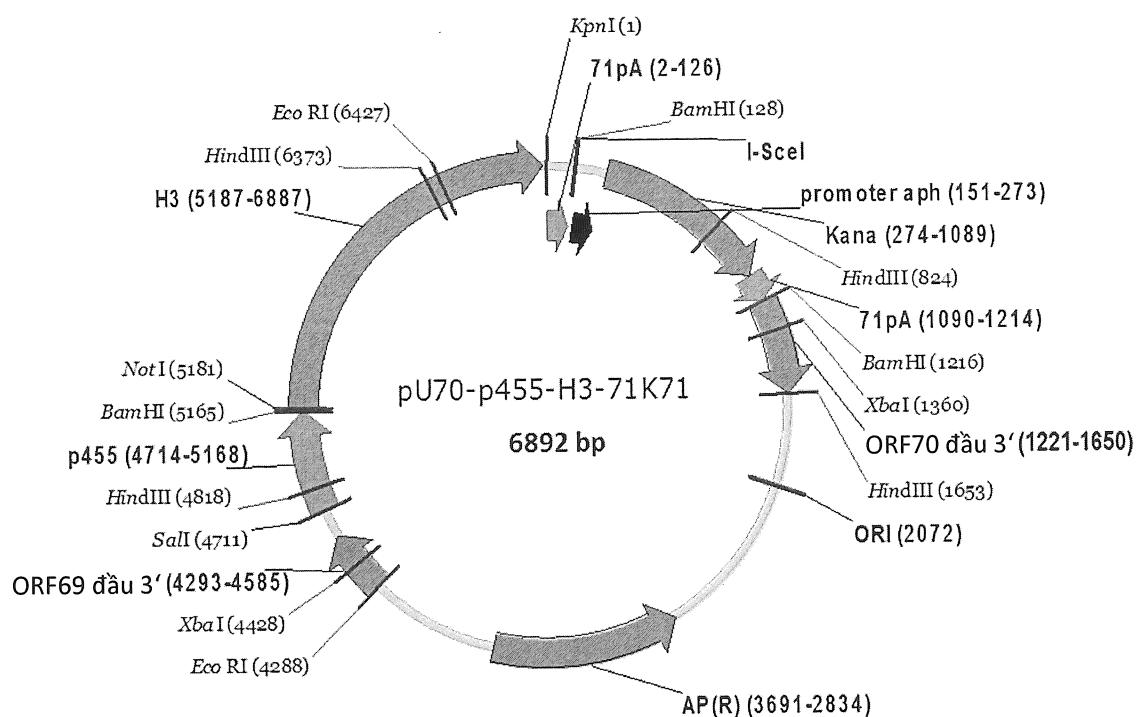
Kana orf kháng Kanamycin

ORI nguồn gốc sao chép của vector plasmit

Apr gen kháng Ampicillin

EcoRI, Sall, NotI, HindIII, KpnI, BamHI, XbaI thể hiện các vị trí phân cắt endonucleaza giới hạn

Fig.5



- ORF69 đầu 3'** trình tự ADN hệ gen virus gắn sườn vị trí gắn chèn ngược chiều
- ORF70 đầu 3'** trình tự ADN hệ gen virus gắn sườn vị trí gắn chèn xuôi chiều
- p455** vùng khởi đầu dẫn hướng sự biểu hiện gen chuyển
- H3** gen chuyển (IAV hemagglutinin)
- 71pA** trình tự polyadenyl hóa
- I-Sce1** vị trí phân cắt đối với I-Sce1
- promoter aph** vùng khởi đầu của sinh vật nhân sơ dẫn hướng sự biểu hiện của gen kháng Kanamycin
- Kana** orf kháng Kanamycin
- ORI** nguồn gốc sao chép của vector plasmit
- Apr** gen kháng Ampicillin
- EcoRI, SalI, NotI, HindIII, KpnI, BamHI, XbaI** thể hiện các vị trí phân cắt endonucleaza giới hạn

Fig.6

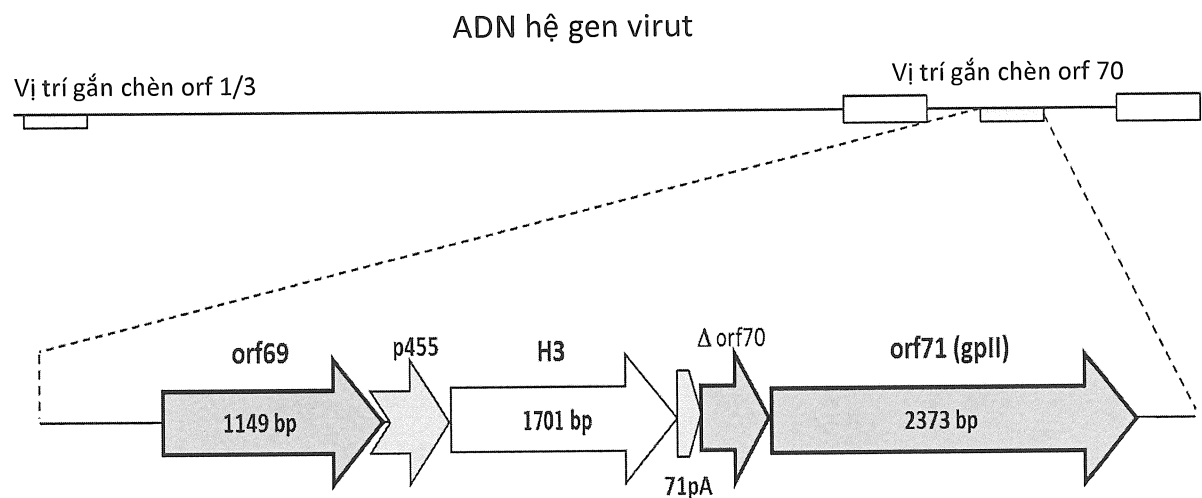
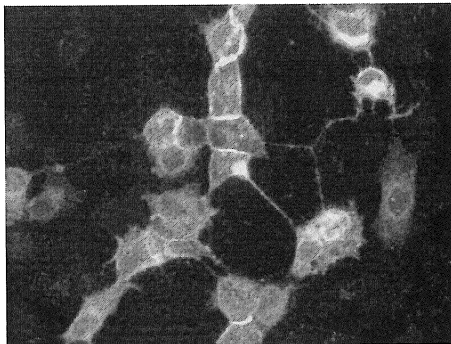


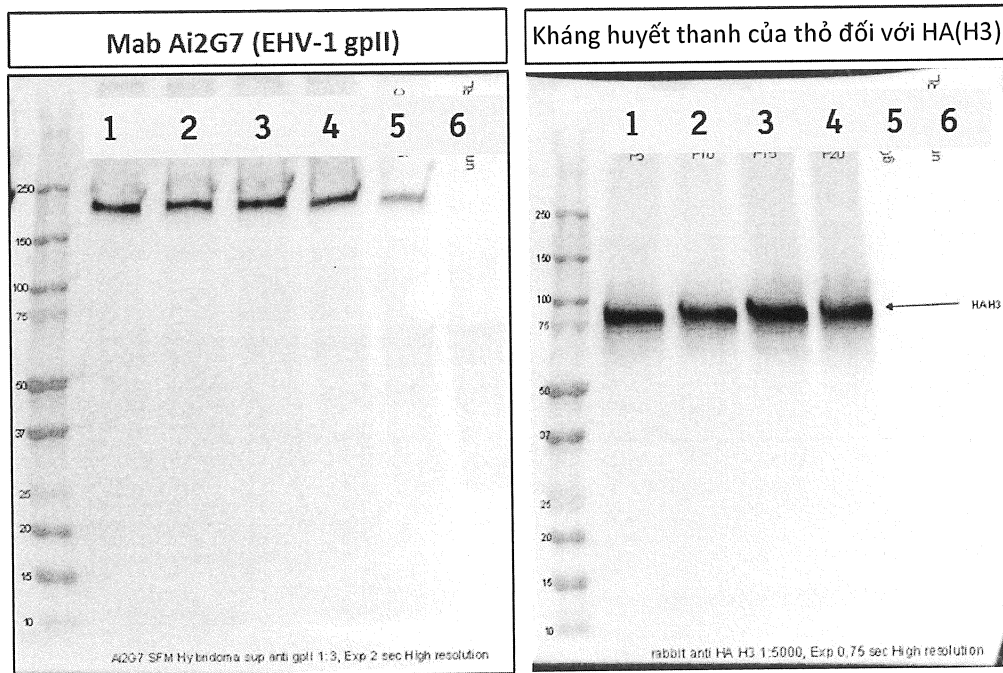
Fig.7

rEHV-1 RacH-SE70-455-H3



Kháng thể đơn dòng kháng H3

Fig.8



- 1: các tế bào bị nhiễm rEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3 P5
 2: các tế bào bị nhiễm rEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3 P10
 3: các tế bào bị nhiễm rEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3 P15
 4: các tế bào bị nhiễm rEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3 P20
 5: các tế bào bị nhiễm rEHV-1 RacH-mC70
 6: các tế bào không bị nhiễm

Fig.9A

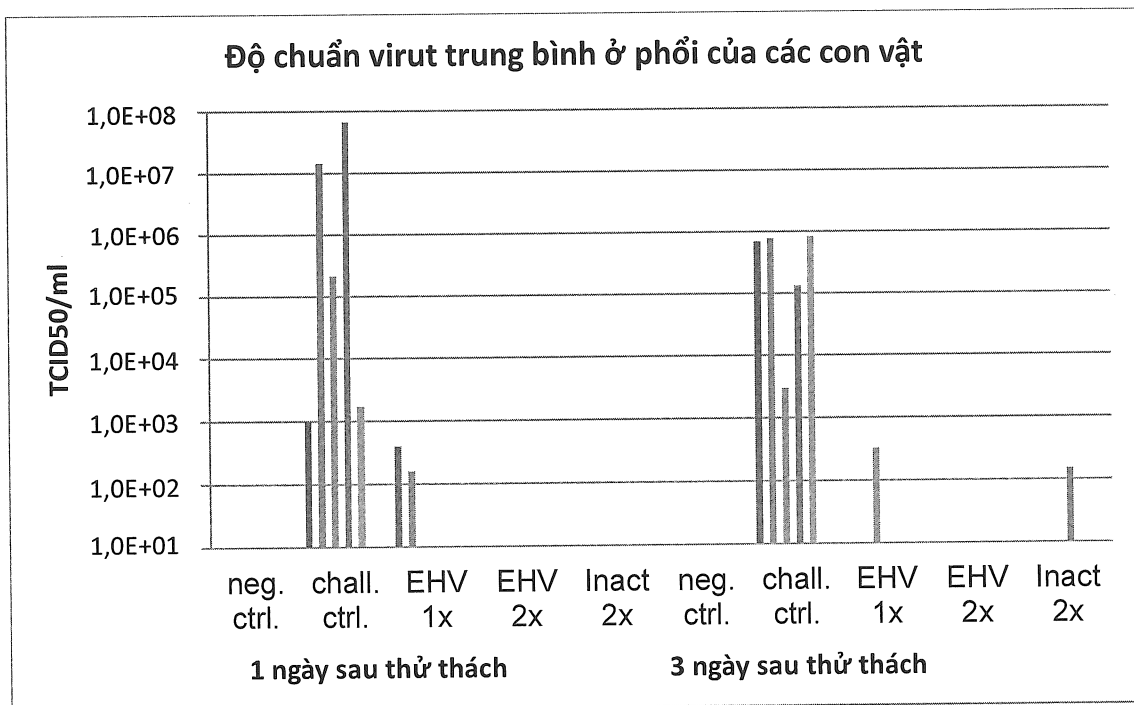


Fig.9B

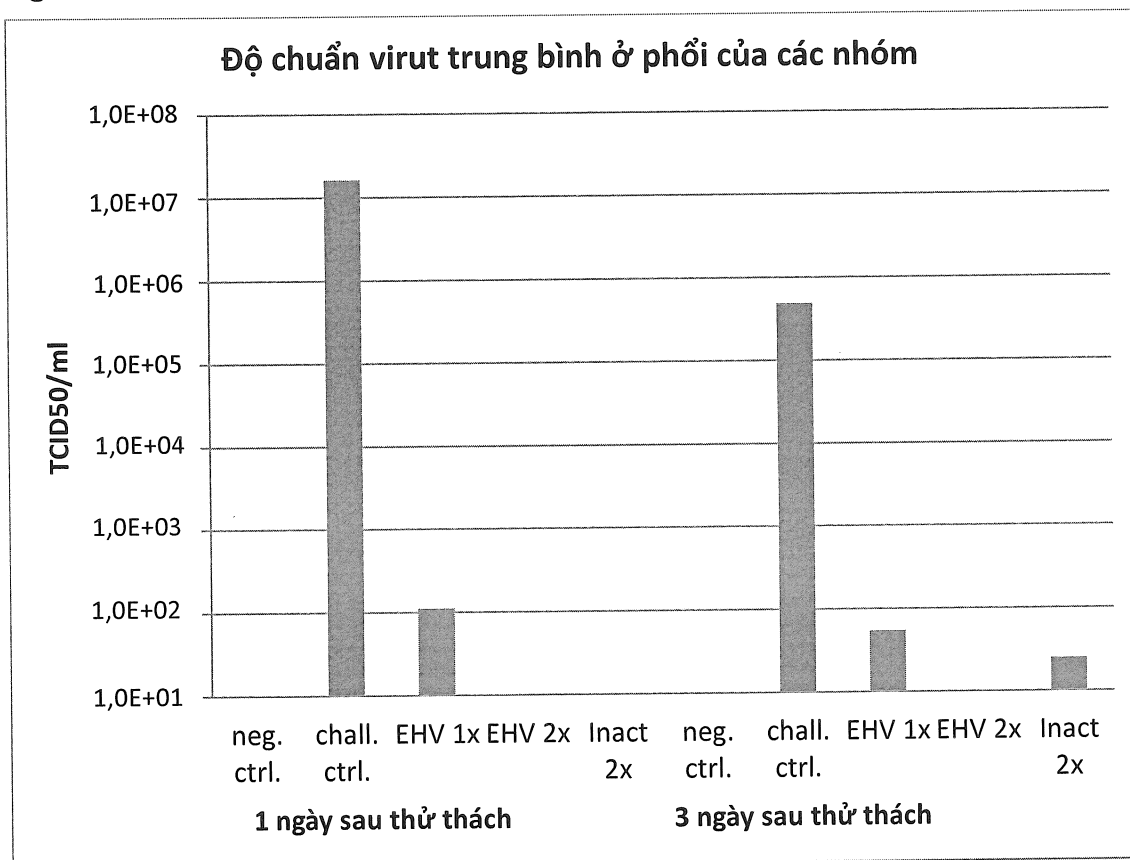
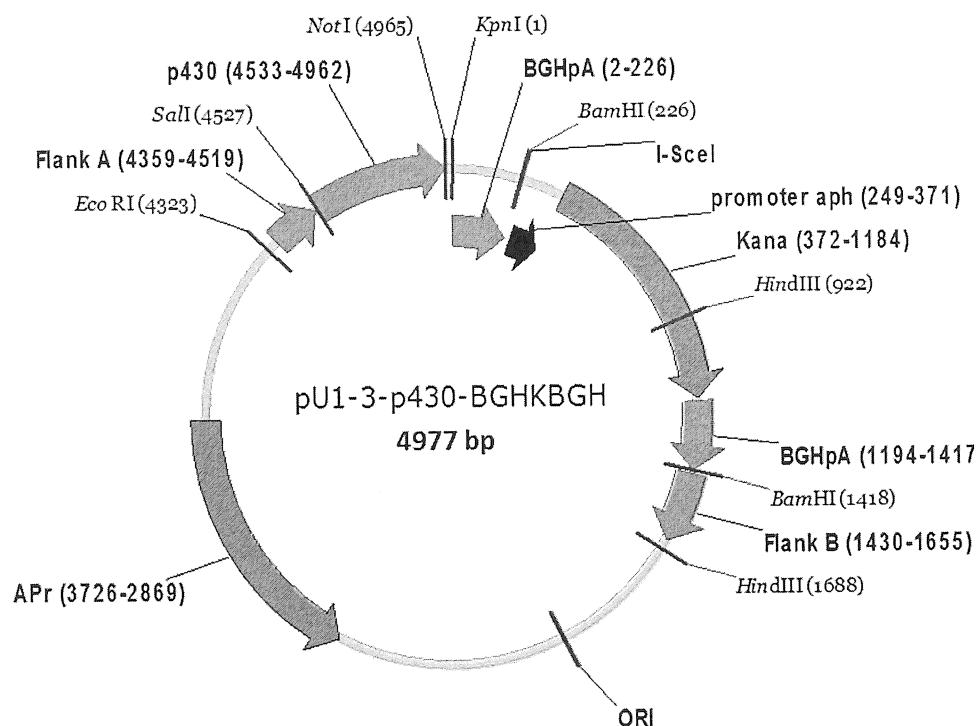
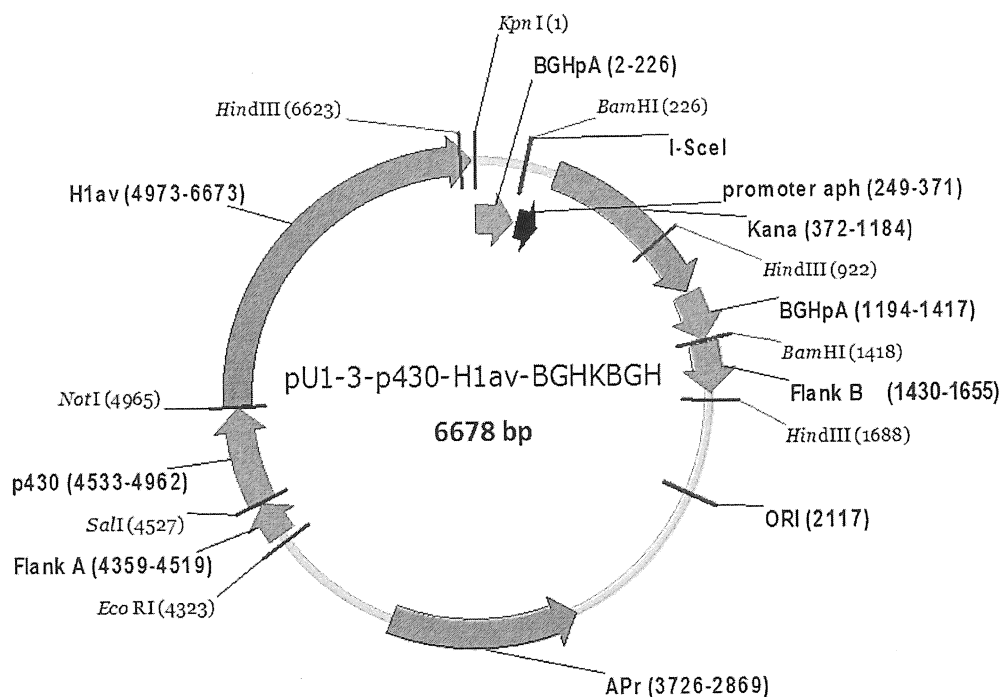


Fig.10



Flank A	trình tự ADN hệ gen virus gắn sườn vị trí gắn chèn ngược chiều
Flank B	trình tự ADN hệ gen virus gắn sườn vị trí gắn chèn xuôi chiều
p430	vùng khởi đầu dẫn hướng sự biểu hiện gen chuyển
BGHPA	trình tự polyadenyl hóa
I-SceI	vị trí phân cắt đối với I-SceI
promoter aph	vùng khởi đầu của sinh vật nhân sơ dẫn hướng sự biểu hiện của gen kháng Kanamycin
Kana	orf kháng Kanamycin
ORI	nguồn gốc sao chép của vectơ plasmit
Apr	gen kháng Ampicillin
EcoRI, SalI, NotI, HindIII, KpnI, BamHI thể hiện các vị trí phân cắt endonucleaza giới hạn	

Fig.11



- Flank A** trình tự ADN hệ gen virus gắn sườn vị trí gắn chèn ngược chiều
- Flank B** trình tự ADN hệ gen virus gắn sườn vị trí gắn chèn xuôi chiều
- p430** vùng khởi đầu dẫn hướng sự biểu hiện gen chuyển
- H1av** gen chuyển (IAV hemagglutinin)
- BGHPA** trình tự polyadenyl hóa
- I-SceI** vị trí phân cắt đối với I-SceI
- promoter aph** vùng khởi đầu của sinh vật nhân sơ dẫn hướng sự biểu hiện của gen kháng Kanamycin
- Kana** orf kháng Kanamycin
- ORI** nguồn gốc sao chép của vector plasmit
- Apr** gen kháng Ampicillin
- EcoRI, SalI, NotI, HindIII, KpnI, BamHI** thể hiện các vị trí phân cắt endonucleaza giới hạn

Fig.12

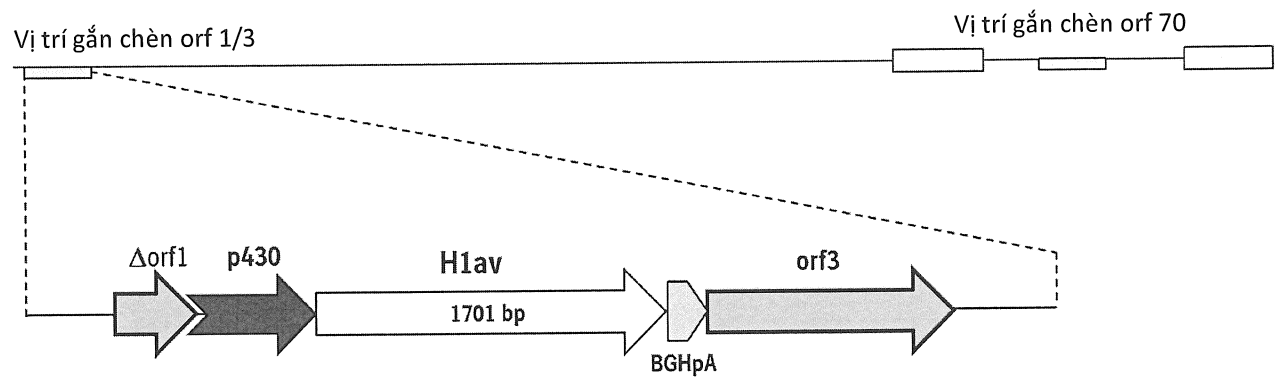


Fig.13

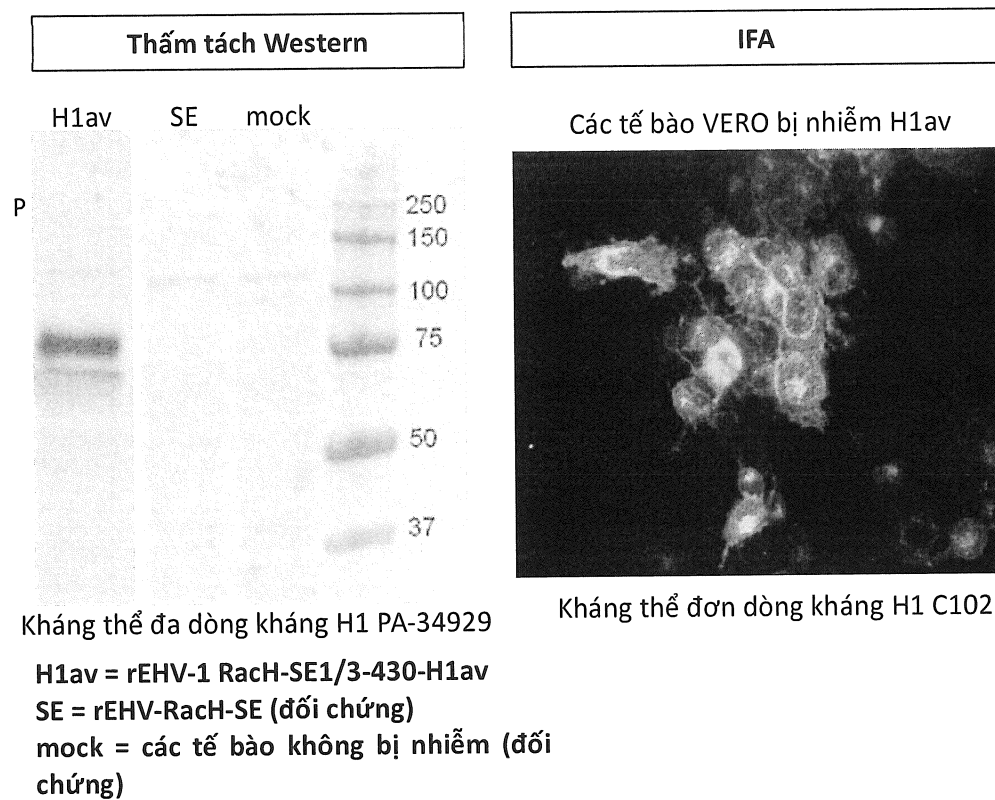


Fig.14:

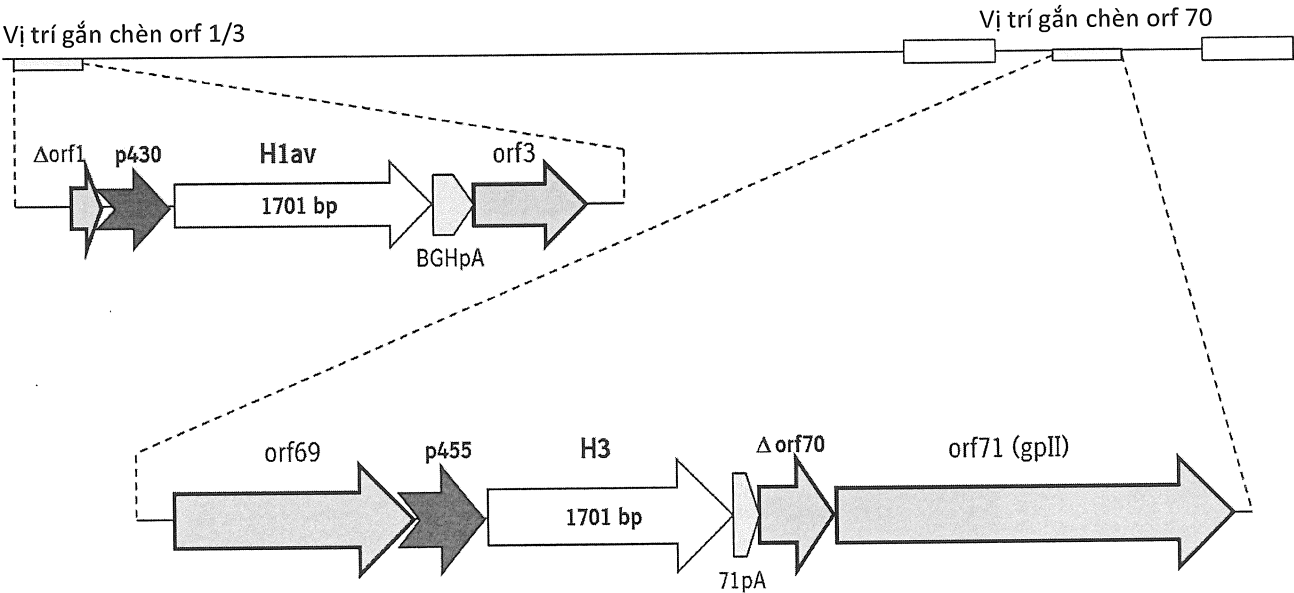


Fig.15:

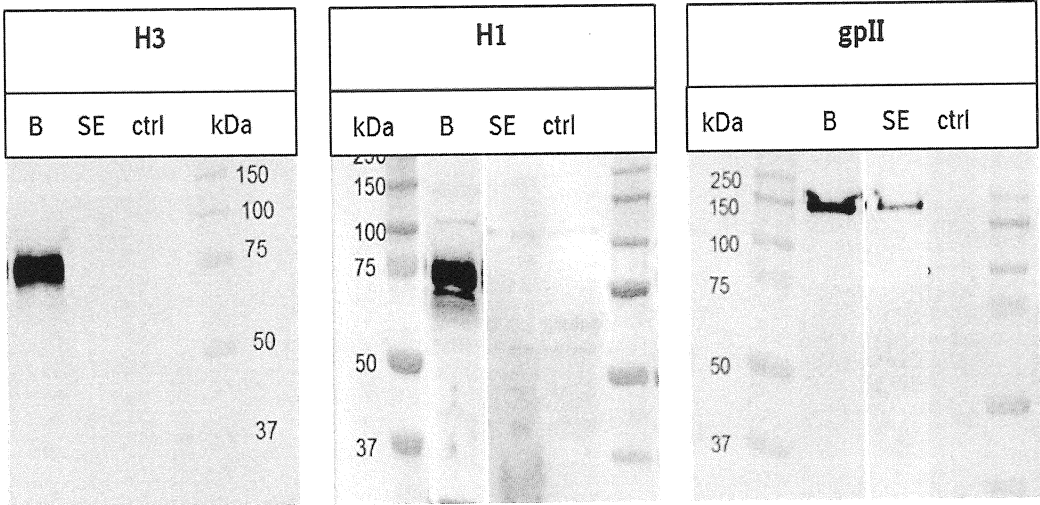


Fig.16

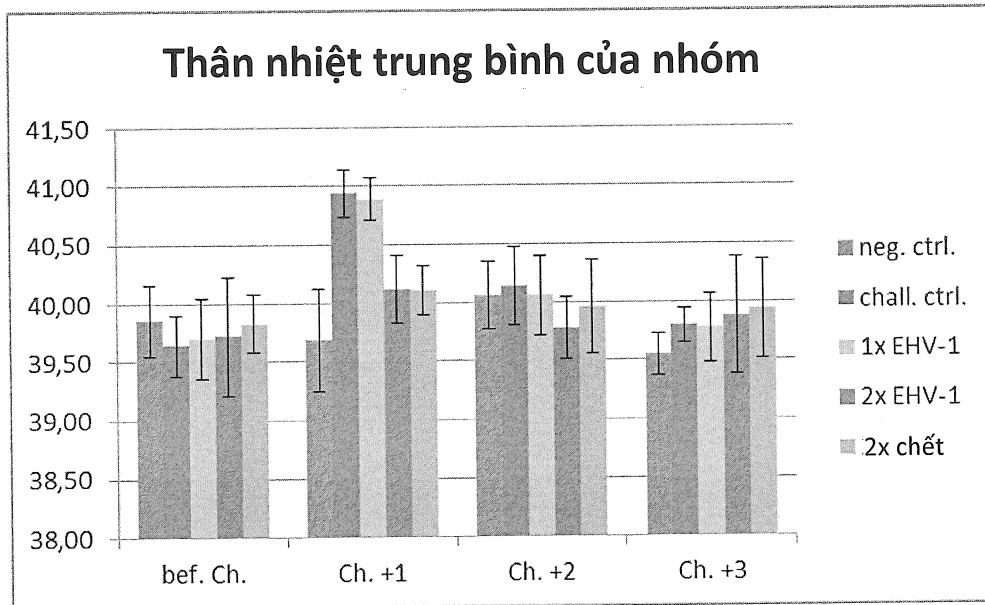


Fig.17

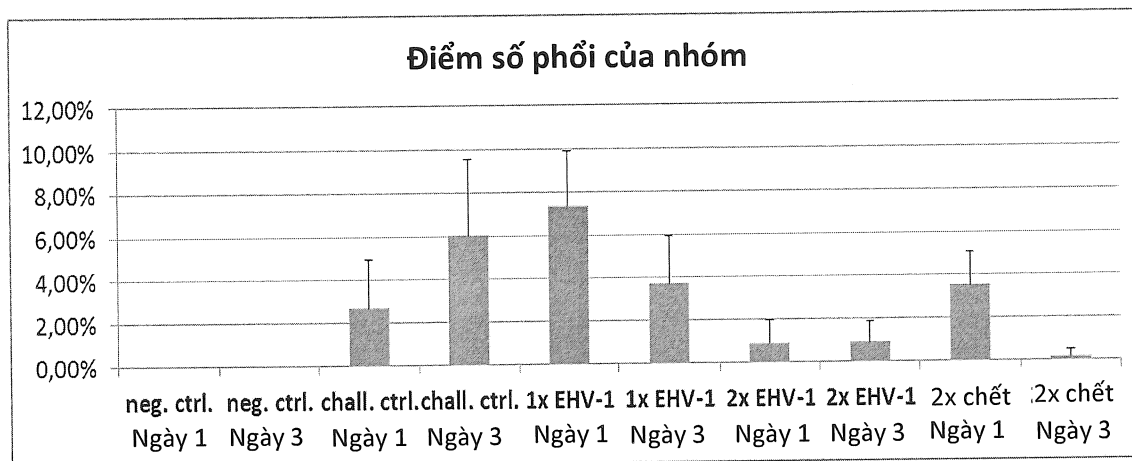


Fig.18

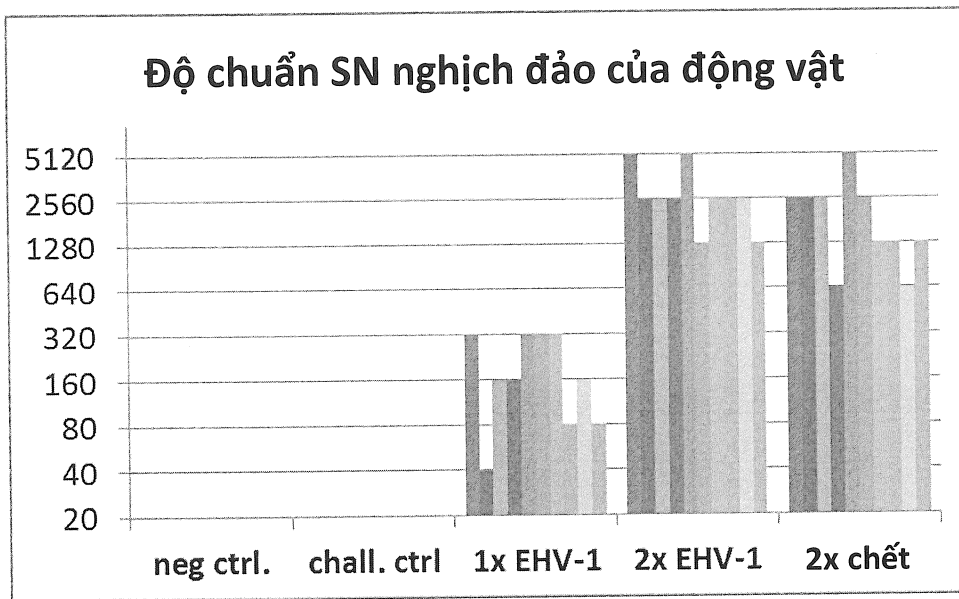


Fig.19

ELISA IL-1 β từ BALF

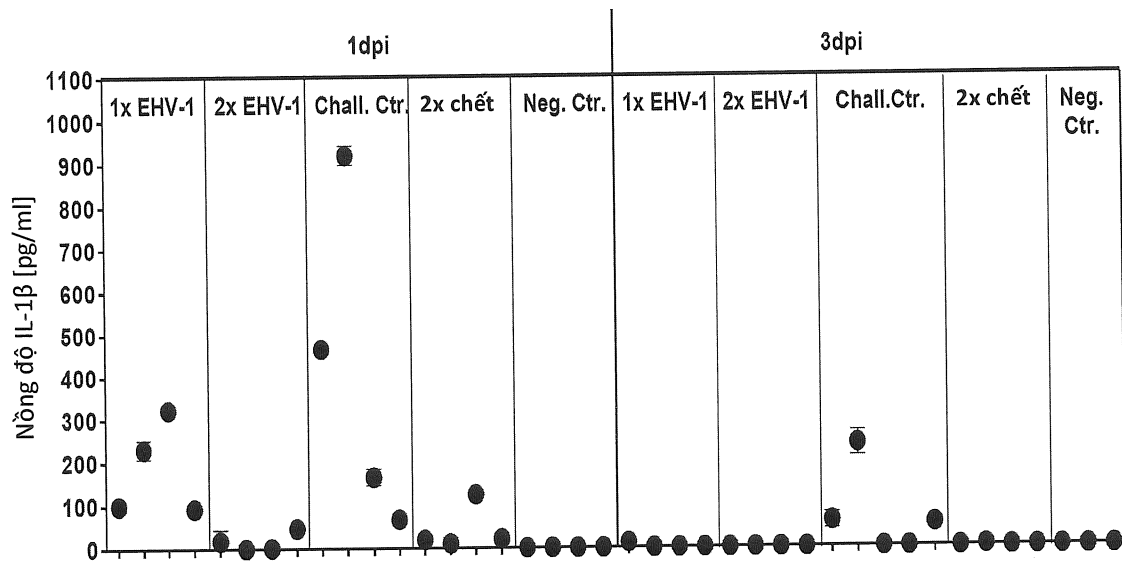
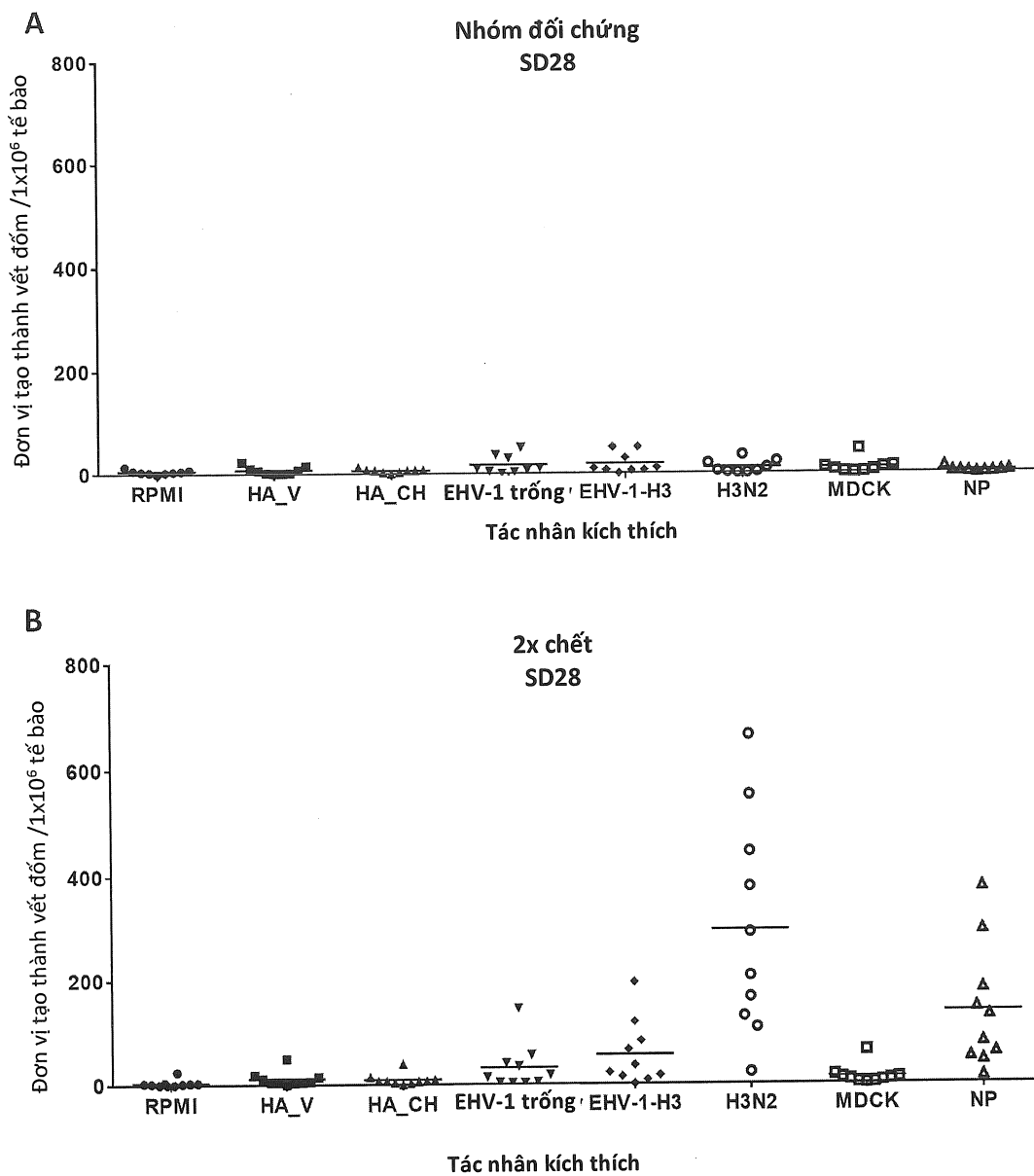


Fig.20



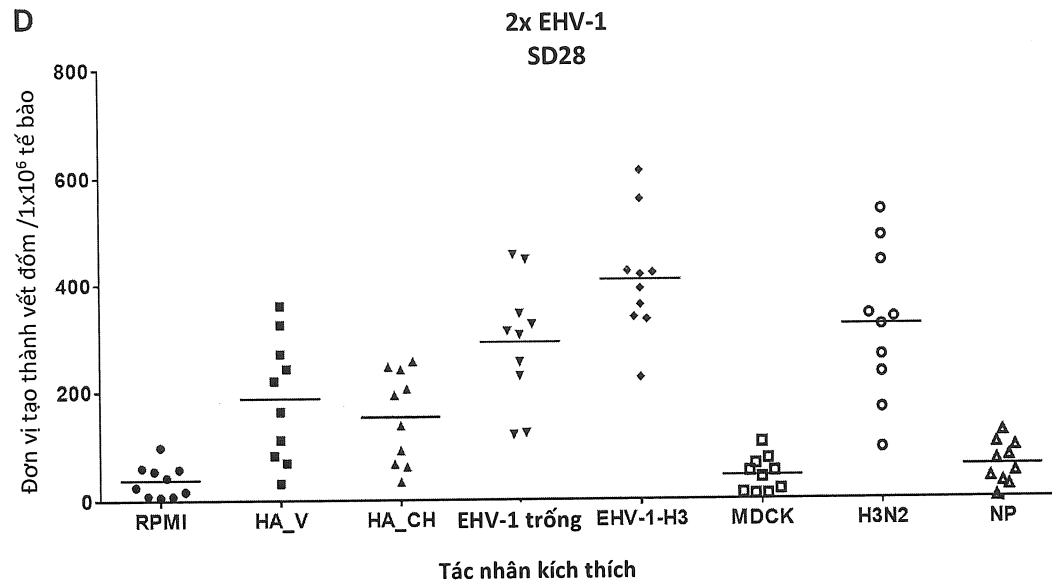
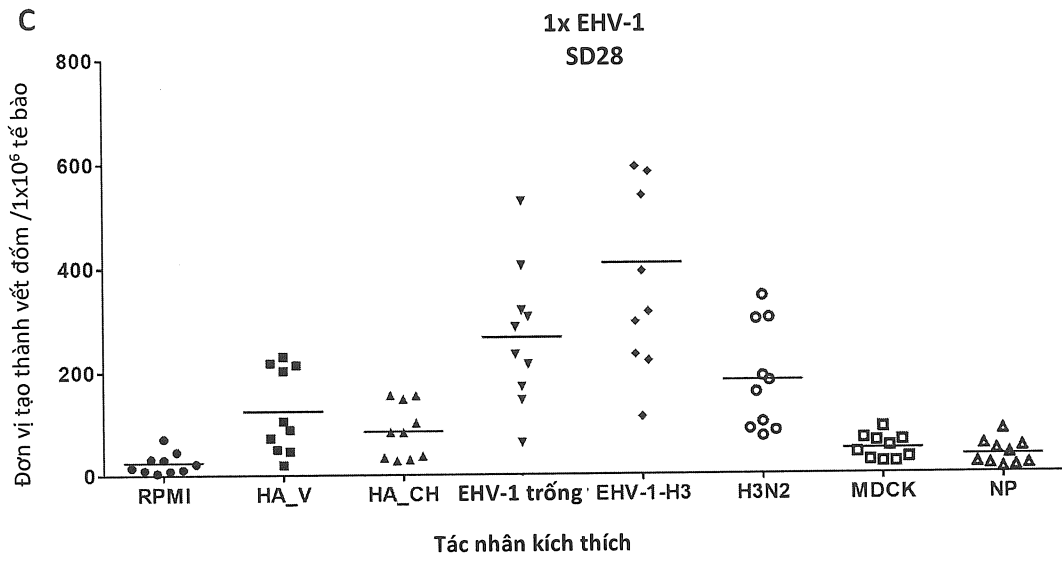
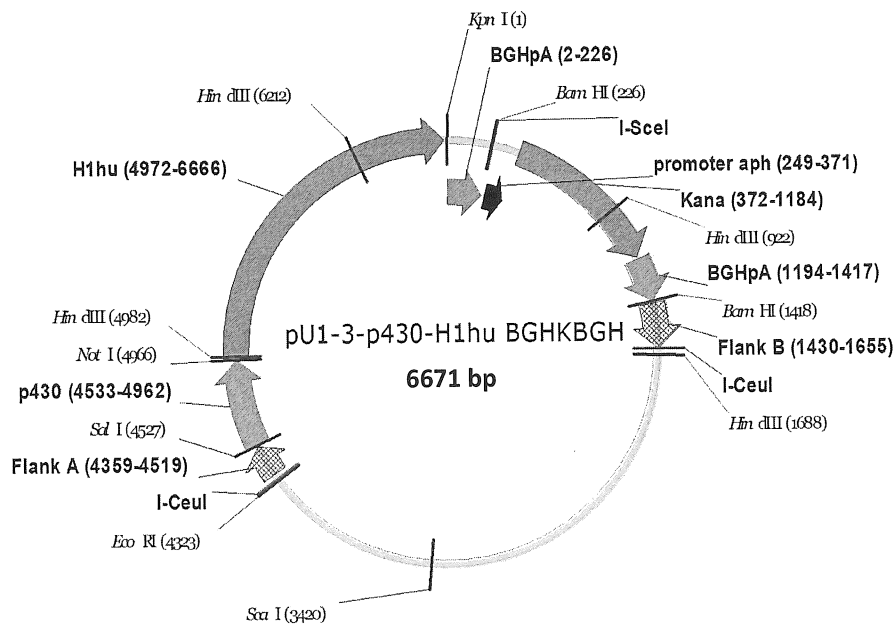
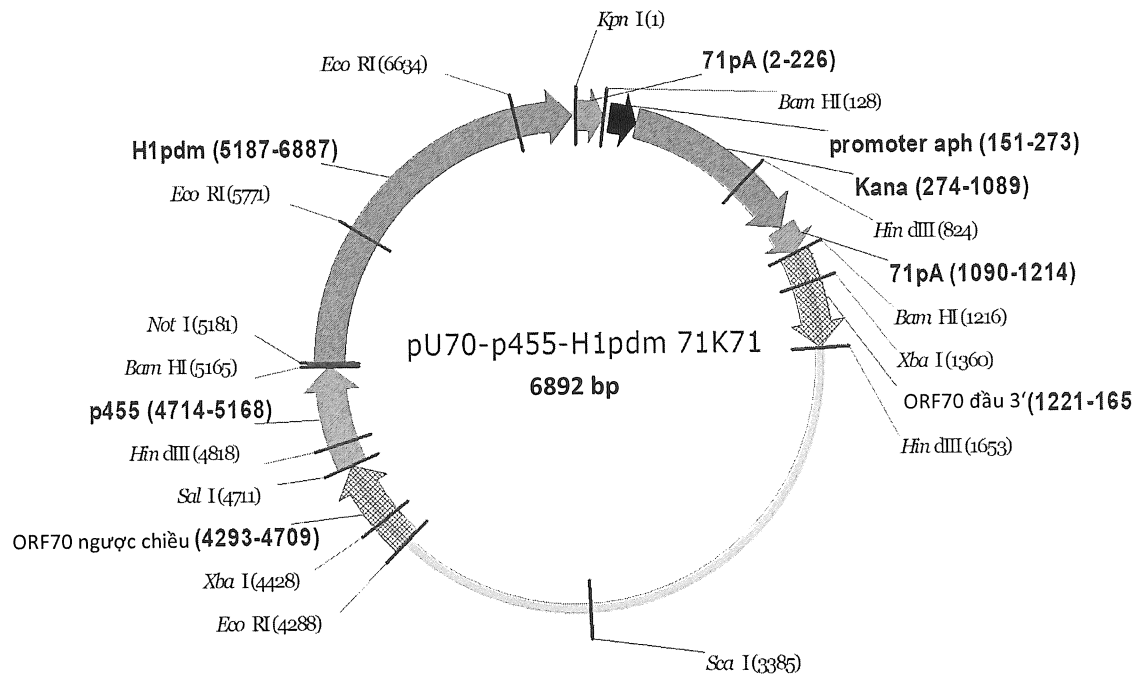


Fig.21:



Flank A	trình tự ADN hệ gen virus gắn sườn vị trí gắn chèn ngược chiều
Flank B	trình tự ADN hệ gen virus gắn sườn vị trí gắn chèn xuôi chiều
p430	vùng khởi đầu dẫn hướng sự biểu hiện gen chuyển
H1hu	gen chuyển (IAV hemagglutinin)
BGHPA	trình tự polyadenyl hóa
I-Sce1	vị trí phân cắt đối với I-Sce1
I-Ceu 1	vị trí phân cắt đối với I-Ceu1
promoter aph	vùng khởi đầu của sinh vật nhân sơ dẫn hướng sự biểu hiện của gen kháng Kanamycin
Kana	orf kháng Kanamycin
ScaI, EcoRI, Sall, NotI, HindIII, KpnI, BamHI	thể hiện các vị trí phân cắt endonucleaza giới hạn

Fig.22:



ORF69 đầu 3'	trình tự ADN hệ gen virus gắn sườn vị trí gắn chèn ngược chiều
ORF70 đầu 3'	trình tự ADN hệ gen virus gắn sườn vị trí gắn chèn xuôi chiều
p455	vùng khởi đầu dẫn hướng sự biểu hiện gen chuyển
H1pdm	gen chuyển (IAV hemagglutinin)
71pA	trình tự polyadenyl hóa
I-Sce1	vị trí phân cắt đối với I-Sce1
promoter aph	vùng khởi đầu của sinh vật nhân sơ dẫn hướng sự biểu hiện của gen kháng Kanamycin
Kana	orf kháng Kanamycin
ScaI, EcoRI, SalI, NotI, HindIII, KpnI, BamHI, XbaI	thể hiện các vị trí phân cắt endonucleaza giới hạn

Fig.23:

Vị trí gắn chèn orf 1/3

Vị trí gắn chèn orf 70

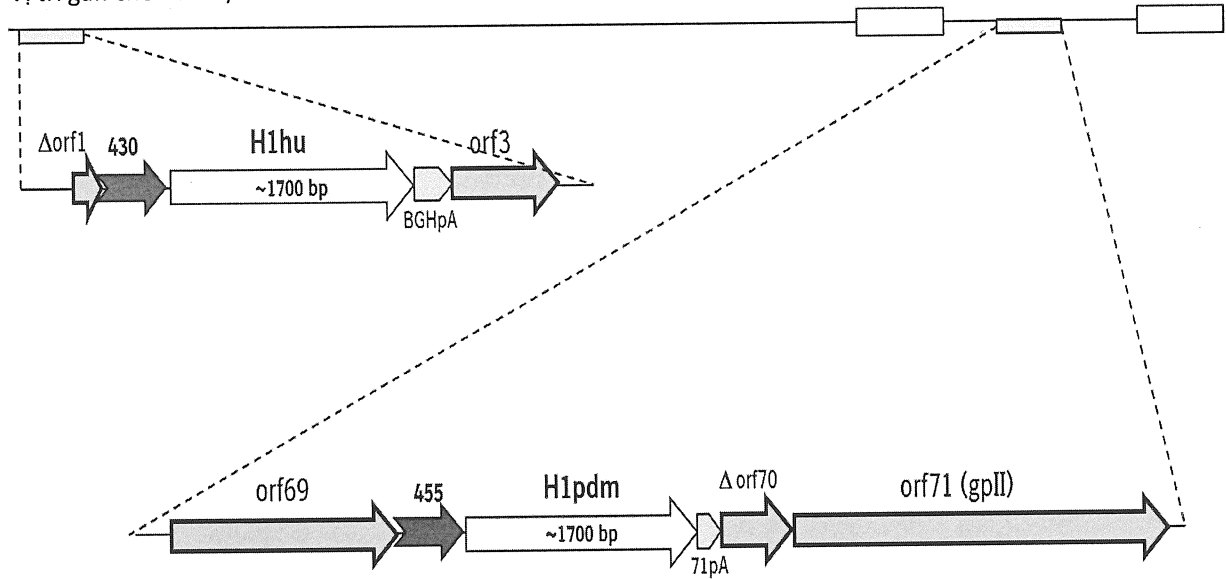
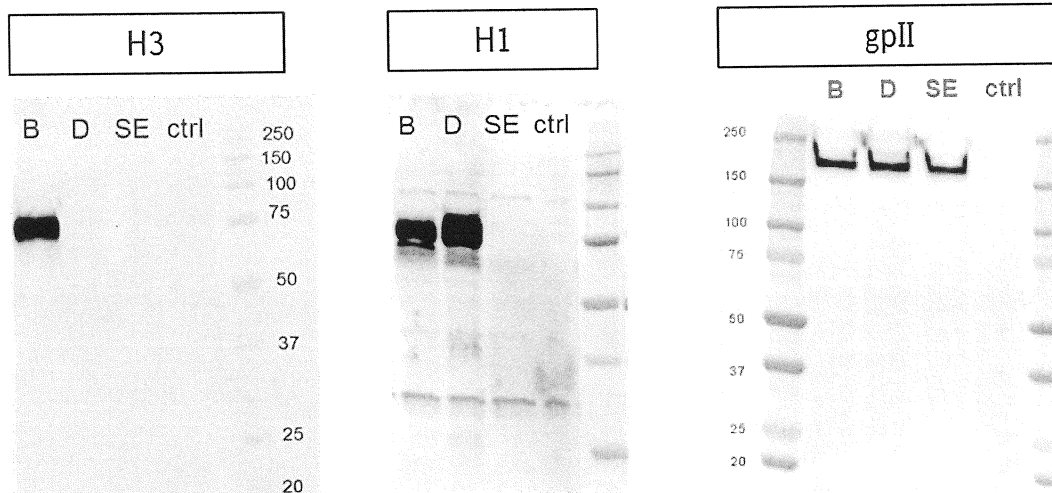
**Fig.24:**

Fig.25:

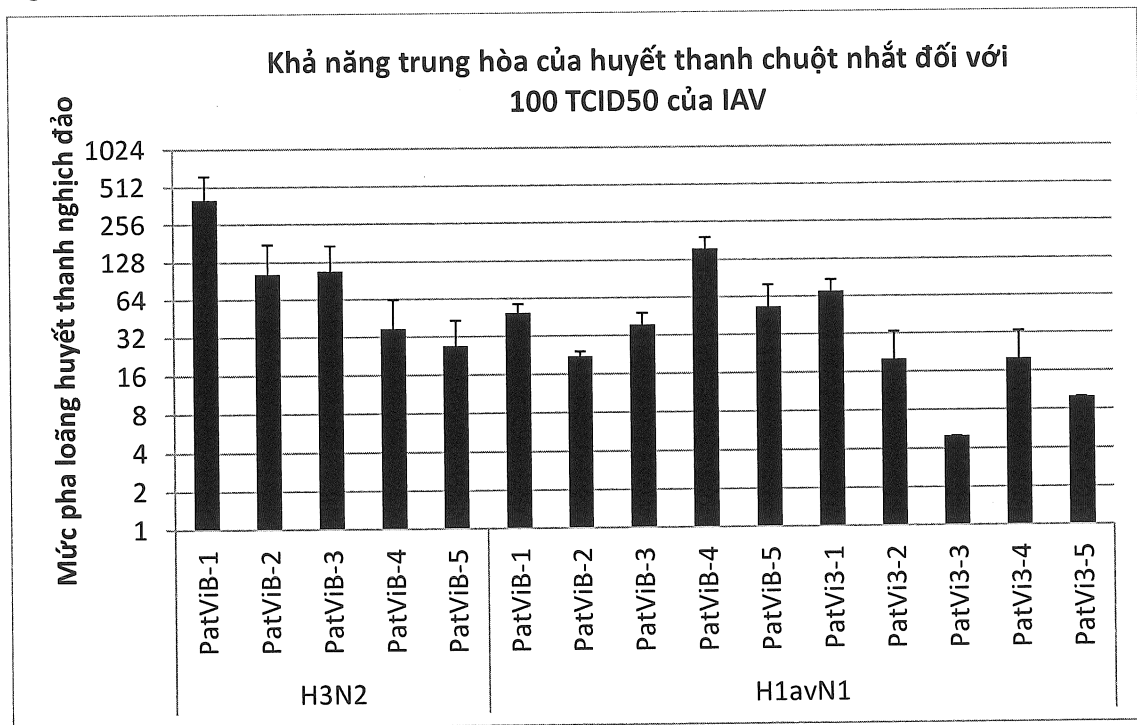


Fig.26:

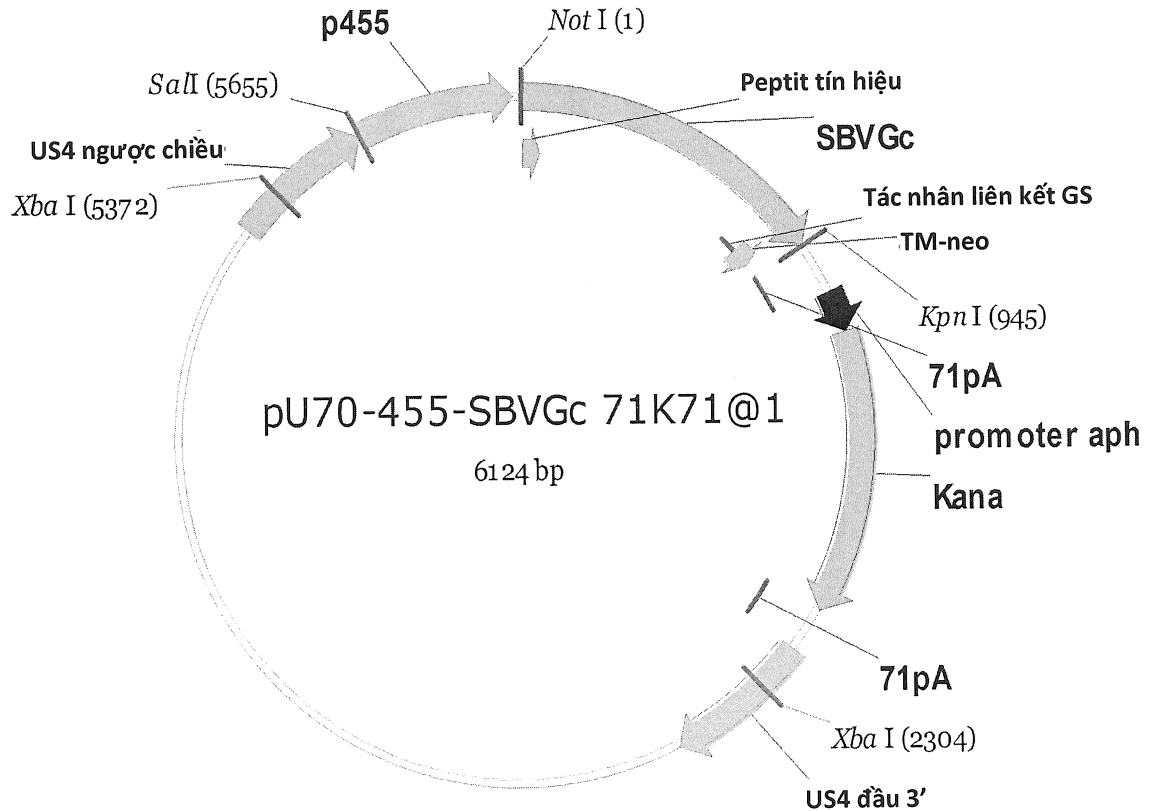
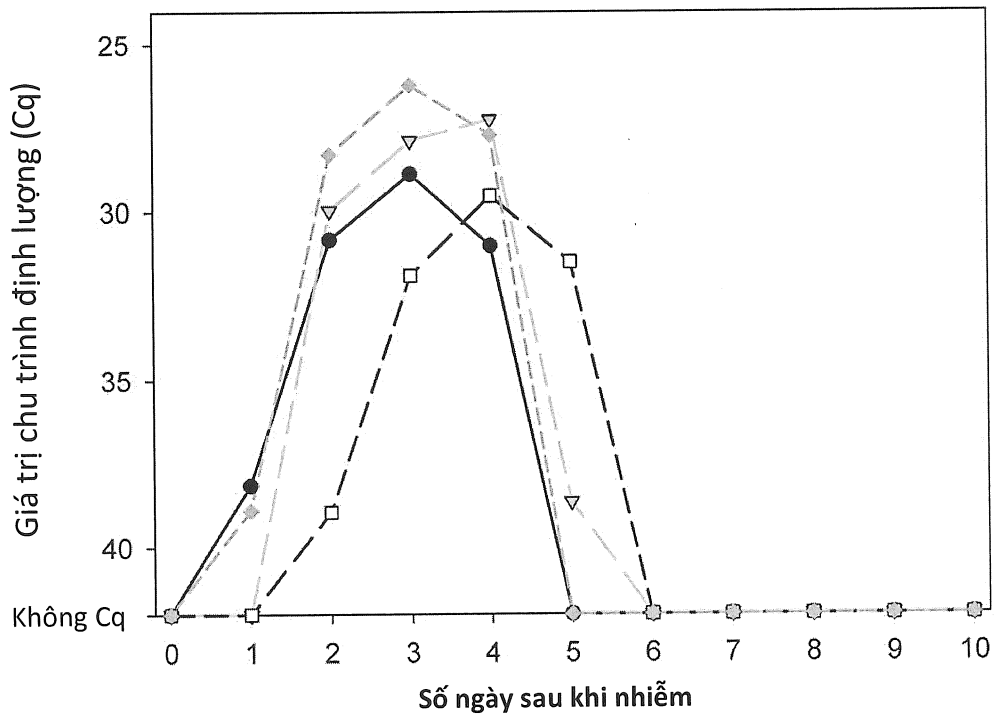


Fig.27:A)

Đối chứng không được chủng ngừa



rEHV-SBV-Gc

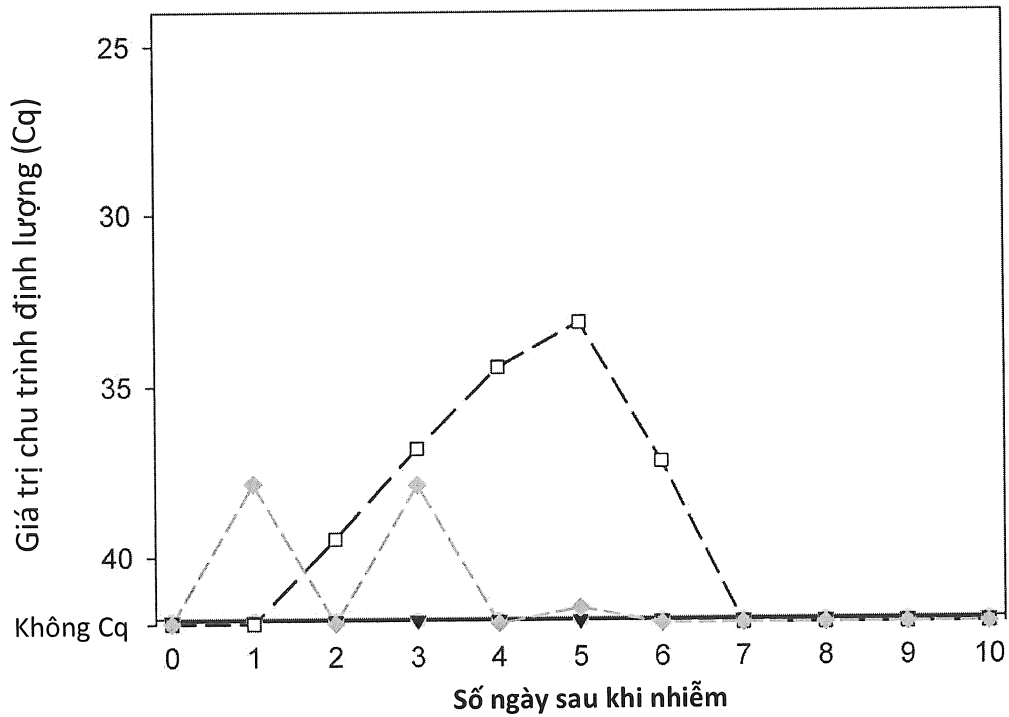


Fig.27:B)

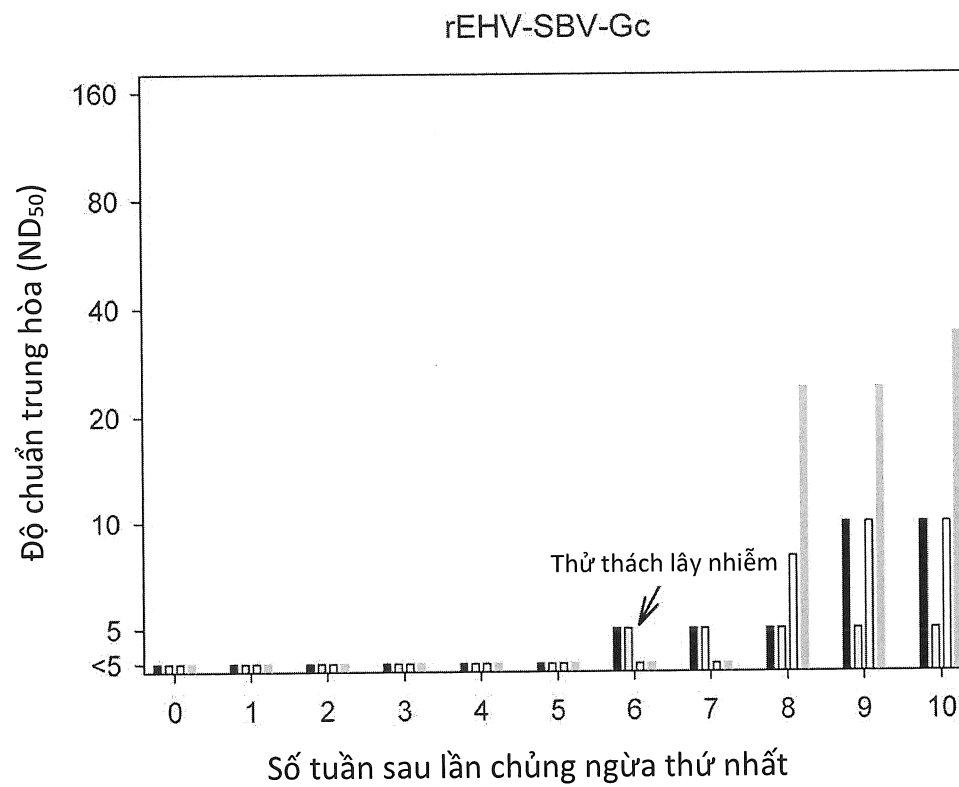
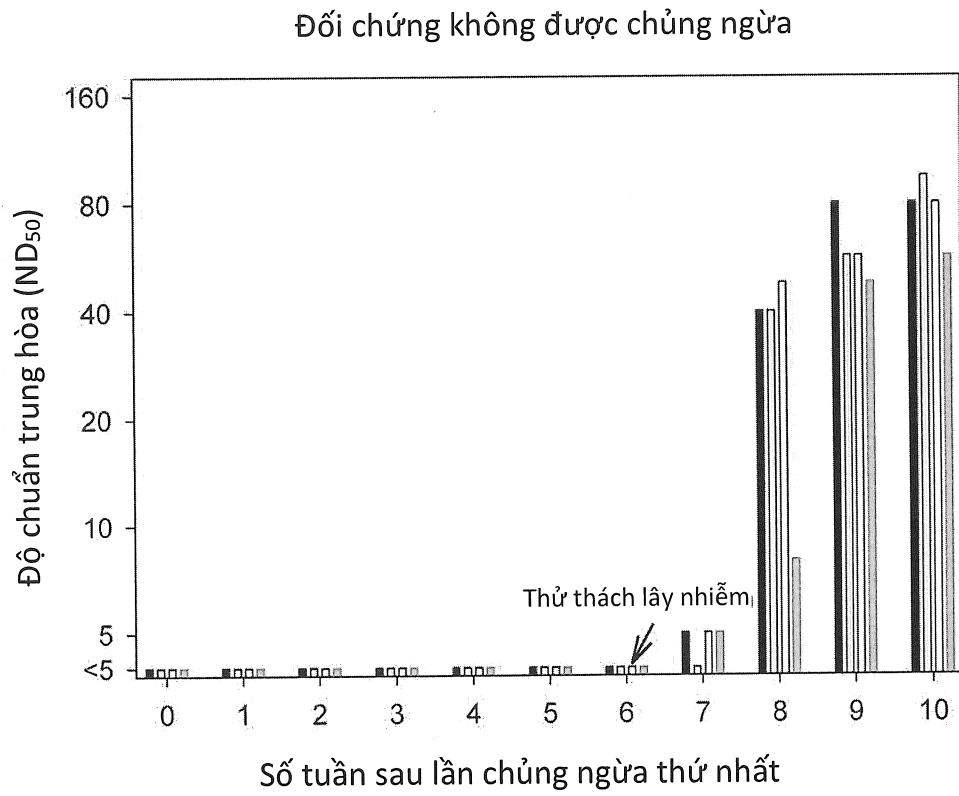


Fig.28:

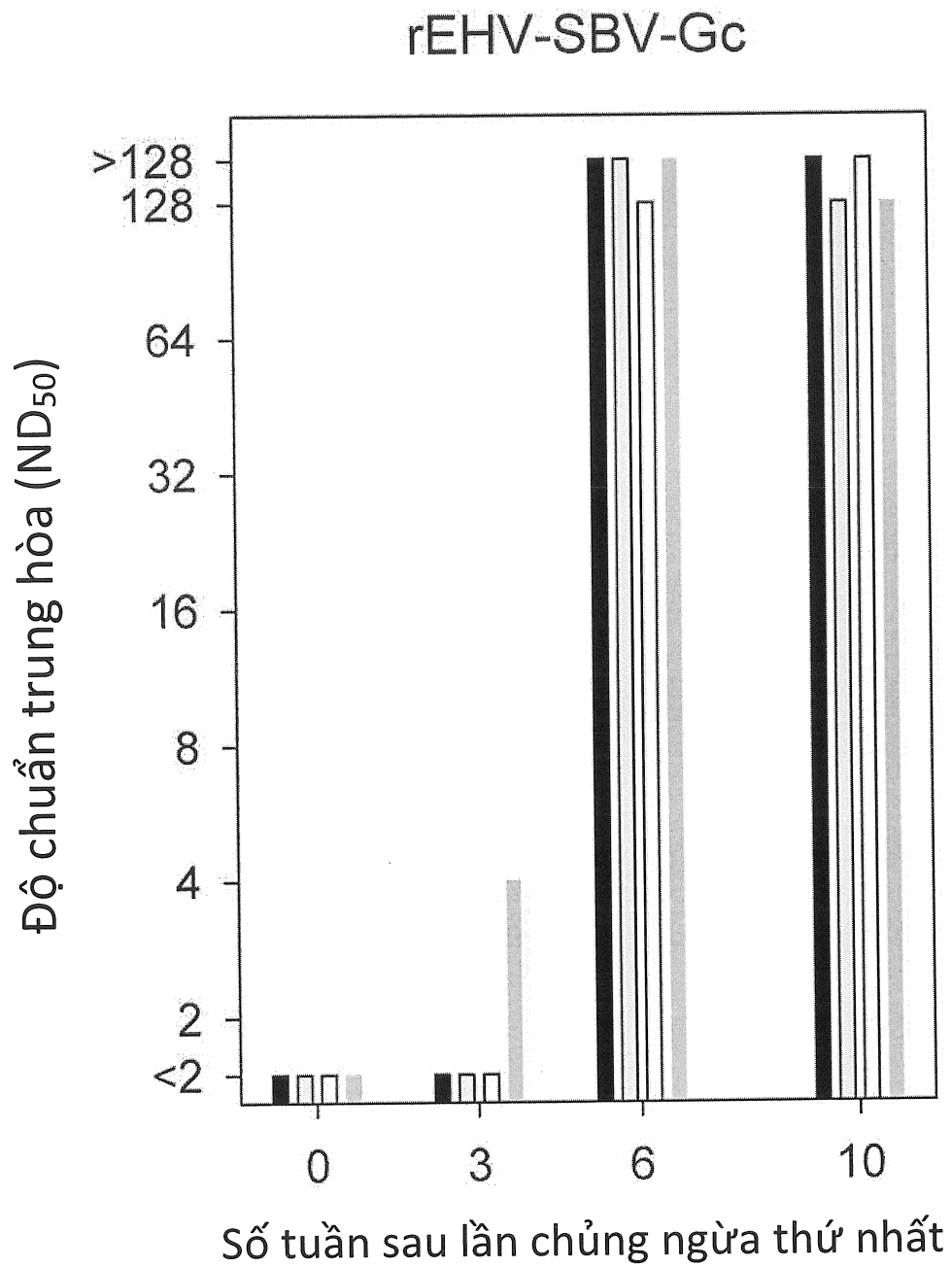


Fig.29:

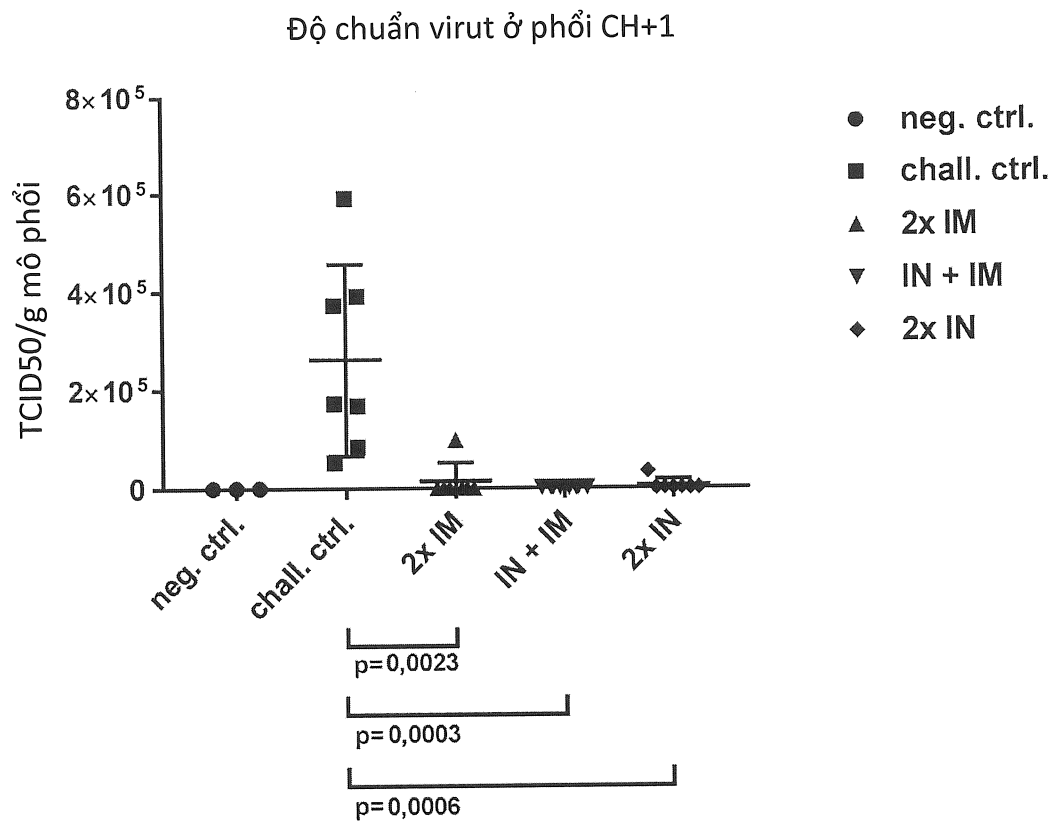


Fig.30:

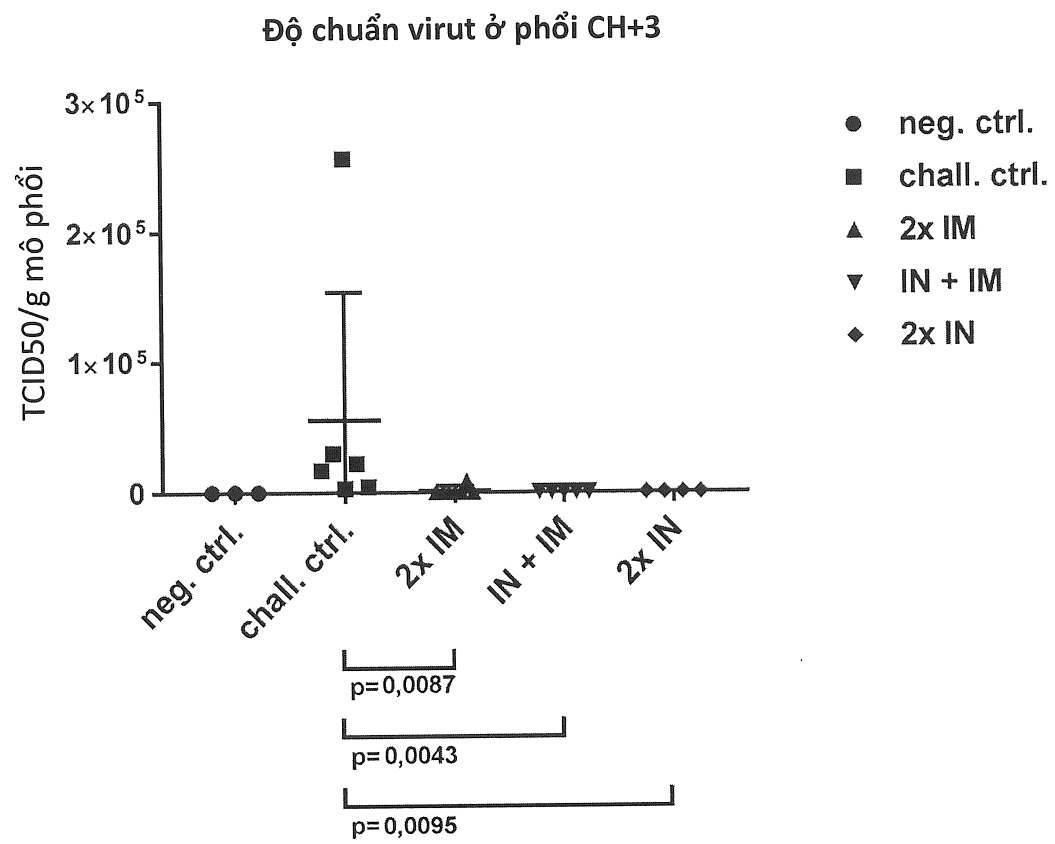


Fig.31:

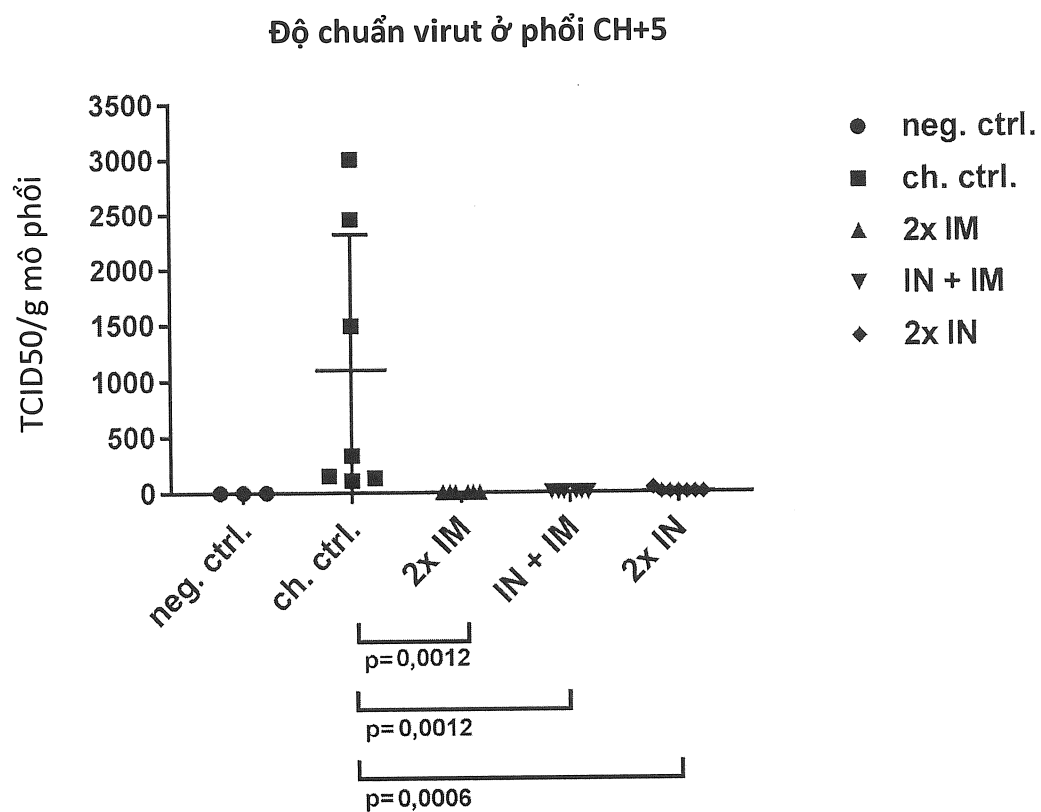


Fig.32:

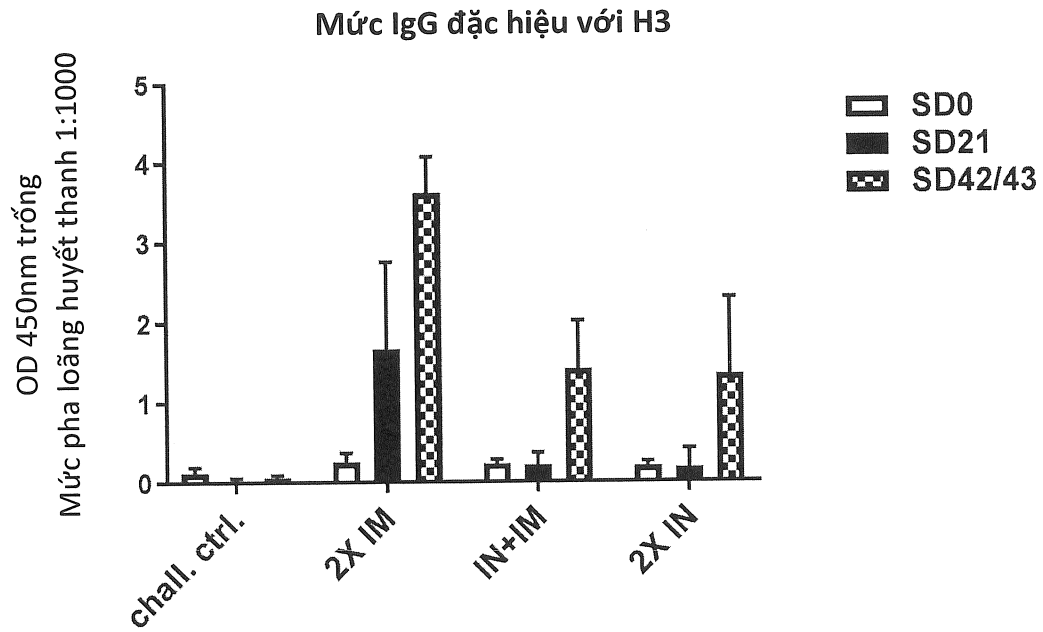


Fig.33:

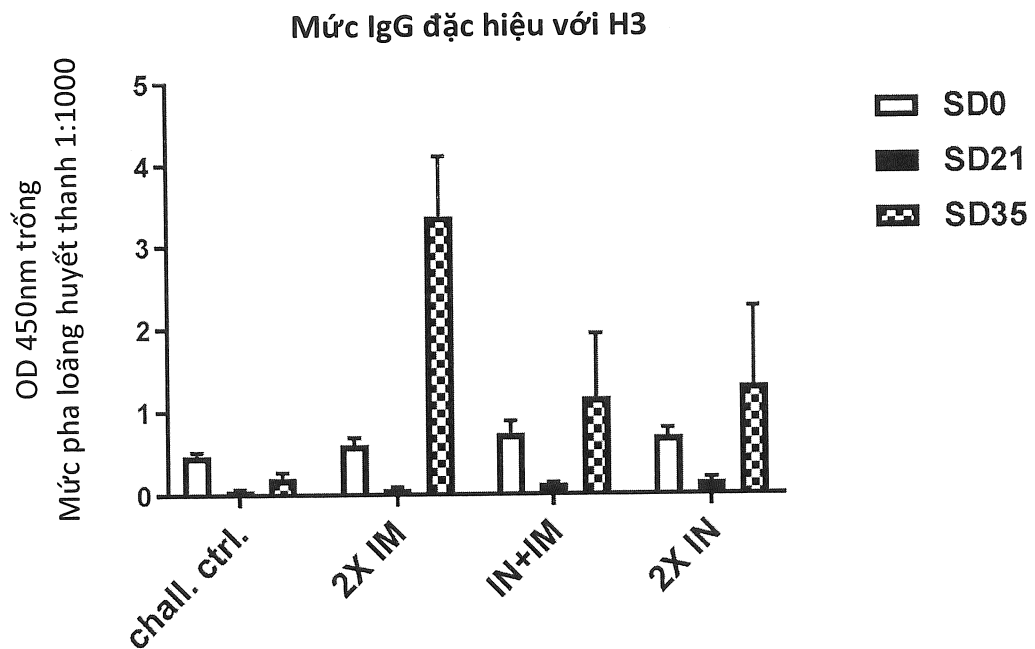


Fig.34:

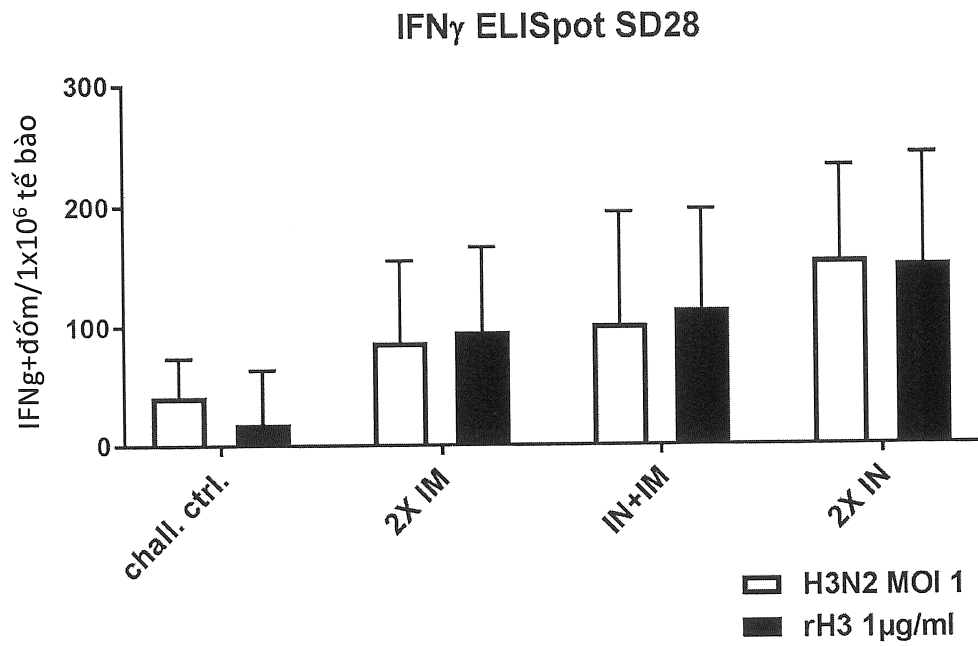
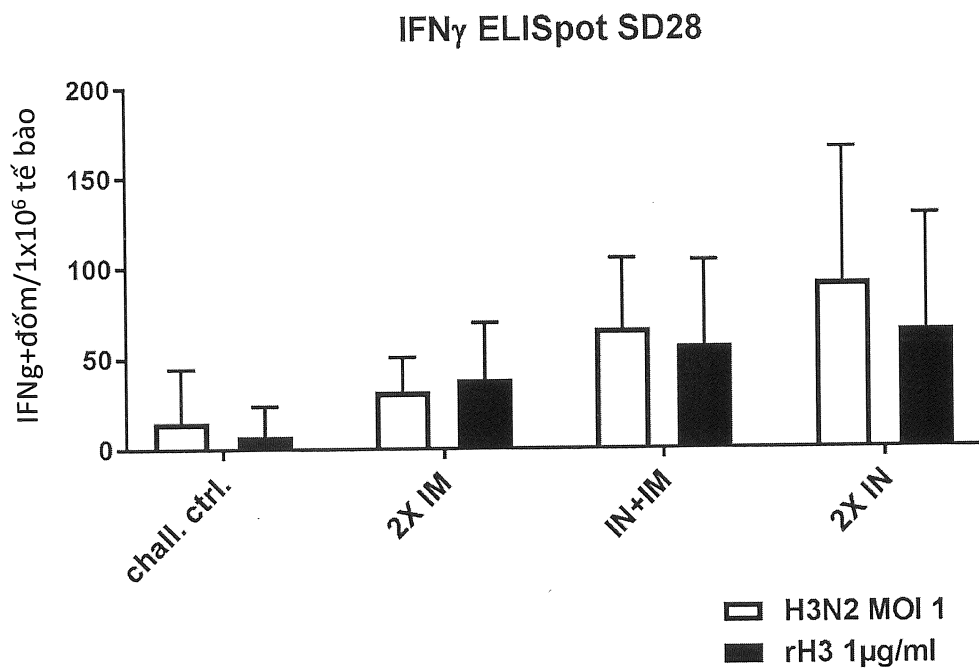


Fig.35:



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH

<120> VECTO EQUID ALPHAHERPESVIRUS 1 (EHV-1) CHỨA CATXET BIỂU HIỆN CHỨA VỊ TRÍ GẮN CHÈN ORF70, CHẾ PHẨM MIỄN DỊCH, VACCIN VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT CHẾ PHẨM MIỄN DỊCH HOẶC VACCIN NÀY

<130> P01-3201 pct

<160> 37

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 600

<212> ADN

<213> Equine herpesvirus 4

<400> 1
gagacttttg gagcagcaca atttccggtt gtggacccca tggaccttgg tttggctggt 60
accgtggaac ctaacgctcc ggaagttttg gccagagcaa aatacaattc gaaggtagac 120
atatggagcg ccggaatagt tctgtttgaa atgctcgcat atccatcaac tctatttgag 180
gacccgccga gtaccccaaca agagtatgta aaaagctgtc attctcaact actgagaata 240
atatcaaagc taaagataaa ccctgaggag tttccacggg aaccagagtc taggctcgtg 300
cgcggtatca tcgaatacgc cagcctagag cgtaagccac atacgcgcta tccttgcttc 360
cagcgcgtga acctacacat tgacggggaa tttttgatcc ataaaatgct agcgttcaat 420
gctgcgatgc gcccatccgc agaagagttg ttgtcctacc caatgtttat gaatctgtag 480
gatgactaac agatttgggg tggagacggc gtgggcgata ctgtataaag ttgtactact 540
taccagccca gtcagtgtgc tgtagtgcca ccacctgtaa agctgtgata agctgcagtt 600

<210> 2

<211> 600

<212> ADN

<213> Equine herpesvirus 4

<400> 2
agctggggga gtttgtacta tagtgtatta catgcggctt gcaataactg cctgggtttat 60
gtttcgcaac attcaagcag acatgctacc gctaaacact ttgcaacaat tttttattgg 120
gtgtttggcc tttggtagaa ctgtcgcggtt tttggtggta gcatatacta cttattttat 180
acgctccgag ctgttttttca gcatgctagc acccaacgcc gagcgagagt atataactcc 240
catcattgcc cacaagctta tgccacttat tagcgtccgc tctgcccgtt gcttagtcat 300
aatatctacc gccgtttacg cagcagacgc tatctgcgac acaattggat ttgcgatacc 360

gcgcattgtgg atgtgtatatt taatgagatc aacctccatg aagcgtaact agggggcctc 420
 ccactgaggc actaccggct tagcagctga ctaacacagt ataaaacgtg agaagaaatc 480
 agtctcatgc gccattagcg ctaggctagt tagcgtggag gaccggagcg ctaccgccag 540
 cagtttcatc cgcttggtta cgggtttggt aacacctacc ggtgttttac cgctaccata 600

<210> 3
 <211> 430
 <212> ADN
 <213> Equine herpesvirus 4

<400> 3
 tctatttgag gacccgccga gtaccccaaca agagtatgta aaaagctgtc attctcaact 60
 actgagaata atatcaaagc taaagataaa ccctgaggag tttccacggg aaccagagtc 120
 taggctcgtg cgcggataca tcgaatacgc cagcctagag cgtaagccac atacgcgcta 180
 tccttgcttc cagcgcgtga acctacacat tgacggggaa tttttgatcc ataaaatgct 240
 agcgttcaat gctgcgatgc gcccatccgc agaagagttg ttgtcctacc caatgtttat 300
 gaatctgtag gatgactaac agatttgggg tggagacggc gtgggcgata ctgtataaag 360
 ttgtactact taccagccca gtcagtgtgc tgtagtgcca ccacctgtaa agctgtgata 420
 agctgcagtt 430

<210> 4
 <211> 449
 <212> ADN
 <213> Equine herpesvirus 4

<400> 4
 ttggtggtag catatactac cttatttata cgctccgagc tgtttttcag catgctagca 60
 cccaacgccg agcgagagta tataactccc atcattgccc acaagcttat gccacttatt 120
 agcgtccgct ctgccgtttg cttagtcata atatctaccg ccgtttacgc agcagacgct 180
 atctgcgaca caattggatt tgcgataccg cgcagtgtgga tgtgtatattt aatgagatca 240
 acctccatga agcgtaacta gggggcctcc cactgaggca ctaccggctt agcagctgac 300
 taacacagta taaaacgtga gaagaaatca gtctcatgcg ccattagcgc taggctagtt 360
 agcgtggagg accggagcgc taccgccagc agtttcatcc gcctgggttac ggggtttgta 420
 acacctaccg gtgtttttacc gctaccata 449

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

<220>
 <223> đoạn mỗi no 1130 specific for orf72

 <400> 5
 tgtctacctt caagcttatg 20

 <210> 6
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi số 1131 đặc hiệu đối với orf72

 <400> 6
 ctagcgagct cgcgttg 17

 <210> 7
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi số 1079 đặc hiệu đối với mCherry

 <400> 7
 gcgaggagga taacatgg 18

 <210> 8
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi số 1080 đặc hiệu đối với mCherry

 <400> 8
 acccttggtc accttcag 18

 <210> 9
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi PCR axit nucleic trình tự nhân tạo số 1017 đối với vùng gắn
 chèn orf70

 <400> 9
 aggtctcgtgc gcggatacat cg 22

 <210> 10
 <211> 22

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi PCR axit nucleic trình tự nhân tạo số 1018 đối với vùng gắn
 chèn orf70

<400> 10
 ttcggggctg ttagactcct cc 22

<210> 11
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi PCR axit nucleic trình tự nhân tạo số 1007 đối với vùng gắn
 chèn orf1/3

<400> 11
 ccaactcgcc gccatgagac cc 22

<210> 12
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi PCR axit nucleic trình tự nhân tạo số 1008 đối với vùng gắn
 chèn orf1/3

<400> 12
 agcgcgcccc gtaccagtg gg 22

<210> 13
 <211> 417
 <212> ADN
 <213> Equine herpesvirus 1

<400> 13
 ctccgagtagc cccagaggag tatgtgaaaa gctgccactc gcaactactg aagataattt 60
 caacgctcaa gataaatccg gaggagtttc ctcgagaccc cgggtcgagg ctcgtagcgcg 120
 gatacatcga gtattctaga ctcgagcgca agccctacac gcgctacccc tgctttcaac 180
 gcgtcaacct gcacattgac ggggagtttc tgggtcacaa gatgctagcg ttcaatgccg 240
 cgatgcgccc atcggccgag gagctgctgt catacccaat gtttgctcaa ctttaggatg 300
 actaacctgt ttctgggagg agacagcgtg ggcgacggtg tataaagttg gtctgctttc 360
 aagccctgcc actgcgctac agtgccacca actgtaaagc ggtagtaagc tgcagtg 417

<210> 14

<211> 431
 <212> ADN
 <213> Equine herpesvirus 1

<400> 14
 gaccctgttg gtgggtgcgg ttggactcag aatcttggcg caggcatgga agtttgtcgg 60
 tgacgaaaca tacgacacca tccgcgcaga agcaaagaat ttagagaccc acgtaccctc 120
 aagtgtcgca gagtcgtctc tagaaaacca atcgacacag gaggagtcta acagccccga 180
 agttgcccac ctgcgaagcg tcaacagcga tgacagtaca cacacggggg gtgcgtcgaa 240
 cggcatccag gactgtgaca gtcagctcaa aactgtgtat gcctgcttgg ctctaattgg 300
 actcggcaca tgtgccatga tagggttgat agtttacatt tgtgtattaa ggtcaaaact 360
 gtcctctcgg aatTTTTTgcg gcgcgcaaaa tgtaaaacat agaaattacc agcgacttga 420
 gtacgttgct t 431

<210> 15
 <211> 417
 <212> ADN
 <213> Equine herpesvirus 1

<400> 15
 ctccgagtag ccagaggag tatgtgaaaa gctgccactc gcaactactg aagataattt 60
 caacgctcaa gataaatccg gaggagtttc ctcgagaccc cgggtcgagg ctcggtgcgcg 120
 gatacatcga gtattctaga ctcgagcgca agccctacac gcgctacccc tgctttcaac 180
 gcgtcaacct gcacattgac ggggagtttc tggttcacia gatgctagcg ttcaatgccg 240
 cgatgcgccc atcggccgag gagctgctgt catacccaat gtttgcacia ctttaggatg 300
 actaacctgt ttctgggagg agacagcggtg ggcgacgggtg tataaagttg gtctgctttc 360
 aagccctgcc actgcgctac agtgccacca actgtaaagc ggtagtaagc tgcagtg 417

<210> 16
 <211> 431
 <212> ADN
 <213> Equine herpesvirus 1

<400> 16
 gaccctgttg gtgggtgcgg ttggactcag aatcttggcg caggcatgga agtttgtcgg 60
 tgacgaaaca tacgacacca tccgcgcaga agcaaagaat ttagagaccc acgtaccctc 120
 aagtgtcgca gagtcgtctc tagaaaacca atcgacacag gaggagtcta acagccccga 180
 agttgcccac ctgcgaagcg tcaacagcga tgacagtaca cacacggggg gtgcgtcgaa 240
 cggcatccag gactgtgaca gtcagctcaa aactgtgtat gcctgcttgg ctctaattgg 300

actcggcaca tgtgccatga tagggttgat agtttacatt tgtgtattaa ggtcaaaact 360
 gtcctctcgg aatttttcgc gcgcgcaaaa tgtaaaacat agaaattacc agcgacttga 420
 gtacgttgct t 431

<210> 17
 <211> 283
 <212> ADN
 <213> Equine herpesvirus 1

<400> 17
 tctagactcg agcgcaagcc ctacacgcgc taccctgct ttcaacgcgt caacctgcac 60
 attgacgggg agtttctggt tcacaagatg ctacggttca atgccgggat gcgcccacg 120
 gccgaggagc tgctgtcata cccaatgttt gctcaacttt aggatgacta acctgtttct 180
 gggaggagac agcgtgggcg acggtgtata aagttggtct gctttcaagc cctgccactg 240
 cgctacagtg ccaccaactg taaagcggta gtaagctgca gtg 283

<210> 18
 <211> 144
 <212> ADN
 <213> Equine herpesvirus 1

<400> 18
 gaccctgttg gtgggtgcgg ttggactcag aatcttggcg caggcatgga agtttgtcgg 60
 tgacgaaaca tacgacacca tccgcgcaga agcaaagaat ttagagacc acgtaccctc 120
 aagtgtgca ggtcgtctc taga 144

<210> 19
 <211> 801
 <212> ADN
 <213> Equine herpesvirus 1

<400> 19
 atgttgactg tcttagcagc cctgagtctg ctacgcttgc ttacgagcgc aaccggacgg 60
 ctgcgccag atgaactctg ttatgccgaa cccgcagaa ctggcagccc accaaacacc 120
 cagcccgaac gccacccgt aatatttgag ccccaacaa ttgcgattaa agctgaatcc 180
 aagggttggtg agctaatttt attagatcca cccatagatg taagctatcg cagagaagat 240
 aaggatgaatg cgtccattgc ttgggttttt gactttggcg cttgccggat gcccatcgca 300
 tacagagagt attacggttg tattggcaat gctgttccct cccagagac ttgtgatgag 360
 tactcattta cccttattag gaccgaggggt atcgtggagt ttaccatcgt aaacatgagc 420
 ctctgttttc agcctggaat atacgatagt ggcaatttta tctacagcgt tctcctggac 480

taccacatat ttacaggacg tgtaacgttg gaagtggaaa aggacacaaa ctatccctgt 540
 ggcatgattc atggactcac tgcttacgga aacatcaacg tagatgaaac catggacaac 600
 gccagcccac acccgcggtgc cgtgggggtgc tttcccgagc ccatcgacaa cgaagcgtgg 660
 gcaaacgtta catttactga attggggata ccagacccaa actcatttct cgatgacgag 720
 ggtgattacc cgaatatatc agactgtcac tcgtgggagt catacaccta cccaaatacg 780
 ctgaggcagg ccacaggacc c 801

<210> 20
 <211> 801
 <212> ADN
 <213> Equine herpesvirus 1

<400> 20
 atgttgactg tcttagcagc tctgagtctg ctgagcttgc ttacgagcgc aaccggacgg 60
 ctgccccag atgaactctg ttatgccgaa ccccgacagaa ctggcagccc accaaacacc 120
 cagcccgaac gccacccgt aatatttgag cccccaacaa ttgcgattaa agctgaatcc 180
 aagggttgtg agctaatttt attagatcca cccatagatg taagctatcg cagagaagat 240
 aagggtgaatg cgtccattgc ttgggttttt gactttggcg cttgccggat gccatcgca 300
 tacagagagt attacggttg tattggcaat gctgttcctt cccagagac ttgtgatgcg 360
 tactcattta cccttattag gaccgagggg atcgtggagt ttaccatcgt aaacatgagc 420
 ctctgttttc agcctggaat atacgatagt ggcaatttta tctacagcgt tctcctggac 480
 taccacatat ttacaggacg tgtaacgttg gaagtggaaa aggacacaaa ctatccctgt 540
 ggcatgattc atggactcac tgcttacgga aacatcaacg tagatgaaac catggacaac 600
 gccagcccac acccgcggtgc cgtgggggtgc tttcccgagc ccatcgacaa cgaagcgtgg 660
 gcaaacgtta catttactga attggggata ccagacccaa actcatttct cgatgacgag 720
 ggtgattacc cgaatatatc agactgtcac tcgtgggagt catacaccta cccaaatacg 780
 ctgaggcagg ccacaggacc c 801

<210> 21
 <211> 4435
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nucleotit của plasmit chuyển pU-mC70-BGH

<400> 21
 tcgcgcgttt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca 60

cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccc tcagggcgcg tcagcgggtg	120
ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc	180
accatatgcg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgcc	240
attcgccatt caggctgcgc aactgttggg aagggcgatc ggtgcgggcc tcttcgctat	300
tacgccagct ggcgaaaggg ggatgtgctg caaggcgatt aagttgggta acgccagggt	360
tttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgaatt cctccgagta ccccagagga	420
gtatgtgaaa agctgccact cgcaactact gaagataatt tcaacgctca agataaatcc	480
ggaggagttt cctcgagacc ccgggtcgag gctcgtgcgc ggatacatcg agtattctag	540
actcgagcgc aagccctaca cgcgctaccc ctgctttcaa cgcgtcaacc tgcacattga	600
cggggagttt ctggttcaca agatgctagc gttcaatgcc gcgatgcgcc catcggccga	660
ggagctgctg tcatacccaa tgtttgctca actttaggat gactaacctg tttctgggag	720
gagacagcgt gggcgacggg gtataaagtt ggtctgcttt caagccctgc cactgcgcta	780
cagtgccacc aactgtaaag cggtagtaag ctgcagtggg cgacatggg agcaagggcg	840
aggaggataa catggccatc atcaaggagt tcatgcgctt caaggcgac atggagggct	900
ccgtgaacgg ccacgagttc gagatcgagg gcgagggcga gggccgcccc tacgagggca	960
cccagaccgc caagctgaag gtgaccaagg gtggccccct gcccttcgcc tgggacatcc	1020
tgtcccctca gttcatgtac ggctccaagg cctacgtgaa gcaccccgcc gacatccccg	1080
actacttgaa gctgtccttc cccgagggct tcaagtggga gcgcgtgatg aacttcgagg	1140
acggcggcgt ggtgaccgtg acccaggact cctccctgca ggacggcgag ttcatctaca	1200
aggtgaagct gcgcggcacc aacttcccct ccgacggccc cgtaatgcag aagaagacca	1260
tgggctggga ggcctcctcc gagcggatgt accccgagga cggcgccctg aagggcgaga	1320
tcaagcagag gctgaagctg aaggacggcg gccactacga cgctgaggtc aagaccacct	1380
acaaggccaa gaagcccgtg cagctgcccc gcgcctacaa cgtcaacatc aagttggaca	1440
tcacctccca caacgaggac tacaccatcg tggaacagta cgaacgcgcc gagggccgcc	1500
actccaccgg cggcatggac gagctgtaca agtaactgtg ccttctagtt gccagccatc	1560
tggtgtttgc cctcccccg tgcccttctt gacctggaa ggtgccactc cactgtcct	1620
ttcctaataa aatgagggaa ttgcatcgca ttgtctgagt aggtgtcatt ctattctggg	1680
gggtgggggtg gggcaggaca gcaaggggga ggattgggaa gacaatagca ggcatgctgg	1740
ggatgcgggtg ggctctatgg atccgacctt gttggtgggt gcggttggaac tcagaatctt	1800
ggcgcaggca tggaagtttg tcggtgacga aacatacgac accatccgcg cagaagcaaa	1860

gaatttagag acccacgtac cctcaagtgc tgcagagtcg tctctagaaa accaatcgac	1920
acaggaggag tctaacagcc ccgaagttgc ccacctgcga agcgtcaaca gcgatgacag	1980
tacacacacg gggggtgcgt cgaacggcat ccaggactgt gacagtcagc tcaaaactgt	2040
gtatgcctgc ttggctctaa ttggactcgg cacatgtgcc atgatagggt tgatagttta	2100
catttgtgta ttaaggtcaa aactgtcctc tcggaatttt tcgcgcgcgc aaaatgtaaa	2160
acatagaaat taccagcgac ttgagtacgt tgcttaagct tggcgtaatc atggcatag	2220
ctgtttcctg tgtgaaattg ttatccgctc acaattccac acaacatacg agccggaagc	2280
ataaagtgta aagcctgggg tgcctaata gaagagtaac tcacattaat tgcgttgccg	2340
tcactgcccg ctttccagtc gggaaacctg tcgtgccagc tgcattaatg aatcggccaa	2400
cgcgcgggga gaggcggttt gcgtattggg cgctcttccg cttcctcgct cactgactcg	2460
ctgcgctcgg tcgttcggct gcggcgagcg gtatcagctc actcaaaggc ggtaatacgg	2520
ttatccacag aatcagggga taacgcagga aagaacatgt gagcaaaagg ccagcaaaag	2580
gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc ataggctccg cccccctgac	2640
gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg actataaaga	2700
taccaggcgt ttccccctgg aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac cctgccgctt	2760
accggatacc tgtccgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg cgctttctca tagctcacgc	2820
tgtaggtatc tcagttcggg taggtcgtt cgctccaagc tgggctgtgt gcacgaaccc	2880
ccggttcagc ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc gtcttgagtc caaccggta	2940
agacacgact tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag agcgaggat	3000
gtaggcggtg ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact acggctacac tagaaggaca	3060
gtatttggtg tctgcgctct gctgaagcca gttacctcg gaaaaagagt tggtagctct	3120
tgatccggca aacaaaccac cgctggtagc ggtggttttt ttgtttgcaa gcagcagatt	3180
acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct tttctacggg gtctgacgct	3240
cagtggaacg aaaactcacg ttaagggatt ttggtcatga gattatcaaa aaggatcttc	3300
acctagatcc ttttaaatta aaaatgaagt tttaaatcaa tctaaagtat atatgagtaa	3360
acttggctcg acagttacca atgcttaatc agtgaggcac ctatctcagc gatctgtcta	3420
tttcgttcat ccatagttgc ctgactcccc gtcgtgtaga taactacgat acgggagggc	3480
ttaccatctg gccccagtgc tgcaatgata ccgcgagacc cacgctcacc ggctccagat	3540
ttatcagcaa taaaccagcc agccggaagg gccgagcgca gaagtgggtcc tgcaacttta	3600

tccgcctcca tccagtctat taattgttgc cggaagcta gagtaagtag ttcgccagtt 3660
 aatagtttgc gcaacgttgt tgccattgct acaggcatcg tgggtgcacg ctctgctgtt 3720
 ggtatggctt cattcagctc cggttcccaa cgatcaaggc gagttacatg atcccccatg 3780
 ttgtgcaaaa aagcgggttag ctcttcgggt cctccgatcg ttgtcagaag taagtggcc 3840
 gcagtgttat cactcatggg tatggcagca ctgcataatt ctcttactgt catgccatcc 3900
 gtaagatgct tttctgtgac tggtgagtac tcaaccaagt cattctgaga atagtgtatg 3960
 cggcgaccga gttgctcttg cccggcgtca atacgggata ataccgcgcc acatagcaga 4020
 actttaaaag tgctcatcat tggaaaacgt tcttcggggc gaaaactctc aaggatctta 4080
 ccgctgttga gatccagttc gatgtaacct actcgtgcac ccaactgac ttcagcatct 4140
 tttactttca ccagcgtttc tgggtgagca aaaacaggaa ggcaaaatgc cgcaaaaaag 4200
 ggaataaggg cgacacggaa atgttgaata ctcatactct tcctttttca atattattga 4260
 agcatttatc agggttattg tctcatgagc ggatacatat ttgaatgtat ttagaaaaat 4320
 aaacaaatag gggttccgcg cacatttccc cgaaaagtgc cacctgacgt ctaagaaacc 4380
 attattatca tgacattaac ctataaaaat aggcgtatca cgaggccctt tcgtc 4435

<210> 22

<211> 5191

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nucleotit của vectơ chuyển pU70-p455-71K71

<400> 22

caataaacgc ggtatgtcta ccttcaagcc tatgatgaac ggatgtttgg tgtttgcggc 60
 tattataacg ctcttgagtt ttatgctatc tctgggaaca tgcgaaaatt acaggcgtgt 120
 ggttcgggat cctagggata acagggtaac cgatttattc aacaaagcca cgttgtgtct 180
 caaaatctct gatgttacat tgcacaagat aaaaatatat catcatgaac aataaaactg 240
 tctgcttaca taaacagtaa tacaaggggt gttatgagcc atattcaacg ggaaacgtct 300
 tgctcgaggc cgcgattaaa ttccaacatg gatgctgatt tatatgggta taaatgggct 360
 cgcgataatg tcgggcaatc aggtgcgaca atctatcgat tgtatgggaa gcccgatgcg 420
 ccagagttgt ttctgaaaca tggcaaagggt agcgttgcca atgatgttac agatgagatg 480
 gtcagactaa actggctgac ggaatttatg cctcttccga ccatcaagca ttttatccgt 540
 actcctgatg atgcatgggt actcaccact gcgatccccg ggaaaacagc attccaggta 600
 ttagaagaat atcctgattc aggtgaaaat attgttgatg cgctggcagt gttcctgcgc 660

cggttgcaatt cgattcctgt ttgtaattgt ccttttaaca gcgatcgcggt atttcgtctc	720
gctcaggcgc aatcacgaat gaataacggt ttgggtgatg cgagtgattt tgatgacgag	780
cgtaatggct ggccctgttga acaagtctgg aaagaaatgc ataagctttt gccattctca	840
cgggattcag tcgtcactca tggtagattt cacttgata accttatttt tgacgagggg	900
aaattaatag gttgtattga tgttggaacg gtcggaatcg cagaccgata ccaggatctt	960
gccatcctat ggaactgcct cggtgagttt tctccttcat tacagaaacg gctttttcaa	1020
aaatatggta ttgataatcc tgatatgaat aaattgcagt ttcatttgat gctcgatgag	1080
tttttctaaa ataaacgcgg tatgtctacc ttcaagccta tgatgaacgg atgtttggtg	1140
tttgcggtc ttataacgct cttgagtttt atgctatctc tgggaacatg cgaaaattac	1200
aggcgtgtgg ttccgggatcc gaccctgttg gtgggtgcgg ttggactcag aatcttggcg	1260
caggcatgga agtttgtcgg tgacgaaaca tacgacacca tccgcgcaga agcaaagaat	1320
ttagagaccc acgtaccctc aagtgtctga gagtcgtctc tagaaaacca atcgacacag	1380
gaggagtcta acagccccga agttgccac ctgcgaagcg tcaacagcga tgacagtaca	1440
cacacggggg gtgcgtcgaa cggcatccag gactgtgaca gtcagctcaa aactgtgtat	1500
gcctgcttgg ctctaattgg actcggcaca tgtgccatga tagggttgat agtttacatt	1560
tgtgtattaa ggtcaaaact gtcctctcgg aatttttcgc gcgcgcaaaa tgtaaaacat	1620
agaaattacc agcgacttga gtacgttgct taagcttggc gtaatcatgg tcatagctgt	1680
ttcctgtgtg aaattgttat ccgctcacia ttccacacia catacgagcc ggaagcataa	1740
agtgtaaagc ctggggtgcc taatgagtga gctaactcac attaatgctg ttgcgctcac	1800
tgcccgcctt ccagtcggga aacctgtcgt gccagctgca ttaatgaatc ggccaacgcg	1860
cggggagagg cggtttgcgt attgggcgct cttccgcttc ctgcgtcact gactcgctgc	1920
gctcggtcgt tcggctgcgg cgagcggat cagctcactc aaaggcggtg atacggttat	1980
ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca	2040
ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt tttccatag gctccgcccc cctgacgagc	2100
atcacaaaaa tcgacgctca agtcagaggt ggcgaaaacc gacaggacta taaagatacc	2160
aggcgtttcc ccttggaagc tccctcgtgc gctctcctgt tccgaccctg ccgcttaccg	2220
gatacctgtc cgcctttctc ccttcgggaa gcgtggcgct ttctcatagc tcacgctgta	2280
ggtatctcag ttccggtgtg gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac gaaccccccg	2340
ttcagcccga ccgctgcgcc ttatccggta actatcgtct tgagtccaac ccggtgaagac	2400

acgacttatc gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag	2460
gcggtgctac agagttcttg aagtggtagc ctaactacgg ctacactaga aggacagtat	2520
ttggtatctg cgctctgctg aagccagtta ccttcggaaa aagagttggg agctcttgat	2580
ccggcaaaaa aaccaccgct ggtagcggtg gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc	2640
gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc tacgggggtct gacgctcagt	2700
ggaacgaaaa ctcacgttaa gggattttgg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct	2760
agatcctttt aaattaaaaa tgaagtttta aatcaatcta aagtatatat gagtaaaactt	2820
ggctctgacag ttaccaatgc ttaatcagtg aggcacctat ctcagcgatc tgtctatttc	2880
gttcatccat agttgcctga ctccccgtcg tgtagataac tacgatacgg gagggcttac	2940
catctggccc cagtgtgca atgataccgc gagaccacg ctcaccggct ccagatttat	3000
cagcaataaa ccagccagcc ggaagggccg agcgcagaag tggctctgca actttatccg	3060
cctccatcca gtctattaat tgttgccggg aagctagagt aagtagttcg ccagttaata	3120
gtttgcgcaa cgttgttgcc attgctacag gcacgtggg gtcacgctcg tcgtttggta	3180
tggcttcatt cagctccggg tccaacgat caaggcgagt tacatgatcc cccatgttgt	3240
gcaaaaaagc ggtagctcc ttccgtcctc cgatcgttgt cagaagtaag ttggccgcag	3300
tgttatcact catggttatg gcagcactgc ataattctct tactgtcatg ccatccgtaa	3360
gatgcttttc tgtgactggg gagtactcaa ccaagtcatt ctgagaatag tgtatgcggc	3420
gaccgagttg ctcttgcccg gcgtcaatac gggataatac cgcgccacat agcagaactt	3480
taaaagtgct catcattgga aaacgttctt cggggcgaaa actctcaagg atcttaccgc	3540
tgttgagatc cagttcgatg taaccactc gtgcacccaa ctgatcttca gcacctttta	3600
ctttcaccag cgtttctggg tgagcaaaaa caggaaggca aaatgccgca aaaaagggaa	3660
taagggcgac acggaaatgt tgaatactca tactcttctt ttttcaatat tattgaagca	3720
tttatcaggg ttattgtctc atgagcggat acatatttga atgtatttag aaaaataaac	3780
aaataggggt tccgcgcaca tttccccgaa aagtgccacc tgacgtctaa gaaaccatta	3840
ttatcatgac attaacctat aaaaataggc gtatcacgag gccctttcgt ctgcgcggtt	3900
tcggtgatga cggtgaaaac ctctgacaca tgcagctccc ggagacggtc acagcttgtc	3960
tgtaagcggg tgccggggagc agacaagccc gtcagggcgc gtcagcgggt gttggcgggt	4020
gtcggggctg gcttaactat gcggcatcag agcagattgt actgagagtg caccatatgc	4080
gggtgtgaaat accgcacaga tgcgtaagga gaaaataccg catcaggcgc cattcgccat	4140
tcaggctgcg caactgttgg gaagggcgat cgggtgcgggc ctcttcgcta ttacgccago	4200

tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt aacgccaggg ttttcccagt 4260
 cacgacgttg taaaacgacg gccagtgaat tcctccgagt accccagagg agtatgtgaa 4320
 aagctgccac tcgcaactac tgaagataat ttcaacgctc aagataaatc cggaggagtt 4380
 tcctcgagac cccgggtcga ggctcgtgcg cggatacatc gagtattcta gactcgagcg 4440
 caagccctac acgcgctacc cctgctttca acgcgtcaac ctgcacattg acggggagtt 4500
 tctggttcac aagatgctag cgttcaatgc cgcgatgcgc ccatcggccg aggagctgct 4560
 gtcataccca atgtttgctc aacttttagga tgactaacct gtttctggga ggagacagcg 4620
 tgggcgacgg tgtataaagt tggctctgctt tcaagccctg ccaactgcgt acagtgccac 4680
 caactgtaaa gcggtagtaa gctgcagtgg tcgactgggt gtagcatata ctaccttatt 4740
 tatacgctcc gagctgtttt tcagcatgct agcaccacaac gccgagcgag agtatataac 4800
 tcccatcatt gccacaagc ttatgccact tattagcgtc cgctctgccg tttgcttagt 4860
 cataatatct accgccgttt acgcagcaga cgctatctgc gacacaattg gatttgcgat 4920
 accgcgcatg tggatgtgta ttttaatgag atcaacctcc atgaagcgta actagggggc 4980
 ctccactga ggcactaccg gcttagcagc tgactaacac agtataaaac gtgagaagaa 5040
 atcagttctca tgcgccatta gcgctaggct agttagcggt gaggaccgga gcgctaccgc 5100
 cagcagtttc atccgcctgg ttacgggttt gttaacacct accggtgttt taccgctacc 5160
 ataggatccg atccatgggc ggccgcggta c 5191

<210> 23

<211> 6892

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nucleotit của plasmit chuyển pU70-p455-H3-71K71

<400> 23

caataaacgc ggtatgtcta cttcaagcc tatgatgaac ggatgtttgg tgtttgcggc 60
 tattataacg ctcttgagtt ttatgctatc tctgggaaca tgcgaaaatt acaggcgtgt 120
 ggttcgggat octagggata acagggtaat cgatttatcc aacaaagcca cgttgtgtct 180
 caaaatctct gatgttacat tgcacaagat aaaaatatat catcatgaac aataaaactg 240
 tctgcttaca taaacagtaa tacaaggggt gttatgagcc atattcaacg ggaaacgtct 300
 tgctcgaggc cgcgattaaa ttccaacatg gatgctgatt tatatgggta taaatgggct 360
 cgcgataatg tcgggcaatc aggtgcgaca atctatcgat tgtatgggaa gcccgatgcg 420

ccagagttgt ttctgaaaca tggcaaaggt agcgttgcca atgatgttac agatgagatg	480
gtcagactaa actggctgac ggaatttatg cctcttccga ccatcaagca ttttatccgt	540
actcctgatg atgcatgggt actcaccact gcgatccccg ggaaaacagc attccaggta	600
ttagaagaat atcctgattc aggtgaaaat attgttgatg cgctggcagt gttcctgcgc	660
cggttgcatt cgattcctgt ttgtaattgt ccttttaaca gcgatcgcgt atttcgtctc	720
gctcaggcgc aatcacgaat gaataacggt ttgggtgatg cgagtgattt tgatgacgag	780
cgtaatggct ggctgttga acaagtctgg aaagaaatgc ataagctttt gccattctca	840
ccggattcag tcgtcactca tggtgatttc tcacttgata accttatttt tgacgagggg	900
aaattaatag gttgtattga tgttgacga gtcggaatcg cagaccgata ccaggatctt	960
gccatcctat ggaactgcct cggtgagttt tctccttcat tacagaaacg gctttttcaa	1020
aaatatggta ttgataatcc tgatatgaat aaattgcagt ttcatttgat gctcgatgag	1080
tttttctaaa ataaacgcgg tatgtctacc ttcaagccta tgatgaacgg atgtttgggtg	1140
tttgoggcta ttataacgct cttgagtttt atgctatctc tgggaacatg cgaaaattac	1200
aggcgtgtgg ttcgggatcc gaccctgttg gtgggtgcgg ttggactcag aatcttggcg	1260
caggcatgga agtttgcgg tgacgaaaca tacgacacca tccgcgcaga agcaaagaat	1320
ttagagaccc acgtaccctc aagtgcgtga gagtcgtctc tagaaaacca atcgacacag	1380
gaggagtcta acagccccga agttgccac ctgcgaagcg tcaacagcga tgacagtaca	1440
cacacggggg gtgcgtcgaa cggcatccag gactgtgaca gtcagctcaa aactgtgtat	1500
gcctgcttgg ctctaattgg actcggcaca tgtgcatga tagggttgat agtttacatt	1560
tgtgtattaa ggtcaaaact gtccctctcg aatttttcgc gcgcgcaaaa tgtaaaacat	1620
agaaattacc agcgacttga gtacgttgct taagcttggc gtaatcatgg tcatagctgt	1680
ttcctgtgtg aaattgttat ccgctcacia ttccacacia catacgagcc ggaagcataa	1740
agtgtaaagc ctggggtgcc taatgagtga gctaactcac attaattgcg ttgcgctcac	1800
tgcccgcctt ccagtcggga aacctgtcgt gccagctgca ttaatgaatc ggccaacgcg	1860
cggggagagg cggtttgcgt attgggcgt cttccgcttc ctgcgtcact gactcgtgc	1920
gctcggtcgt tcggctgcgg cgagcggat cagctcactc aaaggcggta atacggttat	1980
ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca	2040
ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc	2100
atcacaaaaa tcgacgtca agtcagaggt ggcgaaaccc gacaggacta taaagatacc	2160
aggcgtttcc ccctggaagc tccctcgtgc gctctcctgt tccgaccctg ccgcttaccg	2220

gatacctgtc cgcctttctc ccttcgggaa gcgtggcgct ttctcatagc tcacgctgta	2280
ggatatctcag ttcgggtgtag gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac gaaccccccg	2340
ttcagccccga ccgctgcgcc ttatccggta actatcgtct tgagtccaac ccggtgaagac	2400
acgacttatc gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag	2460
gcggtgctac agagtctctg aagtgggtggc ctaactacgg ctacactaga aggacagtat	2520
ttggatatctg cgctctgctg aagccagtta ccttcggaaa aagagttggg agctcttgat	2580
ccggcaaaaa aaccaccgct ggtagcggtg gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc	2640
gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc tacgggggtct gacgctcagt	2700
ggaacgaaaa ctcacgttaa gggatttttg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct	2760
agatcctttt aaattaaaaa tgaagtttta aatcaatcta aagtatatat gagtaaactt	2820
ggctctgacag ttaccaatgc ttaatcagtg aggcacctat ctcagcgatc tgtctatttc	2880
gttcatccat agttgcctga ctccccgtcg tgtagataac tacgatacgg gagggcttac	2940
catctggccc cagtgtctga atgataccgc gagaccacg ctcaccggct ccagatttat	3000
cagcaataaa ccagccagcc ggaagggccg agcgcagaag tggtcctgca actttatccg	3060
cctccatcca gtctattaat tgttgccggg aagctagagt aagtagttcg ccagttaata	3120
gtttgcgcaa cgttgttgcc attgctacag gcacgtggg gtcacgctcg tcgtttggta	3180
tggcttcatt cagctccggt tccaacgat caaggcgagt tacatgatcc cccatgttgt	3240
gcaaaaaagc ggtagctcc ttcggtcctc cgatcgttgt cagaagtaag ttggccgcag	3300
tgttatcact catggttatg gcagcactgc ataattctct tactgtcatg ccatccgtaa	3360
gatgcttttc tgtgactggg gagtactcaa ccaagtcatt ctgagaatag tgtatgcggc	3420
gaccgagttg ctcttgcccc gcgtcaatac gggataatac cgcgccacat agcagaactt	3480
taaaagtgct catcattgga aaacgttctt cggggcgaaa actctcaagg atcttaccgc	3540
tgttgagatc cagttcgatg taaccactc gtgcaccaa ctgatcttca gcatctttta	3600
ctttcaccag cgtttctggg tgagcaaaaa caggaaggca aaatgccgca aaaaagggaa	3660
taagggcgac acggaaatgt tgaatactca tactcttcct ttttcaatat tattgaagca	3720
tttatcaggg ttattgtctc atgagcggat acatatttga atgtatttag aaaaataaac	3780
aaataggggt tccgcgcaca tttccccgaa aagtgccacc tgacgtctaa gaaaccatta	3840
ttatcatgac attaacctat aaaaataggc gtatcacgag gccctttcgt ctgcgcggtt	3900
tcgggtgatga cggtgaaaac ctctgacaca tgcagctccc ggagacggtc acagcttgtc	3960

tgtaagcggga tgccggggagc agacaagccc gtcagggcgcc gtcagcgggt gttggcgggt	4020
gtcgggggctg gcttaactat gcggcatcag agcagattgt actgagagtg caccatatgc	4080
ggtgtgaaat accgcacaga tgcgtaagga gaaaataccg catcaggcgc cattcgccat	4140
tcaggctgcg caactgttgg gaagggcgat cgggtgcgggc ctcttcgcta ttacgccagc	4200
tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt aacgccaggg ttttcccagt	4260
cacgacgttg taaaacgacg gccagtgaat tcctccgagt accccagagg agtatgtgaa	4320
aagctgccac tcgcaactac tgaagataat ttcaacgctc aagataaatc cggaggagt	4380
tcctcgagac cccgggtcga ggctcgtgcg cggatacatc gagtattcta gactcgagcg	4440
caagccctac acgcgctacc cctgctttca acgcgtcaac ctgcacattg acggggagt	4500
tctggttcac aagatgctag cgttcaatgc cgcgatgcgc ccatcggccg aggagctgct	4560
gtcataccca atgtttgtc aacttttaga tgactaacct gtttctggga ggagacagcg	4620
tgggcgacgg tgtataaagt tggctcgtt tcaagccctg cactgcgct acagtgccac	4680
caactgtaaa gcggtagtaa gctgcagtgg tcgactgggt gtagcatata ctaccttatt	4740
tatacgctcc gagctgtttt tcagcatgct agcaccacaac gccgagcag agtatataac	4800
tcccatcatt gccacaagc ttatgccact tattagcgtc cgctctgccg tttgcttagt	4860
cataatatct accgcggtt acgcagcaga cgctatctgc gacacaattg gatttgcat	4920
accgcgcatg tggatgtgta ttttaatgag atcaacctcc atgaagcgta actagggggc	4980
ctcccactga ggcactaccg gcttagcagc tgactaacac agtataaaac gtgagaagaa	5040
atcagtctca tgcgccatta gcgctaggct agttagcgtg gaggaccgga gcgctaccgc	5100
cagcagtttc atccgcctgg ttacgggtt gttaacacct accggtgtt taccgctacc	5160
ataggatccg atccatgggc ggccgcatga agaccgtgat cgcctgagt tacatcttct	5220
gcctgggtgt tgggcaggac ctccctggta aaggcaacaa cacggccacg ctgtgccttg	5280
ggcaccacgc cgtgccgaac ggcacccttg tgaaaactat taccgacgat cagatcgagg	5340
tgaccaacgc caccgaactg gttcagaatt ttagcatggg caaaatttgc aataaccgc	5400
accgcattct ggacggggcc aactgcacgc tgatcgattc attgctgggt gatccccact	5460
gcgatggctt tcaaaacgaa aagtgggact tgttcatcga acgcagcaag gcattcagca	5520
actgctaccc atacgacgtg cccgaatata ccagcctgcg aagcctgatc gcgagctctg	5580
ggaccctgga gttcaccaat gagaacttca attggaccgg agtgaccaa aacggtggct	5640
ccagcgcctg taaaagggga cccaataaca gttcttttag caagttgaat tggctttaca	5700
agagcggcaa tacttaccgc atgttgaatg tgaccatgcc caacagtgc gactttgata	5760

aactgtacat atggggcggtg caccatccca gcacggaccg cgaacagata aacctgtacg 5820
tgcaggccag cgggaagata atcgtgagca ccaagcgagc ccagcagacc atcattccca 5880
acattggcag ccgaccgtgg gtgcgcggtc tgagctcccg catcagcata tactggacca 5940
ttgtcaagcc gggagacatc ctgatcatca actctaattg caatcttata gcccacgcg 6000
gctacttcaa gatgcagacc ggcaaaagca gtgtgatgag gagcgacgcc cccatcgaca 6060
cctgcaatag cgaatgcata accccaatg gcagcatccc caacgacaag cctttccaga 6120
acgtgaataa gatcacctac ggcgcgtgcc ccaagtacat caagcagaac accctgaagc 6180
tggccaccgg catgcgcaac atccccgagc gacagacacg gggcattttt ggcgcaatcg 6240
cagggttcat tgagaatggc tgggagggaa tggttaacgg ctggtacggc ttccgccatc 6300
agaactctga aggaatcggc caagctgcgg atctgaagtc cacgcaagca gccatcaacc 6360
agatcaacgg caagcttaac cgcgtgattg aaaagacgaa cgagaaattc caccaaatag 6420
agaaagaatt cagcgaggtg gagggccgca tccaagacct cgagcgctac gtggaggaca 6480
ccaagatcga cctgtggagc tacaatgccg agctcctggg cgccttgga aaccaacaca 6540
ccattgacct gaccgacagc gagatgaata aactcttcga gaagaccggg aagcaactcc 6600
gagagaacgc cgaagacatg ggtaatgggt gttttaagat ctaccacaag tgcgacaata 6660
gctgcatgga gagcatccga aacggaacct acgaccacaa cgagtaccgc gatgaggcag 6720
ttaataaccg cttccaaatc aaaagcgtgg aactgaagag tggctataag gactggatac 6780
tgtggatcag ctttgccata agctgcttcc tgctgtgcgc cgtttgggtg ggtttcatca 6840
tgtgggcctg tcaaaagggc aatattcgct gtaacatctg catttgaggt ac 6892

<210> 24

<211> 4977

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nucleotit của vecto chuyển pU-1-3-p430-BGHKBGH

<400> 24

cctgtgcctt ctagttgcca gccatctgtt gtttgccct ccccggtgcc ttccttgacc 60
ctggaagggt ccaactccac tgctctttcc taataaaatg aggaaattgc atcgcatgtg 120
ctgagtaggt gtcattctat tctggggggt ggggtggggc aggacagcaa gggggaggat 180
tggaagaca atagcaggca tgctggggat gcggtgggct ctatggatcc tagggataac 240
agggtaatcg atttattcaa caaagccacg ttgtgtctca aaatctctga tgttacattg 300

cacaagataa aaatatatca tcatgaacaa taaaactgtc tgcttacata aacagtaata	360
caaggggtgt tatgagccat attcaacggg aaacgtcttg ctcgaggccg cgattaaatt	420
ccaacatgga tgctgattta tatgggtata aatgggctcg cgataatgtc gggcaatcag	480
gtgcgacaat ctatcgattg tatgggaagc ccgatgcgcc agagttgttt ctgaaacatg	540
gcaaaggtag cgttgccaat gatgttacag atgagatggt cagactaaac tggctgacgg	600
aatttatgcc tcttccgacc atcaagcatt ttatccgtac tcctgatgat gcatggttac	660
tcaccactgc gatccccggg aaaacagcat tccagggtatt agaagaatat cctgattcag	720
gtgaaaatat tgttgatgcg ctggcagtggt tcctgcgccg gttgcattcg attcctgttt	780
gtaattgtcc ttttaacagc gatcgcgtat ttcgtctcgc tcaggcgcaa tcacgaatga	840
ataacggttt ggttgatgcg agtgattttg atgacgagcg taatggctgg cctgttgaac	900
aagtctggaa agaaatgcat aagcttttgc cattctcacc ggattcagtc gtcactcatg	960
gtgatttctc acttgataac cttatttttg acgaggggaa attaataggt tgtattgatg	1020
ttggacgagt cggaatcgca gaccgatacc aggatcttgc catcctatgg aactgcctcg	1080
gtgagttttc tccttcatta cagaaacggc tttttcaaaa atatggtatt gataatcctg	1140
atatgaataa attgcagttt catttgatgc tcgatgagtt tttctaacca tggctgtgcc	1200
ttctagttgc cagccatctg ttgtttgccc ctccccgtg ccttccttga ccctggaagg	1260
tgccactccc actgtccttt cctaataaaa tgaggaaatt gcatcgcat gtctgagtag	1320
gtgtcattct attctggggg gtgggggtggg gcaggacagc aagggggagg attgggaaga	1380
caatagcagg catgctgggg atgcgggtggg ctctatggat ccgaccctcc ccgggggctaa	1440
aaagctgcgt cttcacgccc gaggcgctta ttgccactg ggtacggggc gcgcttttat	1500
atgtgtaacg tcccaccggt gtgacgcacg tactacggtt gttctaaata gctgtccccg	1560
tgattgcctc ggctgcacac atcgccctagg ttccgcctg gcctggtgtc gagggcccac	1620
ccctgtaacc aacatcgatg ggggcctgct gctccttcgc taccttagga ccgttatagt	1680
tacgtcaagc ttggcgtaat catggtcata gctgtttcct gtgtgaaatt gttatccgct	1740
cacaattcca cacaacatac gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaata	1800
agtgagctaa ctcacattaa ttgcgttgcg ctactgccc gctttccagt cgggaaacct	1860
gtcgtgccag ctgcattaat gaatcggcc aacgcggggg agaggcggtt tgcgtattgg	1920
gcgctcttcc gcttctcgc tcaactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc	1980
ggtatcagct cactcaaagg cgtaataacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg	2040
aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct	2100

ggcgtttttc cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca	2160
gaggtggcga aaccogacag gactataaaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct	2220
cgtgcgctct cctgttccga ccctgccgct taccggatac ctgtccgctt ttctcccttc	2280
gggaagcgtg gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat ctcagtccgg tgtaggtcgt	2340
tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc cccgcttcag cccgaccgct gcgccttata	2400
cggtaactat cgtcttgagt ccaaccgggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc	2460
cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgtaggcggg gctacagagt tcttgaagtg	2520
gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtatttggg atctgcgctc tgctgaagcc	2580
agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag	2640
cgggtggtttt tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga	2700
tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaaac gaaaactcac gttaagggat	2760
tttggctcatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaatt aaaaatgaag	2820
ttttaaatca atctaaagta tatatgagta aacttgggtc gacagttacc aatgcttaat	2880
cagtgaggca cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagttg cctgactccc	2940
cgtcgtgtag ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat	3000
accgcgagac ccacgctcac cggctccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaag	3060
ggccgagcgc agaagtggtc ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta ttaattgttg	3120
ccgggaagct agagtaagta gttcgccagt taatagtttg cgcaacgttg ttgccattgc	3180
tacaggcatc gtgggtgtcac gtcgctcgtt tggtatggct tcattcagct ccggttccca	3240
acgatcaagg cgagttacat gatccccat gttgtgcaaa aaagcggtta gtccttcgg	3300
tcctccgatc gttgtcagaa gtaagttggc cgcagtgtta tcactcatgg ttatggcagc	3360
actgcataat tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc ttttctgtga ctggtgagta	3420
ctcaaccaag tcattctgag aatagtgtat gcggcgaccg agttgctctt gcccggcgtc	3480
aatacgggat aataccgcgc cacatagcag aactttaaaa gtgctcatca ttggaaaacg	3540
ttcttcgggg cgaaaactct caaggatctt accgctgttg agatccagtt cgatgtaacc	3600
cactcgtgca cccaactgat cttcagcatc ttttactttc accagcgttt ctgggtgagc	3660
aaaaacagga aggcaaatg ccgcaaaaaa gggaataagg gcgacacgga aatgttgaat	3720
actcactctc ttcttttttc aatattattg aagcatttat cagggttatt gtctcatgag	3780
cggatacata tttgaatgta tttagaaaaa taaacaaata ggggttccgc gcacatttcc	3840

ccgaaaagtg ccacctgacg tctaagaaac cattattatc atgacattaa cctataaaaa 3900
 taggcgtatc acgaggccct ttcgtctcgc gcgtttcggg gatgacgggtg aaaacctctg 3960
 acacatgcag ctcccggaga cggtcacagc ttgtctgtaa gcggatgccg ggagcagaca 4020
 agcccgtcag ggcgcgtcag cgggtgttgg cgggtgtcgg ggctggctta actatgcggc 4080
 atcagagcag attgtactga gagtgcacca tatgcgggtg gaaataccgc acagatgcgt 4140
 aaggagaaaa taccgcatca ggcgccattc gccattcagg ctgcgcaact gttgggaagg 4200
 gcgatcgggtg cgggcctctt cgctattacg ccagctggcg aaaggggggat gtgctgcaag 4260
 gcgattaagt tgggtaacgc caggggttttc ccagtcacga cgttgtaaaa cgacggccag 4320
 tgaattcgac gtaactataa cggtcctaag gtagcgaatt tttccattgg gccctcctct 4380
 tttggctctg ggtatttagc ttccctcca cttctcattc cactttctcc acctgcacct 4440
 tttccatctc ctctccaact cgccgccatg agacccgagg gagtttcgcg gggccgcgcc 4500
 tcctctgtct ccatctccaa ctagtgtcga cctctatttg aggacccgcc gagtacccca 4560
 caagagtatg taaaaagctg tcattctcaa ctactgagaa taatatcaaa gctaaagata 4620
 aacctgagg agtttccacg ggaaccagag tctaggctcg tgcgcggata catcgaatac 4680
 gccagcctag agcgtaaagg acatacgcgc tatccttgct tccagcgcgt gaacctacac 4740
 attgacgggg aatttttgat ccataaaatg ctagcgttca atgctgcgat gcgcccatcc 4800
 gcagaagagt tgttgtccta cccaatgttt atgaatctgt aggatgacta acagatttgg 4860
 ggtggagacg gcgtgggcga tactgtataa agttgtacta cttaccagcc cagtcagtgt 4920
 gctgtagtgc caccacctgt aaagctgtga taagctgcag ttgcggccgc cgggtac 4977

<210> 25

<211> 6678

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nucleotit của plasmit chuyển pU1-3-p430-H1av-BGHKBGH

<400> 25

cctgtgcctt ctagttgccg gccatctgtt gtttgccct ccccgctgcc ttccttgacc 60
 ctggaagggt ccaactccac tgtcctttcc taataaaatg aggaaattgc atcgcatgtg 120
 ctgagtaggt gtcattctat tctggggggg ggggtggggc aggacagcaa gggggaggat 180
 tgggaagaca atagcaggca tgctggggat gcggtgggct ctatggatcc tagggataac 240
 agggtaatcg atttattcaa caaagccacg ttgtgtctca aaatctctga tgttacattg 300
 cacaagataa aaatatatca tcatgaacaa taaaactgtc tgcttacata aacagtaata 360

caaggggtgt tatgagccat attcaacggg aaacgtcttg ctcgaggccg cgattaaatt	420
ccaacatgga tgctgattta tatgggtata aatgggctcg cgataatgtc gggcaatcag	480
gtgcgacaat ctatcgattg tatgggaagc ccgatgcgcc agagttgttt ctgaaacatg	540
gcaaaggtag cgttgccaat gatgttacag atgagatggt cagactaaac tggctgacgg	600
aatttatgcc tcttcgacc atcaagcatt ttatccgtac tcctgatgat gcatggttac	660
tcaccactgc gatccccggg aaaacagcat tcaggtatt agaagaatat cctgattcag	720
gtgaaaatat tgttgatgcg ctggcagtgt tcctgcgccg gttgcattcg attcctgttt	780
gtaattgtcc ttttaacagc gatcgcgtat ttcgtctcgc tcaggcgcaa tcacgaatga	840
ataacggttt ggttgatgcg agtgattttg atgacgagcg taatggctgg cctgttgaac	900
aagtctggaa agaaatgcat aagcttttgc cattctcacc ggattcagtc gtcactcatg	960
gtgatttctc acttgataac cttatttttg acgaggggaa attaataagg tgtattgatg	1020
ttggacgagt cggaatcgca gaccgatacc aggatcttgc catcctatgg aactgcctcg	1080
gtgagttttc tccttcatta cagaaacggc tttttcaaaa atatggtatt gataatcctg	1140
atatgaataa attgcagttt catttgatgc tcgatgagtt tttctaacca tggctgtgcc	1200
ttctagttgc cagccatctg ttgtttgccc ctccccctg ccttccttga ccttgaagg	1260
tgccactccc actgtccttt cctaataaaa tgaggaaatt gcatcgcatt gtctgagtag	1320
gtgtcattct attctggggg gtgggggtgg gcaggacagc aagggggagg attgggaaga	1380
caatagcagg catgctgggg atgcgggtgg ctctatggat ccgaccctcc ccgggggctaa	1440
aaagctgcgt cttcacgccc gaggcgctta ttgccactg ggtacggggc gcgcttttat	1500
atgtgtaacg tcccaccggt gtgaagcacg tactacggtt gttctaaata gctgtccccg	1560
tgattgcctc ggctgcacac atcgccctagg tttccgccgt gcctggtgtc gagggccac	1620
ccctgtaacc aacatcgatg ggggcctgct gctccttcgc taccttagga ccgttatagt	1680
tacgtcaagc ttggcgtaat catggtcata gctgtttcct gtgtgaaatt gttatccgct	1740
cacaattcca cacaacatac gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaata	1800
agtgaagctaa ctcacattaa ttgcgttgcg ctactgccc gctttccagt cgggaaacct	1860
gtcgtgccag ctgcattaat gaatcggcc aacgcggggg agaggcggtt tgcgtattgg	1920
gcgctcttcc gcttctcgc tcaactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc	1980
ggtatcagct cactcaaagg cgtaataacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg	2040
aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct	2100

ggcgtttttc cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca	2160
gaggtggcga aacccgacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct	2220
cgtgcgctct cctgttccga ccctgccgct taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc	2280
gggaagcgtg gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat ctcagttcgg tgtaggtcgt	2340
tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccgct gcgccttata	2400
cggtaactat cgtcttgagt ccaaccgggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc	2460
cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgtaggcggg gctacagagt tcttgaagtg	2520
gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtatttggg atctgcgctc tgctgaagcc	2580
agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag	2640
cgggtggtttt tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga	2700
tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac gttaagggat	2760
tttggctatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaatt aaaaatgaag	2820
ttttaaatca atctaaagta tatatgagta aacttgggtc gacagttacc aatgcttaat	2880
cagtgaggca cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagttg cctgactccc	2940
cgtcgtgtag ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat	3000
accgcgagac ccacgctcac cggctccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaag	3060
ggccgagcgc agaagtggtc ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta ttaattgttg	3120
ccgggaagct agagtaagta gttcgccagt taatagtttg cgcaacgttg ttgccattgc	3180
tacaggcatc gtgggtgcac gtcgctcgtt tggatatggc tcattcagct ccggttccca	3240
acgatcaagg cgagttacat gatcccccat gttgtgcaaa aaagcggtta gtccttcgg	3300
tcctccgata gttgtcagaa gtaagttggc cgcagtgtta tcaactatgg ttatggcagc	3360
actgcataat tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc ttttctgtga ctggtgagta	3420
ctcaaccaag tcattctgag aatagtgtat gcggcgaccg agttgctctt gccggcgctc	3480
aatacgggat aataccgcgc cacatagcag aactttaaaa gtgctcatca ttggaaaacg	3540
ttcttcgggg cgaaaactct caaggatctt accgctgttg agatccagtt cgatgtaacc	3600
cactcgtgca cccaactgat cttcagcatc ttttactttc accagcgttt ctgggtgagc	3660
aaaaacagga aggcaaaatg ccgcaaaaaa gggaataagg gcgacacgga aatgttgaat	3720
actcatactc ttcttttttc aatattattg aagcatttat cagggttatt gtctcatgag	3780
cggatacata tttgaatgta tttagaaaaa taaacaaata ggggttccgc gcacatttcc	3840
ccgaaaagtg ccacctgacg tctaagaaac cattattatc atgacattaa cctataaaaa	3900

taggcgtatc acgaggccct ttcgtctcgc gcgtttcggg gatgacgggtg aaaacctctg	3960
acacatgcag ctcccggaga cggtcacagc ttgtctgtaa gcggatgccg ggagcagaca	4020
agcccgtcag ggcgcgtcag cgggtgttgg cgggtgtcgg ggctggctta actatgcggc	4080
atcagagcag attgtactga gagtgcacca tatgcgggtg gaaataccgc acagatgcgt	4140
aaggagaaaa taccgcatac ggccgccattc gccattcagg ctgcgcaact gttgggaagg	4200
gcgatcgggtg cgggcctctt cgctattacg ccagctggcg aaagggggat gtgctgcaag	4260
gcgattaagt tgggtaacgc cagggttttc ccagtcacga cgttgtaaaa cgacggccag	4320
tgaattcgac gtaactataa cggtcctaag gtagcgaatt tttccattgg gcccctccct	4380
tttggctctg ggtatttagc ttccctccca cttctcattc cactttctcc acctgcacct	4440
tttccatctc ctctccaact cgccgccatg agacccgagg gagtttcgcg gggccgcgcc	4500
tcctctgtct ccatctccaa ctagtgtcga cctctatttg aggaccgcc gagtacccca	4560
caagagtatg taaaaagctg tcattctcaa ctactgagaa taatatcaaa gctaaagata	4620
aaccctgagg agtttccacg ggaaccagag tctaggctcg tgcgcggata catcgaatac	4680
gccagcctag agcgtaaagcc acatacgcgc tatccttgct tccagcgcgt gaacctacac	4740
attgacgggg aatttttgat ccataaaatg ctagcggttc atgctgcgat gcgcccattc	4800
gcagaagagt tgttgtccta cccaatgttt atgaatctgt aggatgacta acagatttgg	4860
ggtggagacg gcgtgggcga tactgtataa agttgtacta cttaccagcc cagtcagtgt	4920
gctgtagtgc caccacctgt aaagctgtga taagctgcag ttgcggccgc cgatggaggc	4980
aaaattgttc gtgctgttct gcgccttcac tgctctgaag gcagacacca tctgcgtggg	5040
ttaccacgcc aataattcca ccgacacggg ggataccatc ctggagaaga acgtgaccgt	5100
gactcattcc gtgaacctct tggagaactc acacaatggg aaattgtgca gccttaacgg	5160
caaagccccg ctgcaattgg ggaattgtaa cgtggccgga tggatactgg ggaaccccga	5220
gtgcgacctt ctctgaccg ccaacagttg gtccctacatc attgagacga gcaacagcaa	5280
gaatggcgcc tgctatcctg gggagttcgc tgactacgag gagctgcgcg agcagttgtc	5340
tacagtcagc agcttcgaaa gattcgagat cttcccaaag gccactagct ggcccaacca	5400
cgatactacc aagggcacta cagtgagttg cagccacagc ggtgccata gcttctaccg	5460
caacctgctg tggatcgtga agaagggtaa cagctacccc aagctgagca aatcttacac	5520
aaacaacaaa ggcaaagagg tgttggttat ctggggcggtg catcatcccc caaccgactc	5580
cgatcagcaa accctgtacc agaacaacca cacctacgtg agcgtcggta gctctaagta	5640

```

ttaccagcgc ttcacccccg aaatcgtcgc acgaccgaag gtgagagggc aggccgggag      5700
aatgaactac tactggaccc tgctggatca aggcgacact attaccttcg aggctaccgg      5760
caacttgatc gccccgtggc acgcgttcgc cctcaataaa ggatctaata gcggcataat      5820
gatgagtgat gcccacgtgc ataactgcac cacgaagtgc cagacccctc acggcgcaact      5880
gaaaagcaat ctgccctttc agaatgtgca ccccatcacc atcggcgagt gcccgaagta      5940
tgttaaaagc actcagctcc gcatggccac cggactgcgc aacatcccga gcatccaatc      6000
ccgcggaactg ttcggcgcaa tcgcgggctt tatagagggc ggctggaccg gcatgatcga      6060
cggctggtac ggctaccacc atcaaaatga gcaagggttc ggctacgccg cagaccagaa      6120
gagcacccaa atagcaatcg atggcatctc caacaagggtg aacagcgtga tcgaaaagat      6180
gaacatccag ttcacaagcg tggggaagga gttcaataac ctggaaaagc gcatcgagaa      6240
tctgaacaag aaggttgacg atgggttcct cgatgtctgg acctataacg ccgagctcct      6300
gatactgctt gagaacgagc gcaccctgga cttccacgac ttcaacgtga aaaacctgta      6360
cgaaaaggtc aagtcacagt tgcgaaacaa tgcgaaggag ataggcaacg gctgcttcga      6420
gttctatcac aagtgtgaca acgagtgcac ggagagcgtc aagaacggca cttacaacta      6480
cccgcgctac tctgaggaga gtaagctcaa ccgcgaagag attgacggcg tgaaactgga      6540
aagcgttggg gtccatcaga tcctggccat ctacagcacc gtggctagct ctctggttct      6600
gttgggtgagc ctgggcgcta taagcttttg gatgtgttct aatgggagcc tgcagtgccg      6660
catctgcata tgaggtac                                                         6678

```

<210> 26
 <211> 566
 <212> PRT
 <213> Virut cúm A

<400> 26

Met Lys Ala Ile Leu Val Val Leu Leu Tyr Thr Phe Ala Thr Ala Asn
 1 5 10 15

Ala Asp Thr Leu Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr
 20 25 30

Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn
 35 40 45

Leu Leu Glu Asp Lys His Asn Gly Lys Leu Cys Lys Leu Arg Gly Val
 50 55 60

Ala Pro Leu His Leu Gly Lys Cys Asn Ile Ala Gly Trp Ile Leu Gly
 65 70 75 80

Asn Pro Glu Cys Glu Ser Leu Ser Thr Ala Ser Ser Trp Ser Tyr Ile
 85 90 95

Val Glu Thr Ser Ser Ser Asp Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Asp Phe
 100 105 110

Ile Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe
 115 120 125

Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Thr Ser Ser Trp Pro Asn His Asp
 130 135 140

Ser Asn Lys Gly Val Thr Ala Ala Cys Pro His Ala Gly Ala Lys Ser
 145 150 155 160

Phe Tyr Lys Asn Leu Ile Trp Leu Val Lys Lys Gly Asn Ser Tyr Pro
 165 170 175

Lys Leu Ser Lys Ser Tyr Ile Asn Asp Lys Gly Lys Glu Val Leu Val
 180 185 190

Leu Trp Gly Ile His His Pro Ser Thr Ser Ala Asp Gln Gln Ser Leu
 195 200 205

Tyr Gln Asn Ala Asp Ala Tyr Val Phe Val Gly Thr Ser Arg Tyr Ser
 210 215 220

Lys Lys Phe Lys Pro Glu Ile Ala Ile Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln
 225 230 235 240

Glu Gly Arg Met Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Val Glu Pro Gly Asp Lys
 245 250 255

Ile Thr Phe Glu Ala Thr Gly Asn Leu Val Val Pro Arg Tyr Ala Phe
 260 265 270

Ala Met Glu Arg Lys Ala Gly Ser Gly Ile Ile Ile Ser Asp Thr Pro
 275 280 285

Val His Asp Cys Asn Thr Thr Cys Gln Thr Pro Lys Gly Ala Ile Asn
 290 295 300

Thr Ser Leu Pro Phe Gln Asn Ile His Pro Ile Thr Ile Gly Lys Cys
 305 310 315 320

Pro Lys Tyr Val Lys Ser Thr Lys Leu Arg Leu Ala Thr Gly Leu Arg
 325 330 335

Asn Ile Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly
 340 345 350

Phe Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr
 355 360 365

His His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Leu Lys Ser
 370 375 380

Thr Gln Asn Ala Ile Asp Glu Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile
 385 390 395 400

Glu Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn His
 405 410 415

Leu Glu Lys Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe
 420 425 430

Leu Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn
 435 440 445

Glu Arg Thr Leu Asp Tyr His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu
 450 455 460

Lys Val Arg Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly
 465 470 475 480

Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Thr Cys Met Glu Ser Val
 485 490 495

Lys Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Ser Glu Glu Ala Lys Leu
 500 505 510

Asn Arg Glu Glu Ile Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Thr Arg Ile Tyr
 515 520 525

Gln Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Ile

530 535 540

Val Ser Leu Gly Ala Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu
545 550 555 560

Gln Cys Arg Ile Cys Ile
565

<210> 27
<211> 566
<212> PRT
<213> Virut cúm A

<400> 27

Met Lys Thr Val Ile Ala Leu Ser Tyr Ile Phe Cys Leu Val Phe Gly
1 5 10 15

Gln Asp Leu Pro Gly Lys Gly Asn Asn Thr Ala Thr Leu Cys Leu Gly
20 25 30

His His Ala Val Pro Asn Gly Thr Leu Val Lys Thr Ile Thr Asp Asp
35 40 45

Gln Ile Glu Val Thr Asn Ala Thr Glu Leu Val Gln Asn Phe Ser Met
50 55 60

Gly Lys Ile Cys Asn Asn Pro His Arg Ile Leu Asp Gly Ala Asn Cys
65 70 75 80

Thr Leu Ile Asp Ser Leu Leu Gly Asp Pro His Cys Asp Gly Phe Gln
85 90 95

Asn Glu Lys Trp Asp Leu Phe Ile Glu Arg Ser Lys Ala Phe Ser Asn
100 105 110

Cys Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Glu Tyr Thr Ser Leu Arg Ser Leu Ile
115 120 125

Ala Ser Ser Gly Thr Leu Glu Phe Thr Asn Glu Asn Phe Asn Trp Thr
130 135 140

Gly Val Thr Gln Asn Gly Gly Ser Ser Ala Cys Lys Arg Gly Pro Asn
145 150 155 160

Asn Ser Phe Phe Ser Lys Leu Asn Trp Leu Tyr Lys Ser Gly Asn Thr

		165						170						175	
Tyr	Pro	Met	Leu	Asn	Val	Thr	Met	Pro	Asn	Ser	Asp	Asp	Phe	Asp	Lys
			180					185					190		
Leu	Tyr	Ile	Trp	Gly	Val	His	His	Pro	Ser	Thr	Asp	Arg	Glu	Gln	Ile
		195					200					205			
Asn	Leu	Tyr	Val	Gln	Ala	Ser	Gly	Lys	Ile	Ile	Val	Ser	Thr	Lys	Arg
	210					215					220				
Ser	Gln	Gln	Thr	Ile	Ile	Pro	Asn	Ile	Gly	Ser	Arg	Pro	Trp	Val	Arg
225				230					235					240	
Gly	Leu	Ser	Ser	Arg	Ile	Ser	Ile	Tyr	Trp	Thr	Ile	Val	Lys	Pro	Gly
			245					250					255		
Asp	Ile	Leu	Ile	Ile	Asn	Ser	Asn	Gly	Asn	Leu	Ile	Ala	Pro	Arg	Gly
		260					265					270			
Tyr	Phe	Lys	Met	Gln	Thr	Gly	Lys	Ser	Ser	Val	Met	Arg	Ser	Asp	Ala
	275						280					285			
Pro	Ile	Asp	Thr	Cys	Asn	Ser	Glu	Cys	Ile	Thr	Pro	Asn	Gly	Ser	Ile
	290					295					300				
Pro	Asn	Asp	Lys	Pro	Phe	Gln	Asn	Val	Asn	Lys	Ile	Thr	Tyr	Gly	Ala
305					310				315					320	
Cys	Pro	Lys	Tyr	Ile	Lys	Gln	Asn	Thr	Leu	Lys	Leu	Ala	Thr	Gly	Met
			325						330					335	
Arg	Asn	Ile	Pro	Glu	Arg	Gln	Thr	Arg	Gly	Ile	Phe	Gly	Ala	Ile	Ala
		340						345					350		
Gly	Phe	Ile	Glu	Asn	Gly	Trp	Glu	Gly	Met	Val	Asn	Gly	Trp	Tyr	Gly
	355						360					365			
Phe	Arg	His	Gln	Asn	Ser	Glu	Gly	Ile	Gly	Gln	Ala	Ala	Asp	Leu	Lys
	370					375				380					
Ser	Thr	Gln	Ala	Ala	Ile	Asn	Gln	Ile	Asn	Gly	Lys	Leu	Asn	Arg	Val
385					390				395					400	

Ile Glu Lys Thr Asn Glu Lys Phe His Gln Ile Glu Lys Glu Phe Ser
 405 410 415

Glu Val Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu Glu Arg Tyr Val Glu Asp Thr
 420 425 430

Lys Ile Asp Leu Trp Ser Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Ala Leu Glu
 435 440 445

Asn Gln His Thr Ile Asp Leu Thr Asp Ser Glu Met Asn Lys Leu Phe
 450 455 460

Glu Lys Thr Arg Lys Gln Leu Arg Glu Asn Ala Glu Asp Met Gly Asn
 465 470 475 480

Gly Cys Phe Lys Ile Tyr His Lys Cys Asp Asn Ser Cys Met Glu Ser
 485 490 495

Ile Arg Asn Gly Thr Tyr Asp His Asn Glu Tyr Arg Asp Glu Ala Val
 500 505 510

Asn Asn Arg Phe Gln Ile Lys Ser Val Glu Leu Lys Ser Gly Tyr Lys
 515 520 525

Asp Trp Ile Leu Trp Ile Ser Phe Ala Ile Ser Cys Phe Leu Leu Cys
 530 535 540

Ala Val Trp Leu Gly Phe Ile Met Trp Ala Cys Gln Lys Gly Asn Ile
 545 550 555 560

Arg Cys Asn Ile Cys Ile
 565

<210> 28
 <211> 566
 <212> PRT
 <213> Virut cúm A

<400> 28

Met Glu Ala Lys Leu Phe Val Leu Phe Cys Ala Phe Thr Ala Leu Lys
 1 5 10 15

Ala Asp Thr Ile Cys Val Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr
 20 25 30

Val Asp Thr Ile Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn
 35 40 45

Leu Leu Glu Asn Ser His Asn Gly Lys Leu Cys Ser Leu Asn Gly Lys
 50 55 60

Ala Pro Leu Gln Leu Gly Asn Cys Asn Val Ala Gly Trp Ile Leu Gly
 65 70 75 80

Asn Pro Glu Cys Asp Leu Leu Leu Thr Ala Asn Ser Trp Ser Tyr Ile
 85 90 95

Ile Glu Thr Ser Asn Ser Lys Asn Gly Ala Cys Tyr Pro Gly Glu Phe
 100 105 110

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

Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Ala Thr Ser Trp Pro Asn His Asp
 130 135 140

Thr Thr Lys Gly Thr Thr Val Ser Cys Ser His Ser Gly Ala Asn Ser
 145 150 155 160

Phe Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Ile Val Lys Lys Gly Asn Ser Tyr Pro
 165 170 175

Lys Leu Ser Lys Ser Tyr Thr Asn Asn Lys Gly Lys Glu Val Leu Val
 180 185 190

Ile Trp Gly Val His His Pro Pro Thr Asp Ser Asp Gln Gln Thr Leu
 195 200 205

Tyr Gln Asn Asn His Thr Tyr Val Ser Val Gly Ser Ser Lys Tyr Tyr
 210 215 220

Gln Arg Phe Thr Pro Glu Ile Val Ala Arg Pro Lys Val Arg Gly Gln
 225 230 235 240

Ala Gly Arg Met Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Asp Gln Gly Asp Thr
 245 250 255

Ile Thr Phe Glu Ala Thr Gly Asn Leu Ile Ala Pro Trp His Ala Phe
 260 265 270

Ala Leu Asn Lys Gly Ser Asn Ser Gly Ile Met Met Ser Asp Ala His
 275 280 285

Val His Asn Cys Thr Thr Lys Cys Gln Thr Pro His Gly Ala Leu Lys
 290 295 300

Ser Asn Leu Pro Phe Gln Asn Val His Pro Ile Thr Ile Gly Glu Cys
 305 310 315 320

Pro Lys Tyr Val Lys Ser Thr Gln Leu Arg Met Ala Thr Gly Leu Arg
 325 330 335

Asn Ile Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly
 340 345 350

Phe Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr
 355 360 365

His His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Gln Lys Ser
 370 375 380

Thr Gln Ile Ala Ile Asp Gly Ile Ser Asn Lys Val Asn Ser Val Ile
 385 390 395 400

Glu Lys Met Asn Ile Gln Phe Thr Ser Val Gly Lys Glu Phe Asn Asn
 405 410 415

Leu Glu Lys Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe
 420 425 430

Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Ile Leu Leu Glu Asn
 435 440 445

Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Phe Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu
 450 455 460

Lys Val Lys Ser Gln Leu Arg Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly
 465 470 475 480

Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu Ser Val
 485 490 495

Lys Asn Gly Thr Tyr Asn Tyr Pro Arg Tyr Ser Glu Glu Ser Lys Leu
 500 505 510

Asn Arg Glu Glu Ile Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Val Gly Val His
 515 520 525

Gln Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Leu
 530 535 540

Val Ser Leu Gly Ala Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu
 545 550 555 560

Gln Cys Arg Ile Cys Ile
 565

<210> 29
 <211> 564
 <212> PRT
 <213> Virut cúm A

<400> 29

Met Lys Ala Lys Leu Leu Ile Leu Trp Cys Ala Leu Ser Ala Thr Asp
 1 5 10 15

Ala Asp Thr Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr
 20 25 30

Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn
 35 40 45

Leu Leu Glu Asp Asn His Asn Gly Lys Leu Cys Lys Leu Lys Gly Val
 50 55 60

Ala Pro Leu Gln Leu Gly Lys Cys Ser Ile Ala Gly Trp Ile Leu Gly
 65 70 75 80

Asn Pro Glu Cys Glu Ser Leu Phe Ser Lys Lys Ser Trp Ser Tyr Ile
 85 90 95

Ala Glu Thr Pro Asn Ala Glu Asn Gly Ile Cys Tyr Pro Gly Tyr Phe
 100 105 110

Ser Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe
 115 120 125

Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu Ser Ser Trp Pro Lys His Ser
 130 135 140

Ile Gly Ala Thr Ala Ser Cys Ser Lys Gln Gly Arg Ser Ser Phe Tyr
 145 150 155 160

Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Glu Lys Asn Gly Ser Tyr Pro Asn Leu
 165 170 175

Ser Lys Ser Tyr Val Asn Asp Lys Glu Arg Glu Val Leu Val Leu Trp
 180 185 190

Gly Val His His Pro Ser Asn Ile Glu Asp Gln Arg Ala Ile Tyr Arg
 195 200 205

Lys Glu Thr Ala Tyr Val Ser Val Met Ser Ser Leu Tyr Asn Arg Arg
 210 215 220

Phe Thr Pro Glu Ile Ala Lys Arg Pro Lys Ile Arg Asn Gln Glu Gly
 225 230 235 240

Arg Ile Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Glu Pro Lys Asp Thr Ile Ile
 245 250 255

Phe Glu Ala Asn Gly Asn Leu Ile Ala Pro Trp Tyr Ala Phe Ala Leu
 260 265 270

Ser Arg Gly Phe Glu Ser Gly Ile Ile Val Ser Asn Ala Ser Met Asp
 275 280 285

Glu Cys Asp Ala Lys Cys Gln Thr Pro Gln Gly Ala Ile Asn Ser Ser
 290 295 300

Leu Pro Phe Gln Asn Val His Pro Val Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys
 305 310 315 320

Tyr Val Lys Ser Thr Lys Leu Lys Met Ala Thr Gly Leu Arg Asn Ile
 325 330 335

Pro Ser Ile Gln Thr Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile
 340 345 350

Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His
 355 360 365

Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Gln Lys Ser Thr Gln

```

370                               375                               380

Asn Ala Ile Asn Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile Asp Lys
385                               390                               395                               400

Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn Lys Leu Glu
                               405                               410                               415

Lys Arg Met Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe Leu Asp
                               420                               425                               430

Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn Glu Arg
                               435                               440                               445

Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Ser Leu Tyr Glu Lys Val
                               450                               455                               460

Lys Gly Gln Leu Lys Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly Cys Phe
465                               470                               475                               480

Glu Phe Tyr His Lys Cys Asn Asn Glu Cys Met Asp Ser Val Lys Asn
                               485                               490                               495

Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Arg Tyr Ser Glu Glu Ser Lys Leu Asn Arg
                               500                               505                               510

Glu Lys Ile Asp Gly Val Glu Leu Lys Ser Met Gly Val Tyr Gln Ile
                               515                               520                               525

Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Leu Val Ser
                               530                               535                               540

Leu Gly Ala Thr Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln Cys
545                               550                               555                               560

Arg Ile Cys Ile

```

```

<210> 30
<211> 19
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<223> GS linker

```

<400> 30

His Met Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15

Gly Gly Thr

<210> 31

<211> 947

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự ADN tổng hợp của glycoprotein c bị cắt (Gc)
 gồm các vị trí giới hạn để tách dòng phụ

<400> 31

```

ggggccgcat gaaggcgatc ctggttgtgc tgctgtacac ctttgccacc gccaacgccg      60
atacgtgat caactgcaag aacatccaga gcacccagct gacaatcgag cacctgagca      120
agtgcattggc cttctaccag aacaagacca gcagccccgt cgtgatcaac gagatcatct      180
ccgacgccag cgtggacgaa caggaactga ttaagtctct gaacctgaac tgcaacgtga      240
tcgaccgggt catcagcgag tccagcgtga tcgagacaca ggtgtactac gagtatatca      300
agagccagct gtgtccactg caagtgcacg atatcttcac catcaacagc gccagcaaca      360
tccagtggaa gggcctggcc cgcagcttta ccctgggctg gtgcaacacc aacccccaca      420
agcacatctg ccggtgcctg gaatccatgc agatgtgtac cagcaccaag accgaccacg      480
ccagagagat gagcatctac tacgacggcc accccgacag attcgagcac gacatgaaga      540
ttatcctgaa tatcatgcgg tacatcgtgc ccggcctggg cagagtgtct ctggaccaga      600
tcaagcagac caaggactac caggccctga gacacatcca gggcaagctg agccccagt      660
cccagagcaa cctgcagctg aagggttcc tggaattcgt ggacttcac ctagggcgcca      720
acgtgaccat tgagaaaacc cccagaccc tgaccaccct gagcctgatt catatgggag      780
gttccggagg tggaggttcc ggaggtggag gttccggagg tggcaccata ctggccattt      840
acagcacagt tgcgagcagc ctggtcctga tcgtgagcct gggtgctata tcattctgga      900
tgtgcagcaa cggctctctc cagtgcgcga tctgtatctg aggtacc      947

```

<210> 32

<211> 3060

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mảnh ADN được sử dụng để tái tổ hợp RED để tạo ra
pRacH-SE-70-455-SBVGc,

<400> 32
tctagactcg agcgcaagcc ctacacgcgc taccctgtct ttcaacgcgt caacctgcac 60
attgacgggg agttttctggt tcacaagatg ctagcgttca atgccgcgat gcgcccacgc 120
gccgaggagc tgctgtcata cccaatgttt gctcaacttt aggatgacta acctgtttct 180
gggaggagac agcgtgggcg acggtgtata aagttggctc gctttcaagc cctgccactg 240
cgctacagtg ccaccaactg taaagcggta gtaagctgca gtggctcgact ggtggtagca 300
tatactacct tatattatag ctccgagctg tttttcagca tgctagcacc caacgccgag 360
cgagagtata taactcccat cattgcccac aagcttatgc cacttattag cgtccgctct 420
gccgtttgct tagtcataat atctaccgcc gtttacgcag cagacgctat ctgcgacaca 480
attggatttg cgataccgcg catgtggatg tgtattttaa tgagatcaac ctccatgaag 540
cgtaactagg gggcctccca ctgaggcact accggcttag cagctgacta acacagtata 600
aaacgtgaga agaaatcagt ctcatgcgcc attagcgcta ggctagttag cgtggaggac 660
cggagcgcta ccgccagcag tttcatccgc ctgggttacgg gtttgttaac acctaccggt 720
gttttaccgc taccatagga tccgatccat gggcgccgc atgaaggcga tccctggttg 780
gctgctgtac acctttgcca ccgccaacgc cgatacgctg atcaactgca agaacaacca 840
gagcaccag ctgacaatcg agcacctgag caagtgcctg gccttctacc agaacaagac 900
cagcagcccc gtcgtgatca acgagatcat ctccgacgcc agcgtggacg aacaggaact 960
gattaagtct ctgaacctga actgcaacgt gatcgaccgg ttcacacgcg agtccagcgt 1020
gatcgagaca caggtgtact acgagtatat caagagccag ctgtgtccac tgcaagtgca 1080
cgatatcttc accatcaaca gcgccagcaa catccagtgg aaggccctgg cccgcagctt 1140
taccctgggc gtgtgcaaca ccaaccccc caagcacatc tgccggtgcc tggaatccat 1200
gcagatgtgt accagcacca agaccgacca cgccagagag atgagcatct actacgacgg 1260
ccaccccgac agattcgagc acgacatgaa gattatcctg aatatcatgc ggtacatcgt 1320
gcccggcctg ggcagagtgc tgctggacca gatcaagcag accaaggact accaggccct 1380
gagacacatc cagggcaagc tgagcccca gtcccagagc aacctgcagc tgaagggctt 1440
cctggaattc gtggacttca tccctgggccc caacgtgacc attgagaaaa cccccagac 1500
cctgaccacc ctgagcctga ttcatatggg aggttccgga ggtggagggt ccggagggtg 1560
aggttccgga ggtggcacca tactggccat ttacagcaca gttgcgagca gcctggtoct 1620
gatcgtgagc ctgggtgcta tatcattctg gatgtgcagc aacggctctc tccagtgcg 1680

catctgtatc tgaggtagca ataaacgcgg tatgtctacc ttcaagccta tgatgaacgg 1740
atgtttgggtg tttgcggcta ttataacgct ottgagtttt atgctatctc tgggaacatg 1800
cgaaaattac aggcgtgtgg ttccgggatcc tagggataac agggtaatcg atttattcaa 1860
caaagccacg ttgtgtctca aaatctctga tgttacattg cacaagataa aaatatatca 1920
tcatgaacaa taaaactgtc tgcttacata aacagtaata caaggggtgt tatgagccat 1980
attcaacggg aaacgtcttg ctcgaggccg cgattaaatt ccaacatgga tgctgattta 2040
tatgggtata aatgggctcg cgataatgtc gggcaatcag gtgcgacaat ctatcgattg 2100
tatgggaagc ccgatgcgcc agagttgttt ctgaaacatg gcaaaggtag cgttgccaat 2160
gatgttacag atgagatggt cagactaaac tggctgacgg aatttatgcc tcttccgacc 2220
atcaagcatt ttatccgtac tctgatgat gcatgggtac tcaccactgc gatccccggg 2280
aaaacagcat tccaggtatt agaagaatat cctgattcag gtgaaaatat tgttgatgcg 2340
ctggcagtgt tctgcgcgcg gttgcattcg attcctgttt gtaattgtcc ttttaacagc 2400
gatcgcgtat ttctgtctgc tcaggcgcaa tcacgaatga ataacggttt ggttgatgcg 2460
agtgattttg atgacgagcg taatggctgg cctgttgaac aagtctggaa agaaatgcat 2520
aagcttttgc cattctcacc ggattcagtc gtcactcatg gtgatttctc acttgataac 2580
cttatttttg acgaggggaa attaataagg tgtattgatg ttggacgagt cggaatcgca 2640
gaccgatacc aggatcttgc catcctatgg aactgcctcg gtgagttttc tcttcatta 2700
cagaaacggc tttttcaaaa atatggtatt gataatcctg atatgaataa attgcagttt 2760
catttgatgc tcgatgagtt tttctaaaat aaacgcggta tgtctacctt caagcctatg 2820
atgaacggat gtttggtgtt tgccgctatt ataacgctct tgagttttat gctatctctg 2880
ggaacatgcg aaaattacag gcgtgtggtt cgggatccga ccctgttggg ggggtgcgggt 2940
ggactcagaa tcttggcgca ggcattggaag tttgtcgggt acgaaacata cgacaccatc 3000
cgcgcagaag caaagaattt agagaccac gtaccctcaa gtgctgcaga gtcgtctaga 3060

<210> 33
<211> 17
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 33
cgtgcgcgga tacatcg

17

<210> 34
<211> 16
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 34
cgcttcgcag gtgggc

16

<210> 35
<211> 19
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 35
gactggtggt agcatatac

19

<210> 36
<211> 19
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 36
gatcaacgag atcatctcc

19

<210> 37
<211> 17
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 37
ctggagagag ccgttgc

17