



(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)



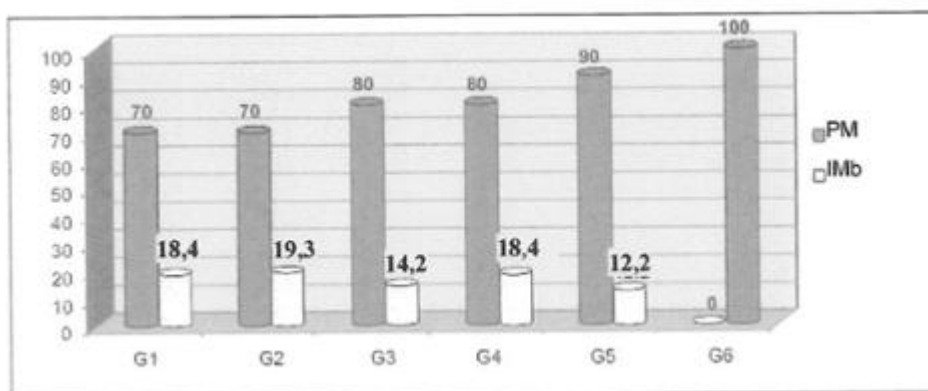
1-0035072

(51)⁷ C12N 15/861; A61K 39/12; A61K 39/215; A61K 39/245; A61K 39/112; A61K 39/145 (13) B

- (21) 1-2017-00664 (22) 06/08/2015
(86) PCT/IB2015/055994 06/08/2015 (87) WO2016/020885 11/02/2016
(30) PCT/IB2014/063809 08/08/2014 IB
(45) 27/03/2023 420 (43) 26/06/2017 351A
(73) GRUPO INDUSTRIAL PECUARIO, S.A. DE C.V. (MX)
Maíz No. 18, Col. Granjas Esmeralda, Del. Iztapalapa, Ciudad de México, 09810 Mexico
(72) LOZANO-DUBERNARD, Bernardo (MX); SOTO-PRIANTE, Ernesto (MX); SARFATI-MIZRAHI, David (MX).
(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) VACCIN TÁI TỔ HỢP BAO GỒM VECTƠ ADENOVIRUT GIA CẦM KIỂU HUYẾT THANH 9 (FADV-9) VÀ GIỐNG GỐC CỦA VIRUT TÁI TỔ HỢP ADENOVIRUT GIA CẦM KIỂU HUYẾT THANH 9 (FADV-9)

(57) Sáng chế đề cập đến vectơ adenovirut gia cầm kiểu huyết thanh 9 (FAdV-9) có ít nhất một chuỗi nucleotit ngoại sinh được chèn mã hóa ít nhất một kháng nguyên của bệnh đang quan tâm và thay thế vùng không thiết yếu của bộ gen adenovirut, trong đó ít nhất một chuỗi nucleotit ngoại sinh mã hóa ít nhất một kháng nguyên của bệnh được quan tâm và thay thế vùng không thiết yếu bộ gen adenovirut được chèn vào giữa các nucleotit 491 và 2782. Sáng chế cũng đề cập đến vaccin tái tổ hợp bao gồm vectơ này và chất mang được dụng, chất phụ trợ và/hoặc tá được.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến vaccin trên cơ sở vector virus, và cụ thể hơn là sáng chế đề cập đến vaccin trên cơ sở vector tái tổ hợp adenovirus gia cầm kiểu huyết thanh-8.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các adenovirus là các virus ADN sợi kép thẳng, đường kính từ 70-90 nm, không được bọc, và có vỏ capsit hình dạng khối 20 mặt, mà được tạo ra bởi 240 hexon, 12 penton và các sợi kéo dài từ mỗi đỉnh của khối 20 mặt. Các hexon, penton và sợi này biểu diễn các kháng nguyên adenovirus chính, và xác định kiểu huyết thanh của chúng.

Bộ gen adenovirus có kích thước khoảng 30-45kb, và có bốn vùng đầu (E1, E2, E3 và E4), và năm vùng sau (L1-L5).

Các adenovirus đã được phân lập từ các loài khác nhau, hai loại chính là *Aviadenovirus*, được phân lập từ các loài chim, và *Mastadenovirus*, được phân lập từ các động vật có vú.

Các adenovirus được coi là các ứng viên tốt làm các vector tái tổ hợp để sản xuất vaccin bởi vì chúng có tính lây nhiễm cao và nhiều trong số đó không gây bệnh. Ngoài ra, các vector adenovirus có thể dịch hiệu quả các gen có kích thước lớn, và tạo ra đáp ứng miễn dịch kéo dài ở các động vật. Tuy nhiên, cũng biết rằng cấu trúc cụ thể các adenovirus đòi hỏi sự nghiên cứu về các vị trí chèn cụ thể của các gen khác loại cho mỗi loài, và gần như không thể khái quát về hành vi sinh học của các adenovirus đã biết khác nhau khi được chuyển đổi thành vector virus tái tổ hợp.

Cho đến nay, người, khỉ, gà, lợn, trong số các loài khác, các adenovirus đã được sử dụng làm các vector cho tiềm năng sử dụng như vaccin tái tổ hợp. Cụ thể, đã biết rằng các adenovirus gia cầm (FadV) là các ứng cử viên tiềm năng để điều chế ra vaccin tái tổ hợp. Tuy nhiên, như sẽ được mô tả ở dưới, khả năng sử dụng thành công chúng ở mức độ thương mại, cụ thể là ở ngành công nghiệp thú y, thường bị ức chế do không thể đạt được sản xuất quy mô lớn của chúng với sự ổn định cần thiết, do việc sản xuất các adenovirus được thực hiện từ các dòng tế bào mà sản lượng thường rất kém, hoặc có tính chất ngăn cản việc đạt được sự ổn định của vector virus trong các lần

cấy chuyển liên tiếp, do đó dễ hiểu được ngày nay không có vaccin được tạo vector trong các adenovirut gia cầm.

Ví dụ, công bố đơn quốc tế số WO94/24268 mô tả các vector tái tổ hợp FAdV có ít nhất một chuỗi nucleotit khác loại được chèn, và mà có lợi trong việc tạo ra đáp ứng miễn dịch trong các loại chim dễ mắc bệnh. Theo tài liệu này, các vùng không thiết yếu của gen adenovirut mà có thể phù hợp cho gen khác loại được thay thế hoặc được chèn, là các vùng được đặt ở đầu ngay cuối bộ gen, tốt hơn là vùng được nằm giữa 0,0038 và 0,0039 trong (97 và 99,9 m.u.) Vaccin tái tổ hợp, theo tài liệu đó, rõ ràng có thể được sử dụng kết hợp với vaccin kháng lại các virus khác, như vaccin của bệnh Marek hoặc bệnh Newcastle, mà không có bằng chứng cụ thể. Ngoài ra, trong tài liệu này hoạt động của adenovirut thu được sau các lần cấy chuyển liên tiếp trong các dòng tế bào cho sản xuất quy mô lớn cũng không được minh họa.

Đồng thời, patent Mỹ số 6,296,852 mô tả FAdV kiểu huyết thanh-9 FAdV (FAdV-9) trong đó phần chèn của chuỗi nucleotit khác loại vào trong các vùng không thiết yếu của bộ gen virus được thực hiện. Các vùng này có thể là các vùng không mã hóa được đặt ở phía đầu trái và/hoặc phải bộ gen, tốt hơn là ở vùng được đặt tại đầu phải (3'), giữa 0,0023 và 0,0039 trong (60 và 100 m.u.) Đối với tài liệu WO94/24268, mặc dù sáng chế này xác định vùng rộng lớn hơn khác cho phần chèn tiềm năng của các gen ngoại sinh, nhưng sáng chế không minh họa cho khả năng này, và cụ thể, không cả tính toàn vẹn của gen, sau các lần cấy chuyển liên tiếp trong các dòng tế bào.

Trong tài liệu khác (Corredor, J. C. và Nagy, E. , vùng đầu trái không thiết yếu của bộ gen adenovirut 9 trên gia cầm phù hợp cho phần chèn/thay thế gen ngoại. Nghiên cứu virus tập 149, 167-174; 2010), đã bộc lộ là vùng không thiết yếu đầu 5' của bộ gen FAdV-9, cũng có thể là vị trí phù hợp cho phần chèn hoặc phần thay thế bởi các gen ngoại sinh để tạo ra các vector tái tổ hợp. Ví dụ, một trong số các vector này thu được bằng cách thay thế vùng không thiết yếu được đặt giữa các nucleotit 491-2782 với việc mã hóa gen cho protein huỳnh quang xanh lá được tăng cường (EGFP). Tuy nhiên, tài liệu này, giống các tài liệu khác, không thể hiện liệu có hoặc không vector virus khi được điều chế sẽ ổn định khi chèn mã hóa gen ngoại sinh cho kháng nguyên của bệnh vào trong chúng, và bằng cách tái tạo chúng trong các hệ thống tế bào phù hợp để thu được vaccin tái tổ hợp, vì tài liệu chỉ thể hiện sự biểu diễn gen chỉ thị và

thiếu các xét nghiệm *in vitro*; ngoài ra nó không đề cập đến chế phẩm hoặc các mức bảo vệ đối với bệnh quan tâm.

Như có thể thấy, đã biết rằng các vùng không thiết yếu của bộ gen FAdV biểu diễn các vị trí tiềm năng mà chuỗi nucleotit ngoại sinh có thể được chèn hoặc được thay thế. Tuy nhiên, các vector được mô tả ở trạng thái của tình trạng kỹ thuật có nhược điểm là không ổn định ở thời điểm sản xuất vaccin tái tổ hợp ở cấp độ công nghiệp, do sự mất mát của gen khác loại được chèn sau các lần cấy chuyển khác nhau trong môi trường nuôi cấy tế bào.

Hơn nữa, trong tình trạng kỹ thuật, việc sử dụng các vector adenoviral trong điều trị cho loài chim, chủ yếu là gia cầm, đã bị trì hoãn do sự ngăn trở của nó với vaccin kháng bệnh Marek, một loại vaccin được sử dụng rộng rãi trong ngành công nghiệp gia cầm. Bệnh Marek (EM) là tình trạng bệnh bị gây ra bởi virus herpes tác động lên các loại chim nội địa, gây ra bệnh tăng sinh lympho bào làm tê liệt chân hoặc cánh, và các khối u bạch huyết, hoặc tử vong. Để ngăn bệnh này, vaccin hoạt động đơn trị hoặc đa trị được áp dụng, chủ yếu dưới da hoặc trong trứng.

Để giảm các chi phí và đạt hiệu quả lớn hơn ở thời điểm sử dụng, đôi khi sử dụng đồng thời ít nhất hai vaccin được ưu tiên. Tuy nhiên, mặc dù các tài liệu giống công bố đơn quốc tế số WO94/24268 được đề cập ở trên bộc lộ khả năng sử dụng các adenovirus kết hợp với vaccin Marek; các nghiên cứu tiếp theo đã chứng minh là vaccin adenovirus và virus vaccin Marek có một số trở ngại nghiêm trọng khi phân tích về tỷ lệ tử vong và các tổn thương được tạo ra bởi cả hai bệnh ở loài chim, lớn hơn việc kéo dài sự sống, đối với con mái xét về thương mại.

Hiện nay đã biết là bằng cách sử dụng đồng thời vaccin virus toàn phần kháng EM với vaccin tái tổ hợp trong vector adenovirus, vaccin kháng EM có thể ngăn cản vaccin tái tổ hợp do các cơ chế sau: a) các động học tái tạo khác nhau; b) vaccin cạnh tranh cho cùng loại tế bào để sao chép ở loài chim; và c) virus EM gây ra suy giảm miễn dịch loài chim. Rõ ràng, nếu các cản ngại này được giải quyết, và đạt được hiệu quả tiêm chủng đối với bệnh liên quan đến gen ngoại sinh của vaccin tái tổ hợp, thì cần phải sử dụng liều lượng cao hơn của vaccin tái tổ hợp đã nêu, hoặc làm giảm liều lượng của vaccin kháng EM (Breedlove et al., Avian influenza adenovirus-vectored *in-ovo* vaccination; target embryo tissues and combination with Marek's disease vaccine. Avian Disease. Vol. 55, 667-673; 2011). Tuy nhiên, tài liệu tham khảo tương tự của Breedlove's et al. thể hiện là việc tăng liều lượng của vaccin tái tổ hợp adenovirus có

thể gây ra sự cản trở tạm thời với vaccin kháng EM khiến nó không hiệu quả, tạo ra các vấn đề nghiêm trọng trong lĩnh vực này. Điều này có nghĩa là, cho đến nay, không có vaccin trên cơ sở vectơ virus adenovirus tái tổ hợp mà có thể biểu hiện gen ngoại sinh nhưng không ảnh hưởng đến sự bảo vệ được tạo bởi vaccin cho bệnh Marek hoặc ngược lại.

Tương tự, các kháng thể mẹ là yếu tố khác mà có khả năng ngăn cản vaccin. Mặc dù các kháng thể mẹ tạo ra sự bảo vệ cho động vật mới sinh, nhưng sự tồn tại của chúng có thể ức chế hoặc làm giảm các hiệu quả vaccin, khiến đáp ứng miễn dịch được tạo ra theo đó không tối ưu.

Thách thức khác được tìm thấy trong sự phát triển của vaccin nói chung là thời gian cần bảo vệ và khoảng thời gian bảo vệ đã nêu đạt được, làm chức năng của công thức được sử dụng cho vaccin.

Vaccin mà tạo ra sự bảo vệ sớm, nghĩa là, trong thời gian rất ngắn bắt đầu từ lúc sử dụng, sẽ có hiệu quả ngắn hạn do các mức độ bảo vệ sẽ giảm nhanh chóng, khiến cần tái chủng ngừa định kỳ. Ngược lại, vaccin mà tạo ra sự bảo vệ bền hoặc kéo dài sẽ mất nhiều thời gian hơn để đạt sự bảo vệ (sự bảo vệ muộn), mặc dù sự bảo vệ đã nêu sẽ kéo dài trong thời gian lâu hơn, nhưng thường cần ít tái chủng ngừa hơn để đạt hiệu quả bảo vệ mong muốn. Thông thường, để đạt sự bảo vệ kéo dài trong nhóm các động vật cần phải sử dụng vaccin bảo vệ sớm kết hợp với vaccin bảo vệ muộn để tránh khả năng mà các động vật bị ốm trong toàn bộ sự phát triển của chúng.

Trong lĩnh vực kỹ thuật này, đã biết rằng vaccin virus hoạt động thường tạo ra sự bảo vệ nhanh hoặc sớm, do nó đạt sự chấp nhận, nhưng không kéo dài, mức độ bảo vệ trong khoảng thời gian ngắn từ khi bắt đầu sử dụng vaccin. Mặt khác, cũng biết rằng vaccin virus bị bất hoạt tạo ra sự bảo vệ kéo dài hơn so với sự bảo vệ của virus hoạt động, nhưng lại cần thời gian dài để đạt được, nghĩa là, sự bảo vệ là muộn hơn và trong nhiều trường hợp vẫn cần tái tiêm chủng, mặc dù tần suất ít hơn.

Ví dụ, Stine et al. (Evaluation of inactivated newcastle disease, avian diseases, Vol. 24, No. 1 (Jan. - Mar., 1980), pp. 99-111) đánh giá ba loại vaccin kháng NDV: vaccin bị bất hoạt trong nhũ tương, vaccin bị bất hoạt được hấp thụ trong $Al(OH)_3$ và vaccin thương mại còn sống, phát hiện ra là vaccin còn sống tạo ra các độ chuẩn HI ở gà một tuần trước vaccin bị bất hoạt, nhờ đó vaccin bị bất hoạt trong nhũ tương tạo ra đáp ứng miễn dịch được duy trì.

Tương tự như vậy, Folitse et al. (Efficacy of combined killed-in-oil emulsion and alive newcastle disease vaccines in chickens, *Avian Diseases*, Vol. 42, No. 1 (Jan. - Mar., 1998), pp. 173-178) đề cập rằng có các báo cáo là vaccin NDV bị bất hoạt, được nhũ hóa trong dầu, kích ứng cao và kéo dài các mức độ lưu thông các kháng thể loài chim mà được tiêm chủng trước đó với vaccin hoạt động. Tương tự, các tác giả cũng đề cập lý do thu được đáp ứng kháng thể cao khi sử dụng vaccin NDV bị bất hoạt, kết hợp với vaccin hoạt động kháng lại một loại bệnh, có thể là do thực tế là lúc bắt đầu virus sống tái tạo nhanh chóng, biểu hiện nhanh đáp ứng miễn dịch chính, tiếp đó là sự giải phóng liên tục nhưng chậm kháng nguyên của vaccin bị bất hoạt, mà chúng hoạt động như liều tăng cường.

Đồng thời, Toro et. al (Avian influenza mucosal vaccination in chickens with replication-defective recombinant adenovirus vaccine, *Avian Diseases* 55:43–47, 2011) đã đánh giá việc bảo vệ được tạo ra bởi vaccin tái tổ hợp adenovirus mà không có khả năng sao chép adenovirus sẽ thể hiện gen cúm gia cầm H5 được tối ưu hóa trong các codon của nó, mà được sử dụng trên chim 5 ngày tuổi, và trong một số trường hợp tiến hành tái tiêm chủng khi chúng đạt 15 ngày tuổi. Các kết quả cho thấy rằng chỉ các con chim mà được tái tiêm chủng mới tạo ra nồng độ kháng thể cao. Các chuẩn độ có thể được phát hiện bắt đầu từ 9 ngày tuổi, đạt mức cao nhất ở 32 ngày tuổi.

Tương tự như vậy, có một số virus hoạt động mà tạo ra một sự bất thường đối với cả sự bảo vệ sớm và kéo dài, như virus Marek. Tuy nhiên, virus Marek có thể được sử dụng làm vector và trong các kỹ thuật đã biết đã chứng minh chúng đạt sự bảo vệ sớm và kéo dài đối với bệnh Marek chỉ với một lần sử dụng, nhưng đối với kháng nguyên ngoại sinh được chèn, thì lại không đạt được sự bảo vệ sớm, mà chỉ thể hiện có sự bảo vệ muộn và kéo dài.

Như vậy với các kỹ thuật đã biết, không thể sử dụng thành công các adenovirus và, cụ thể, adenovirus gia cầm huyết thanh 9 FAdV-9 đã biết này làm vaccin tái tổ hợp cho chim với gen ngoại sinh bất kỳ ở quy mô công nghiệp, mặc dù các vị trí chèn khác nhau đã được mô tả, nhưng một mặt do thực tế không đạt được đủ độ ổn định đối với sự tái tạo của chúng trên các dòng tế bào sau các lần cấy chuyển liên tiếp, và mặt khác do thực tế là vaccin bệnh Marek cản trở cơ chế hoạt động của các adenovirus hoặc ngược lại, nên trong các kỹ thuật đã biết này việc sử dụng các adenovirus kết hợp với vaccin bệnh Marek rõ ràng bị tránh thực hiện. Hơn nữa, không thể thu được vaccin tái

tổ hợp virus đạt được cả sự bảo vệ sớm cũng như bảo vệ kéo dài đối với kháng nguyên ngoại sinh được chèn trong vector virus mà chỉ cần sử dụng một lần duy nhất.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Trước những hạn chế của các kỹ thuật đã biết, mục đích của sáng chế là tạo ra vaccine tái tổ hợp trong adenovirus loại huyết thanh 9 cho gia cầm, trong đó vector đã nêu là ổn định khi được sản xuất ở cấp độ công nghiệp.

Mục đích khác của sáng chế là tạo ra vaccine tái tổ hợp mà, ngay cả nếu được sử dụng kết hợp với vaccine kháng bệnh Marek, thì cả hai vaccine này đều tạo ra đáp ứng miễn dịch đủ mà không bị ảnh hưởng bởi sự ngăn cản lẫn nhau.

Mục đích nữa của sáng chế là tạo ra vaccine tái tổ hợp hiệu quả mà không bị ảnh hưởng bởi các kháng thể mẹ, và tạo ra đáp ứng miễn dịch tối ưu.

Mục đích nữa của sáng chế là đề cập đến vaccine tái tổ hợp tạo ra đáp ứng bảo vệ vừa có tính bảo vệ, nghĩa là, trong 19 ngày đầu bắt đầu từ khi sử dụng, và kéo dài, nghĩa là, đến ít nhất 90 ngày sau khi sử dụng vaccine này.

Mục đích nữa của sáng chế là đề cập đến vaccine tái tổ hợp mà đạt được, với chỉ một lần sử dụng, cả sự bảo vệ sớm và sự bảo vệ kéo dài đối với bệnh liên quan đến kháng nguyên ngoại sinh được chèn trong vector virus chứa trong vaccine này.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các khía cạnh mới được xem xét về sự khác biệt của sáng chế sẽ được nêu cụ thể trong bộ yêu cầu bảo hộ đi kèm. Tuy nhiên, một số phương án, dấu hiệu và một số đối tượng và các ưu điểm của chúng tốt hơn là nên được hiểu rõ khi tham khảo phần mô tả chi tiết sáng chế có tham chiếu đến các hình vẽ đi kèm, trong đó:

Fig.1A là bản đồ giới hạn ADN của virus tái tổ hợp FAdV-9 với phần chèn virus cúm gia cầm HA, được xây dựng theo sáng chế.

Fig.1B là gel agarosa trong đó các đoạn ADN của virus tái tổ hợp FAdV-9 với phần chèn virus cúm gia cầm HA được thể hiện, được xây dựng theo sáng chế, thu được bằng cách cắt bởi enzym giới hạn.

Fig.1C là môi trường nuôi cấy tế bào Celi không bị nhiễm, và môi trường nuôi cấy bị nhiễm virus tái tổ hợp FAdV-9 với phần chèn virus cúm gia cầm HA, được thực hiện theo sáng chế.

Fig.2A thể hiện bản đồ giới hạn ADN của virus tái tổ hợp FAdV-9 với phần chèn virus viêm gan xơ 4 có thể vùi, được thực hiện theo sáng chế.

Fig.2B là gel agarosa trong đó các đoạn ADN của virus tái tổ hợp FAdV-9 với phần chèn viêm gan xơ 4 có thể vùi được thể hiện, được thực hiện theo sáng chế, thu được bằng cách cắt bởi enzym giới hạn.

Fig.2C là môi trường tế bào Celi không bị nhiễm, và môi trường nuôi cấy bị nhiễm với virus tái tổ hợp FAdV-9 với phần chèn virus viêm gan xơ 4 có thể vùi, được thực hiện theo sáng chế.

Fig.3A thể hiện bản đồ giới hạn ADN của virus tái tổ hợp FAdV-9 với phần chèn glycoprotein-B của virus gây viêm thanh khí quản truyền nhiễm trên chim, được thực hiện theo sáng chế.

Fig.3B là gel agarosa trong đó các đoạn ADN của virus tái tổ hợp FAdV-9 với phần chèn glycoprotein-B của virus gây viêm thanh khí quản truyền nhiễm trên chim được thể hiện, được thực hiện theo sáng chế, thu được bằng cách cắt bởi enzym giới hạn.

Fig.3C là môi trường nuôi cấy tế bào Celi không bị nhiễm, và môi trường nuôi cấy bị nhiễm virus tái tổ hợp FAdV-9 với phần chèn glycoprotein-B của virus gây viêm thanh khí quản truyền nhiễm trên chim, được thực hiện theo sáng chế.

Fig.4A là bản đồ giới hạn ADN của virus tái tổ hợp FAdV-9 với phần chèn protein HN của virus gây bệnh Newcastle, được thực hiện theo sáng chế.

Fig.4B là gel agarosa trong đó các đoạn ADN của virus tái tổ hợp FAdV-9 với phần chèn protein HN của virus gây bệnh Newcastle được thể hiện, được thực hiện theo sáng chế, thu được bằng cách cắt bởi enzym giới hạn.

Fig.4C là môi trường nuôi cấy tế bào Celi không bị nhiễm, và môi trường nuôi cấy bị nhiễm virus tái tổ hợp FAdV-9 với phần chèn protein HN của virus gây bệnh Newcastle, được thực hiện theo sáng chế.

Fig.5A là bản đồ giới hạn ADN của virus tái tổ hợp FAdV-9 với phần chèn protein HN của virus gây bệnh Newcastle, được chèn giữa các nucleotit 38,807 và 40,561 của bộ gen.

Fig.5B là gel agarosa trong đó các đoạn ADN của virus tái tổ hợp FAdV-9 với phần chèn protein HN của virus gây bệnh Newcastle, được chèn giữa các nucleotit 38,807 và 40,561 của bộ gen, thu được bằng cách cắt bởi enzym giới hạn được thể hiện.

Fig.5C là gel agarosa trong đó các đoạn ADN của virus tái tổ hợp FAdV-9 với phần chèn protein HN của virus gây bệnh Newcastle, được chèn giữa các nucleotit 38,807 và 40,561 của bộ gen sau 2 lần cấy chuyển trong môi trường nuôi cấy tế bào CeLi, thu được bằng cách cắt bởi enzym giới hạn, được thể hiện.

Fig.6 là đồ thị thể hiện kết quả về sự ức chế ngưng kết hồng cầu (IH) trên gà con thương mại giống sáng (CRL) được chủng ngừa trong trứng, với huyết thanh được thực hiện ở một ngày tuổi (DE).

Fig.7 là đồ thị thể hiện kết quả IH trên gà con CRL được chủng ngừa trong trứng, với huyết thanh được thực hiện ở 10 ngày tuổi (DE).

Fig.8 là đồ thị thể hiện kết quả IH trên gà con CRL được chủng ngừa trong trứng sau 18 ngày ấp (DI) hoặc ở 1 ngày tuổi (DE), với huyết thanh được thực hiện ở 19 ngày tuổi (DE).

Fig.9 là đồ thị thể hiện kết quả IH trên gà con CRL được chủng ngừa trong trứng sau 18 ngày ấp (DI) hoặc ở 1 ngày tuổi (DE), và được tái tiêm chủng ở 10 ngày tuổi (DE) với huyết thanh được thực hiện ở 19 ngày tuổi (DE).

Fig.10 là đồ thị thể hiện kết quả IH trên gà con CRL được chủng ngừa trong trứng sau 18 ấp (DI) hoặc ở 1 ngày tuổi (DE), với huyết thanh được thực hiện ở 31 ngày tuổi (DE).

Fig.11 là đồ thị thể hiện kết quả IH trên gà con CRL được chủng ngừa trong trứng sau 18 ngày ấp (DI) hoặc ở 1 ngày tuổi (DE), và được tái tiêm chủng ở 10 ngày tuổi (DE) với huyết thanh được thực hiện ở 31 ngày tuổi (DE).

Fig.12 là đồ thị thể hiện kết quả IH trên gà con CRL được chủng ngừa trong trứng sau 18 ngày ấp (DI) hoặc ở 1 ngày tuổi (DE), với huyết thanh được thực hiện ở 38 ngày tuổi (DE).

Fig.13 là đồ thị thể hiện kết quả IH trên gà con CRL được chủng ngừa trong trứng sau 18 ngày ấp (DI) hoặc ở 1 ngày tuổi (DE), và được tái tiêm chủng ở 10 ngày tuổi (DE) với huyết thanh được thực hiện ở 38 ngày tuổi (DE).

Fig.14 là đồ thị thể hiện kết quả IH trên gà con CRL được chủng ngừa trong trứng sau 18 ngày ấp (DI) hoặc ở 1 ngày tuổi (DE), với huyết thanh được thực hiện ở 45 ngày tuổi (DE).

Fig.15 là đồ thị thể hiện kết quả IH trên gà con CRL được chủng ngừa trong trứng sau 18 ngày ấp (DI) hoặc ở 1 ngày tuổi (DE), và được tái tiêm chủng ở 10 ngày tuổi (DE) với huyết thanh được thực hiện ở 45 ngày tuổi (DE).

Fig.16 là đồ thị thể hiện hiệu quả trên gà con CRL được chủng ngừa ở 1 ngày tuổi (DE), tái tiêm chủng hoặc không tái tiêm chủng ở 10 ngày tuổi (DE) và tiếp xúc mầm bệnh ở 19 ngày tuổi (DE).

Fig.17 là đồ thị thể hiện hiệu quả trên gà con CRL được chủng ngừa ở 1 ngày tuổi (DE), tái tiêm chủng hoặc không tái tiêm chủng ở 10 ngày tuổi (DE) và được tiếp xúc mầm bệnh ở 31 ngày tuổi (DE).

Fig.18 là đồ thị thể hiện hiệu quả trên gà con CRL được chủng ngừa ở 1 ngày tuổi (DE), tái tiêm chủng hoặc không tái tiêm chủng ở 10 ngày tuổi (DE) và được tiếp xúc mầm bệnh ở 93 ngày tuổi (DE).

Fig.19 là đồ thị thể hiện kết quả IH trên gà con CRL được chủng ngừa ở 1 ngày tuổi (DE), tái tiêm chủng hoặc không tái tiêm chủng ở 10 ngày tuổi (DE), với huyết thanh được thực hiện ở 19 ngày tuổi (DE).

Fig.20 là đồ thị thể hiện kết quả IH trên gà con CRL được chủng ngừa ở 1 ngày tuổi (DE), tái tiêm chủng hoặc không tái tiêm chủng ở 10 ngày tuổi (DE), với huyết thanh được thực hiện ở 31 ngày tuổi (DE).

Fig.21 là đồ thị thể hiện kết quả IH trên gà con CRL được chủng ngừa ở 1 ngày tuổi (DE), tái tiêm chủng hoặc không tái tiêm chủng ở 10 ngày tuổi (DE) với huyết thanh được thực hiện ở 93 ngày tuổi (DE).

Fig.22 là đồ thị thể hiện hiệu quả trên gà con không có các mầm bệnh cụ thể (LPE) được chủng ngừa ở 1 và 10 ngày tuổi (DE), và được tiếp xúc với mầm bệnh ở 31 ngày tuổi (DE).

Fig.23 là đồ thị thể hiện kết quả IH trên gà con LPE được chủng ngừa ở 1 và 10 ngày tuổi (DE), với huyết thanh được thực hiện ở 31 ngày tuổi (DE).

Mô tả chi tiết sáng chế

Trong khi phát triển sáng chế, đã phát hiện ra là vaccin tái tổ hợp bao gồm vector adenovirut gia cầm loại huyết thanh 9 (FAdV-9) có ít nhất một chuỗi nucleotit ngoại sinh được chèn mã hóa cho ít nhất một kháng nguyên bệnh đang quan tâm, và mà được thay thế bởi vùng không thiết yếu trong bộ gen của adenovirut, cụ thể là được chèn vào giữa các nucleotit 491-2782, và chất mang được dung, chất phụ và/hoặc tá được, thì có khả năng bảo vệ ổn định kháng lại bệnh đang quan tâm, đồng thời có sự ổn định khi được sản xuất ở quy mô công nghiệp, do vector adenovirut không mất chuỗi nucleotit ngoại sinh được chèn khi thực hiện các lần cấy chuyển liên tiếp trong môi trường nuôi cấy tế bào. Tương tự, bất ngờ là vaccin tái tổ hợp này không mất hiệu quả trên loài chim được tiêm chủng ngay cả khi được sử dụng kết hợp với vaccin virus toàn phần bệnh Marek , và mà không làm vaccin Marek mất hiệu quả khi được sử dụng với vaccin tái tổ hợp này. Theo cách tương tự, vaccin tái tổ hợp theo sáng chế cho thấy ưu điểm là hiệu quả không bị ảnh hưởng bởi các kháng thể mẹ trong các động vật mới sinh và tạo ra, chỉ với một lần sử dụng, sự bảo vệ sớm và kéo dài.

Trong trường hợp này, theo mục đích của sáng chế được xem xét là sự bảo vệ sớm đạt được trong 19 ngày bắt đầu từ khi sử dụng vaccin, trong khi sự bảo vệ kéo dài đạt được đến ít nhất 90 ngày sau khi sử dụng vaccin.

Vector adenovirut được sử dụng có thể là sống (hoạt động) hoặc được bất hoạt. Thuật ngữ còn sống hoặc hoạt động nghĩa là vector tái tổ hợp duy trì khả năng tái tạo của nó, trong khi được bất hoạt nghĩa là vector tái tổ hợp adenovirut có chuỗi nucleotit ngoại sinh mất khả năng tái tạo. Sự bất hoạt của vector tái tổ hợp được thực hiện bằng cách sử dụng các quy trình vật lý hoặc hóa học mà đã biết trong tình trạng kỹ thuật, như sự bất hoạt hóa học bằng formaldehyt hoặc beta-propiolacton (Office International des Epizooties 2008). Newcastle Disease. OIE Manual of Diagnostic Tests and

Vaccines for Terrestrial Animals. Office International des Epizooties. France, p. 576-589).

Như được nêu ở trên, vector được sử dụng là adenovirut gia cầm kiểu huyết thanh 9 (FAdV-9) mà bao gồm chủng bất kỳ. Tốt hơn là, FAdV-9 được chọn từ các chủng có số truy cập GenBank EU979376, AF083975, HQ697594, AF508958, AF339923, EU847634, EU847629, EU847628, DQ323986, AY683550, EU847635, NC_000899, và AC_000013.

Hiện tại, liên quan đến chuỗi nucleotit ngoại sinh, nó mã hóa cho ít nhất trên kháng nguyên của bệnh đang quan tâm, tốt hơn là kháng nguyên đã nêu là của ít nhất một bệnh được chọn từ dịch cúm gia cầm, viêm gan thể vùi, virut gây viêm thanh khí quản truyền nhiễm ở chim, bệnh Newcastle, túi hoạt dịch nhiễm Fabricius, viêm phế quản truyền nhiễm, bệnh được gây ra bởi metapneumovirut (MPNV), bệnh Marek, chim bị nhiễm bệnh thiếu máu hoặc gen khác bất kỳ mà kích thước cho phép chèn trong vector adenovirut. Tốt hơn nữa là, gen virut cúm gia cầm được sử dụng.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, chuỗi nucleotit ngoại sinh gồm có việc mã hóa gen bao gồm nhóm ngưng kết tổ hồng cầu (HA) của virut cúm gia cầm, được chọn từ 18 phân nhóm ngưng kết tổ hồng cầu hoặc biến thể gây miễn dịch của virut cúm, mà tốt hơn nữa là mã hóa ít nhất một trong số các phân nhóm H1, H2, H3, H5, H6, H7 hoặc H9 của protein đã nêu; sợi và hexon của virut viêm gan thể vùi, các kiểu huyết thanh 4 và 8; glycoprotein B (gB) và glycoprotein D (gD) virut gây viêm thanh khí quản lây nhiễm trên chim (LTI); các protein HN và F của virut gây bệnh Newcastle; sự lây nhiễm virut protein VP2 của túi hoạt dịch của Fabricius; protein S1 và S2 của virut viêm phế quản truyền nhiễm; protein F của metapneumovirut (MPNV); và protein VP1, VP2 và VP3 của bệnh thiếu máu truyền nhiễm ở loài chim.

Tương tự, chuỗi nucleotit ngoại sinh có thể bao gồm gen mã hóa ít nhất một kháng nguyên của adenovirut gia cầm khác với FAdV-9 được sử dụng làm vector virut.

Vector adenovirut vaccin bao gồm gen ngoại sinh đang quan tâm của sáng chế có thể được tạo ra bởi bằng cách khuếch đại PCR của chuỗi nucleotit đang quan tâm, để có thể chèn nó sau đó, đã được khuếch đại, vào trong vector adenovirut trong đó vùng bộ gen không thiết yếu được nằm giữa các nucleotit 491-2782 đã được loại bỏ. Việc chèn gen ngoại sinh và việc xóa bỏ vùng adenovirut không quan trọng được tạo bằng

cách sử dụng các kỹ thuật nhân dòng tiêu chuẩn trong sinh học phân tử. Vì vậy bản sao truyền nhiễm được sản xuất được chuyển nạp trong môi trường nuôi cấy tế bào để tạo ra virus tái tổ hợp.

Virus tái tạo trong hệ thống bất kỳ phù hợp cho sự sinh trưởng của nó, như các tế bào gan bất tử có nguồn gốc gia cầm (CeLi), các dòng tế bào thương mại hoặc được thiết kế rõ ràng để phát triển adenovirus, đến khi đạt ít nhất nồng độ virus yêu cầu để đạt đáp ứng kháng nguyên, tốt hơn là ít nhất là $10^{5.0}$ DICC 50 % mỗi liều, tốt hơn nữa là ít nhất $10^{6.0}$ DICC 50 % mỗi liều.

Ví dụ, virus tái tổ hợp có thể tái tạo trong các tế bào dòng CeLi được phát triển với môi trường nuôi cấy cụ thể, bằng cách sử dụng các hệ nuôi cấy triển tĩnh, trong các chai môi trường nuôi cấy tế bào, trong các vật mang vi thể, trong các hệ thống sản xuất tế bào quy mô công nghiệp, hoặc trong các hệ thống chai Roller, đến khi độ chuẩn trên các kiểm tra peroxidaza miễn dịch đạt mức tối thiểu là $10^{6.0}$ DICC 50 % mỗi liều. Chuẩn độ này có thể được đạt sau khi thực hiện từ 5 đến 10 lần cấy chuyển không kiểm soát trong cùng loại tế bào. Hơn nữa, sự thu hoạch có thể thực hiện bằng cách ly tâm, được chia phần và được duy trì đông lạnh, cuối cùng thu được giống gốc (MS)

Với giống gốc, lần cấy chuyển nữa được thực hiện trên các tế bào giống nhau để tạo ra hạt giống sản xuất (SP) và một điểm nữa ngoài điểm này là để tạo ra vaccin.

Vì vậy, sáng chế bao gồm giống gốc của virus tái tổ hợp adenovirus gia cầm kiểu huyết thanh 9 (FAdV-9) trong đó có chuỗi nucleotit ngoại sinh được chèn mã hóa kháng nguyên bệnh đang quan tâm và thay thế vùng không thiết yếu bộ gen adenovirus, cụ thể là được chèn vào giữa các nucleotit 491-2782; giống gốc đã nêu thu được sau từ 6 đến 11 lần cấy chuyển trong môi trường nuôi cấy tế bào.

Tiếp theo, trong phương án mà vaccin còn sống hoặc hoạt động, đó là virus hoạt động, tốt hơn là được chọn từ các adenovirus gia cầm gây bệnh tự nhiên, có khả năng gây bệnh thấp hoặc được làm suy giảm độc lực bởi các quy trình đã được biết trong tình trạng kỹ thuật. Mặt khác, khi vaccin được bất hoạt, nồng độ virus được yêu cầu để đạt đáp ứng kháng nguyên đạt được, thì sẽ được tiến hành cùng với sự bất hoạt của virus. Tốt hơn là, việc làm bất hoạt được thực hiện qua các quy trình vật lý hoặc hóa học đã biết trong tình trạng kỹ thuật, tốt hơn là thông qua sự bất hoạt hóa học bằng formaldehyt hoặc beta-propiolacton.

Trong trường hợp vaccin của sáng chế còn sống hoặc hoạt động, chất mang được dùng là các dung dịch nước, tốt hơn là được chọn từ nhóm gồm có các dung dịch nước bao gồm chất ổn định TPGA (trehaloza, phosphat, glutamat, albumin); các dung dịch nước bao gồm chất ổn định pepton; và các dung dịch nước bao gồm sữa tách kem.

Khi vaccin theo sáng chế là vaccin bất hoạt, chất dẫn thuốc được dùng được ưu tiên là các dung dịch nước hoặc các nhũ tương. Cụ thể, chất dẫn thuốc được sử dụng được ưu tiên là nhũ tương nước-dầu, dầu nước hoặc nước-dầu-nước (WOW), tốt hơn là nhũ tương nước-dầu-nước.

Đối với việc sử dụng của vaccin còn sống hoặc hoạt động, việc sử dụng này có thể được thực hiện trong cơ, trong mũi, dưới da, bằng cách phun, khí dung, đường miệng bằng cách uống, hoặc trong trứng bằng cách sử dụng các phương tiện và các cách phù hợp trong các trường hợp khác nhau. Nếu đó là vaccin bị bất hoạt thì sẽ được sử dụng trong cơ hoặc dưới da, tốt hơn là dưới da.

Tương tự, vaccin tái tổ hợp của sáng chế có thể được sử dụng ở dạng một liều đơn, liều đôi hoặc đa liều, hoặc riêng lẻ hoặc kết hợp với vaccin tái tổ hợp hoặc không tái tổ hợp khác, còn sống (có hoạt động) hoặc bất hoạt, như vaccin kháng bệnh Marek.

Tương tự, ngay cả khi vaccin của sáng chế được sử dụng với một liều đơn hoặc sử dụng đa liều, thì nó đạt cả sự bảo vệ sớm và kéo dài cho bệnh đang quan tâm liên quan đến kháng nguyên được mã hóa bởi chuỗi nucleotit ngoại sinh được chèn trong vectơ virus được chứa trong vaccin đã nêu.

Theo phương án bổ sung, vaccin tái tổ hợp đa trị bao gồm vectơ của adenovirus gia cầm kiểu huyết thanh 9 (FAdV-9) theo sáng chế, có ít nhất hai chuỗi nucleotit ngoại sinh được chèn mã hóa ít nhất hai kháng nguyên hoặc từ bệnh giống nhau đang quan tâm hoặc các bệnh khác đang quan tâm, và thay thế cùng không thiết yếu bộ gen của adenovirus, đặc biệt mong muốn là được chèn giữa các nucleotit 491-2782.

Theo phương án của sáng chế, vaccin đa trị bao gồm vaccin thứ nhất được dựa trên vectơ của adenovirus gia cầm kiểu huyết thanh 9 (FAdV-9) theo sáng chế, có ít nhất một chuỗi nucleotit ngoại sinh được chèn mã hóa ít nhất một kháng nguyên của bệnh được quan tâm và thay thế vùng không thiết yếu trong bộ gen của adenovirus, cụ thể là được chèn giữa các nucleotit 490-2782 được mô tả; và ít nhất vaccin thứ hai trên

cơ sở vectơ của adenovirut gia cầm kiểu huyết thanh 9 (FAdV-9) theo sáng chế, có ít nhất một chuỗi nucleotit ngoại sinh mã hóa ít nhất một kháng nguyên khác với chuỗi của vaccin thứ nhất, hoặc cùng bệnh đang quan tâm hoặc bệnh khác, và thay thế vùng không thiết yếu trong bộ gen của adenovirut, cụ thể là được chèn giữa các nucleotit 491-2782. Vaccin đa trị có thể được tìm thấy trong các dạng còn sống hoặc hoạt động, hoặc bất hoạt.

Tương tự, sáng chế đưa ra vaccin đa trị bao gồm vaccin virut toàn phần bệnh Marek kết hợp với ít nhất một vaccin trên cơ sở vectơ adenovirut gia cầm loại huyết thanh 9 (FAdV-9) theo sáng chế, có chuỗi nucleotit ngoại sinh được chèn mã hóa cho kháng nguyên bệnh đang quan tâm và mã thay thế vùng không thiết yếu trong bộ gen adenovirut, cụ thể là được chèn giữa các nucleotit 491-2782. Vaccin đa trị có thể được tìm thấy các dạng còn sống hoặc hoạt động, hoặc bất hoạt.

Hơn nữa, theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp chủng ngừa để phòng chống bệnh cho động vật, trong đó phương pháp này bao gồm việc sử dụng cho động vật vaccin tái tổ hợp theo sáng chế, bao gồm vectơ adenovirut gia cầm kiểu huyết thanh 9 (FAdV-9) có chuỗi nucleotit ngoại sinh được chèn mã hóa cho kháng nguyên bệnh được quan tâm, và mã thay thế vùng không thiết yếu trong bộ gen adenovirut, cụ thể là được chèn giữa các nucleotit 491-2782; và chất mang được dùng, chất phụ trợ và/hoặc tá dược; trong đó vaccin đã nêu có thể tạo ra đáp ứng miễn dịch trên động vật.

Chuỗi nucleotit ngoại sinh mã hóa kháng nguyên của bệnh được quan tâm, cụ thể là từ ít nhất một bệnh được chọn từ bệnh cúm gia cầm, viêm gan thể vùi, bệnh gây viêm thanh khí quản truyền nhiễm ở chim, bệnh Newcastle, túi hoạt dịch nhiễm Fabricius, viêm phế quản truyền nhiễm, bệnh được gây ra bởi metapneumovirut (MPNV), bệnh Marek, bệnh thiếu máu truyền nhiễm ở loài chim hoặc gen bất kỳ khác mà kích thích cho phép chèn trong vectơ adenovirut. Tốt hơn là, kháng nguyên cúm gia cầm được sử dụng.

Tốt hơn là, chuỗi nucleotit ngoại sinh gồm có chuỗi mã hóa gen được chọn từ nhóm bao gồm ngưng kết tổ hồng cầu (HA) của virut cúm gia cầm virut, được chọn từ 18 phân nhóm ngưng kết tổ hồng cầu hoặc biến thể gây miễn dịch của virut cúm, mà tốt hơn nữa là mã hóa ít nhất một trong số các phân nhóm H1, H2, H3, H5, H6, H7

hoặc H9 của protein đã nêu; sợi và hexon của thể vùi viêm gan virus, kiểu huyết thanh 4 hoặc 8; glycoprotein B (gB) và glycoprotein D (gD) của virus gây viêm thanh khí quản truyền nhiễm ở chim; các protein HN và F của virus gây bệnh Newcastle; sự lây nhiễm virus protein VP2 của túi hoạt dịch của Fabricius; protein S1 và S2 của viêm phế quản truyền nhiễm virus; protein F của metapneumovirus (MPNV); và protein VP1, VP2 và VP3 của bệnh thiếu máu truyền nhiễm ở loài chim.

Tương tự, nồng độ yêu cầu của vaccine tái tổ hợp để đạt sự bảo vệ phù hợp là ít nhất $10^{5.0}$ DICC50 % mỗi liều, tốt hơn nữa là ít nhất $10^{6.0}$ DICC50 % mỗi liều.

Vaccine còn sống hoặc hoạt động tái tổ hợp có thể được sử dụng trong cơ, trong mũi, dưới da, bằng cách phun, khí dung, đường miệng qua việc uống nước, hoặc trong trứng bằng cách sử dụng các phương tiện và theo cách phù hợp trong từng trường hợp cụ thể. Nếu đó là vaccine bị bất hoạt, thì việc sử dụng là trong cơ hoặc dưới da, tốt hơn là dưới da. Tương tự, vaccine tái tổ hợp theo sáng chế có thể được sử dụng bằng một liều đơn, liều kép hoặc ba liều, hoặc đơn lẻ hoặc kết hợp với vaccine tái tổ hợp khác hoặc không tái tổ hợp, còn sống (có hoạt động) hoặc bất hoạt, như vaccine kháng bệnh Marek.

Tương tự, ngay cả khi vaccine theo sáng chế được sử dụng với một liều đơn hoặc sử dụng đa liều, thì nó đạt cả sự bảo vệ sớm và kéo dài cho bệnh đang quan tâm liên quan đến kháng nguyên được mã hóa bởi chuỗi nucleotit ngoại sinh được chèn trong vector virus được chứa trong vaccine này.

Sáng chế sẽ được hiểu rõ hơn khi tham khảo các ví dụ sau, tuy nhiên các ví dụ này chỉ minh họa và nhằm mục đích làm rõ các phương án ưu tiên thực hiện của sáng chế chứ không hàm ý giới hạn sáng chế ở các phương án thực hiện này, các phương án khác có thể được thực hiện khi dựa vào phần mô tả chi tiết được đề cập ở trên.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Tạo ra vector FAdV-9

Đầu tiên, bộ gen FAdV-9 45 kb có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, được tạo ra bằng cách di truyền ngược và chứa các vùng FV1 (nằm giữa các nucleotit 1-491) và FV2 (nằm giữa các nucleotit 2,782-7,453), với vùng không quan trọng có kích thước 2,291 pb được loại bỏ, bao gồm vùng nằm giữa các nucleotit 491-2,782, ví dụ, ở 5'

đầu của bộ gen; Hơn nữa, vị trí Swal, duy nhất cho các gen đang quan tâm, được chèn vào vị trí 491. Bộ gen này được nhân dòng trong plasmit pBg với các vị trí giới hạn đặc biệt ở các đầu của nó cho phép tạo ra virus sống trong nuôi cấy.

Tiếp theo, vị trí EcoRV được đưa vào trong FV-2 bằng cách sử dụng oligonucleotit bởi kỹ thuật PCR, do đó thu được thể trung gian p Δ L2.4. Trong thể trung gian này, đoạn gen ban đầu được chèn vào giữa 4,391 và 7,453, các nucleotit được cắt bỏ, còn lại nhánh tái tổ hợp là 2,100 pb. Hơn nữa, đoạn của PCR EcoRV-EcoRV đã được tách dòng với đầu cắt bằng vào pShuttle từ AdEASY, được cắt bằng EcoRV-PmeI. Vị trí EcoRI được giữ.

Tại vị trí Swal trong 491 nucleotit, catxet biểu hiện từ pVAX được nhân dòng bằng cách sử dụng CMV, poliLinker và PoliA, và mà cũng được chứa vị trí PmeI duy nhất để nhân dòng gen quan tâm, nhờ đó thu được dòng lây nhiễm quan tâm. Sự lây nhiễm dòng lây nhiễm này vào môi trường nuôi cấy tế bào tạo ra virus tái tổ hợp quan tâm.

Ví dụ 2. Tạo ra virus tái tổ hợp rFAdV9-435 trong môi trường nuôi cấy tế bào

Theo phương pháp luận được mô tả trong ví dụ 1, dòng lây nhiễm FAdV-9 thu được bằng cách chèn gen H5 từ virus cúm gia cầm gây bệnh thấp VIABP-H5N2, thu được chủng 435 (rFAdV9-435) với số truy cập GenBank FJ864690, mà bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2.

Thứ nhất, để thu được giống gốc (SM), rFAdV9-435 được tái bản trong các tế bào dòng CeLi được sinh trưởng trong môi trường nuôi cấy DMEM F12 + Glutamax, trong các chai môi trường nuôi cấy tế bào (hệ tĩnh). Sau khi thực hiện 7 lần cấy chuyển không kiểm soát trên cùng loại tế bào, đạt được độ chuẩn theo thử nghiệm peroxidaza miễn dịch là $10^{6.0}$ DIC50 %. Phần thu hoạch được ly tâm ở 500 g trong 20 phút, và được chia phần thành 1,5 mL virus đông lạnh, được bảo quản lạnh sâu ở nhiệt độ từ -70 °C đến -80 °C.

Các giống gốc (SM) được kiểm tra để loại trừ sự có mặt của vi khuẩn, mycoplasma gia cầm, nấm và nấm men, cũng như để chứng minh rằng MS đã nêu là không có virus gia cầm.

Hơn nữa, SM được thử nghiệm trong các con gà không có mầm bệnh cụ thể (SPF) để xác định tính không gây độc của nó, tiềm năng, khả năng miễn dịch và liều tối thiểu cần để tạo ra sự bảo vệ phù hợp và tạo miễn dịch.

Với chủng giống gốc, thực hiện thêm một lần cấy chuyển trên các tế bào giống nhau (CeLi) để tạo ra hạt giống sản xuất.

Ví dụ 3. Tạo ra các virus tái tổ hợp khác

Tiếp theo, giống như phương pháp được mô tả ở trên, các virus tái tổ hợp FAdV-9 bổ sung thu được theo kết quả thể hiện trên bảng 1:

Bảng 1. Các virus tái tổ hợp FAdV-9 được tạo ra với các phần chèn khác nhau.

Phần chèn	Tên của virus tái tổ hợp
Cúm gia cầm H7 H7N3	rFAdV9-H7IA
Sợi của viêm gan thể vùi kiểu huyết thanh-4	rFAdV9-Fib HCI
Viêm thanh khí quản gia cầm glycoprotein B (gB)	rFAdV9-gBLT
Bệnh Newcastle HN	rFAdV9-HN
Viêm phế quản truyền nhiễm S1 và S2	rFAdV9-S1S2BI
Cúm gia cầm H5 và H7	rFAdV9-H5H7IA
Circovirus ở lợn ORF2	rFAdV9-ORF2PCV2
Bệnh thiếu máu truyền nhiễm ở gia cầm VP1 và VP2	rFAdV9-VP2VP1CAV
Viêm thanh khí quản gia cầm glycoprotein D (gD)	rFAdV9-gDLT
<i>Salmonella enterica</i> flagellin C	rFAdV9-FliC

Các vector tái tổ hợp này được xác định đặc trưng bằng các cắt bởi enzyme giới hạn XhoI. Trên Fig.1A bản đồ giới hạn ADN của vector tái tổ hợp rFAdV9-H7IA được thể hiện; băng 4,7 kb thể hiện đoạn giới hạn mà gen khác loại được nhân dòng. Trên Fig.1B 3629 bp có thể được quan sát, mà tương ứng với gen HA cúm gia cầm, chứng minh rằng vector tái tổ hợp rFAdV9-H7IA thực sự được chèn gen này và, hơn nữa, vector này thể hiện sự ổn định sau 10 lần cấy chuyển trong môi trường nuôi cấy tế bào. Trên Fig.1C, trên cạnh trái, môi trường nuôi cấy tế bào CeLi không nhiễm có thể được quan sát, trong khi trên cạnh phải hiệu ứng bệnh lý tế bào được gây ra bởi sự nhân lên của vector tái tổ hợp rFAdV9-H7IA trong các tế bào CeLi với nồng độ virus là $1,1 \times 10^6$ UFP có thể được quan sát, chỉ ra rằng nó tạo ra hiệu ứng bệnh lý tế bào tốt do thực

tế là vector tái tổ hợp đã nêu hoạt động ổn định và bình thường trong môi trường nuôi cấy tế bào CeLi.

Hơn nữa, trên Fig.2A bản đồ giới hạn ADN của vector tái tổ hợp rFAdV9-Fib HCI được thể hiện; dải 1,4 kb thể hiện đoạn giới hạn mà gen khác loại được nhân dòng, trong khi trên Fig.2B là dải 1652 pb, tương ứng với Fib4 gene của viêm gan thể vùi kiểu huyết thanh-4 được nhìn thấy, thể hiện rằng vector tái tổ hợp rFAdV9-Fib HCI thực sự có gen này được chèn và nữa là vector đã nêu là ổn định sau khi 10 lần cấy chuyển trong môi trường nuôi cấy tế bào. Cuối cùng, trên Fig.2C, trên cạnh trái, môi trường nuôi cấy tế bào CeLi không nhiễm có thể được quan sát, trong khi trên cạnh phải hiệu ứng bệnh lý tế bào được gây ra bởi sự lan truyền của vector tái tổ hợp rFAdV9-Fib HCI trong các tế bào CeLi với nồng độ virus là $1,4 \times 10^5$ UFP có thể được quan sát, chỉ ra rằng nó tạo ra hiệu ứng bệnh lý tế bào tốt do thực tế là vector tái tổ hợp đã nêu hoạt động ổn định và bình thường trong môi trường nuôi cấy tế bào CeLi.

Trên Fig.3A bản đồ giới hạn ADN của vector tái tổ hợp rFAdV9-gBLT được thể hiện; dải 5,6 kb thể hiện đoạn giới hạn mà gen khác loại được nhân dòng. Fig.3B thể hiện dải 4,573 pb, tương ứng với gen gB của các con chim nhiễm viêm thanh khí quản, chứng minh rằng vector tái tổ hợp rFAdV9-gBLT thực sự có gen này được chèn và có vector đã nêu là ổn định sau 10 lần cấy chuyển trong môi trường nuôi cấy tế bào. Trên Fig.3C, trên cạnh trái môi trường nuôi cấy tế bào CeLi không nhiễm có thể được quan sát, trong khi trên cạnh phải hiệu ứng bệnh lý tế bào được gây ra bởi sự truyền của vector tái tổ hợp rFAdV9-gBLT trong các tế bào CeLi với nồng độ virus là $2,6 \times 10^6$ UFP có thể được quan sát. Ở trên chỉ ra là vector tái tổ hợp này là ổn định trong môi trường nuôi cấy tế bào CeLi.

Trên Fig.4A bản đồ giới hạn ADN của rFAdV9-HN vector tái tổ hợp được thể hiện; dải 4,8 kb thể hiện đoạn giới hạn mà gen khác loại được nhân dòng. Fig.4B thể hiện dải 996 bp, tương ứng với gen HN của bệnh Newcastle, với mà được thể hiện là vector tái tổ hợp rFAdV9-HN thực sự có gen này được chèn và có vector đã nêu là ổn định sau 10 lần cấy chuyển trong môi trường nuôi cấy tế bào. Trên Fig.4C, trên cạnh trái, môi trường nuôi cấy tế bào CeLi không nhiễm có thể được quan sát, trong khi trên cạnh phải hiệu ứng bệnh lý tế bào được gây ra bởi sự truyền của vector tái tổ hợp rFAdV9-HN trong các tế bào CeLi với nồng độ virus là $1,3 \times 10^6$ UFP có thể được

quan sát. Ở trên chỉ ra là vectơ tái tổ hợp này là ổn định trong môi trường nuôi cấy tế bào CeLi.

Ví dụ 4. Tạo ra vectơ FAdV-9 tái tổ hợp

Theo các vectơ adenovirut đã biết khác

Gen FAdV-9 kích thước 45 kb được nhân dòng trong plasmit pWE-15; gen này có hai khối lặp lại trong cùng được gọi TR-1 (nằm giữa các nucleotit 37,648 và 37,812) và TR-2 (nằm giữa các nucleotit 38,707 và 40,561, ví dụ, giữa 0,0023 và 0,0039 trong (60 và 100 mu) ở đầu 3', mà không cần thiết đối với sự tái tạo virut. Sau đó, gen này trong pWE-15 được tái tạo phân dòng trong plasmit pBg để bổ sung các vị trí PacI ở các đầu bộ gen mà là hữu dụng để tạo mạch thẳng ADN trong quá trình tạo ra virut trong môi trường nuôi cấy tế bào.

Để tạo ra trung gian, vùng TR-2 được khuếch đại bởi PCR và được tách dòng vào plasmit vi khuẩn pTRE-2 với duy nhất I-CeuI và các vị trí PI-SceI ở cả hai đầu. Sau đó, chèn catxet biểu hiện, chứa CMV-polilinker vào trực tiếp biểu hiện gen HN virut bệnh Newcastle, do đó thu được dòng lây nhiễm pFΔTR2-CMV HN.

Virut tái tổ hợp rFΔTR2-CMV HN thu được qua sự chuyển nạp của dòng truyền nhiễm trong môi trường nuôi cấy tế bào CeLi.

Trên Fig.5A có thể quan sát bản đồ giới hạn ADN của vectơ tái tổ hợp rFΔTR2-CMV HN; dải 3,473 kb thể hiện đoạn giới hạn mà gen khác loại được nhân dòng. Fig.5B thể hiện dải ADN được phân cắt bằng XhoI, có kích thước 3,473 bp, tương ứng với gen HN của virut bệnh Newcastle, với mà được chứng minh là vectơ tái tổ hợp rFΔTR2-CMV HN đã thực sự được chèn gen này. Tuy nhiên, trên Fig.5C có thể được quan sát mà dải 3,473 bp tương ứng với gen HN đã biến mất sau 2 lần cấy chuyển trong môi trường nuôi cấy tế bào CeLi, với nồng độ virut là $1,1 \times 10^4$ UFP, đã chứng minh rằng vectơ rFΔTR2-CMV HN mất gen ngoại sinh chèn với lần cấy chuyển trong môi trường nuôi cấy tế bào, nhờ đó dẫn đến sự không ổn định và không phù hợp cho sản xuất công nghiệp của vacxin tái tổ hợp.

Ví dụ 5. Phương pháp sản xuất vacxin hoạt động với virut tái tổ hợp FAdV-9 được chèn đoạn H5 của virut cúm gia cầm: rFAdV9-435

Các tế bào dòng CeLi được sinh trưởng ổn định trong hệ thống Roller. Để thực hiện, chuyển 32 lọ từ Ngân hàng tế bào làm việc (Working Cell Bank: BCT) được tan đông trong lọ T25. Tiến hành cấy chuyển 3 lần liên tiếp với tỷ lệ 1:3, mỗi lần 2-3 ngày để phục hồi đến tốc độ phát triển (TD=24 giờ). Khi tốc độ phát triển được phục hồi, các tế bào được nhân trong hộp T75 và T225 (tỷ lệ 1:3) đến khi hợp lưu 80 %, chúng được lây nhiễm với hạt giống sản xuất thu được theo ví dụ 2 với độ bội nhiễm (MOI) là 0,1DICC50 %/mL. Ở 5 ngày trước khi nhiễm, các lọ này được đông lạnh phần bên trong ở -70°C trong 24 giờ. Sau đó, chúng được tan đông, các thành phần chứa bên trong được phục hồi và được ly tâm ở 500g trong 20 phút. Sau đó các thành phần này được đóng gói theo thể tích sản xuất.

Phần thu hoạch được chỉnh liều bằng peroxidaza miễn dịch, và nó được điều chế bằng cách bổ sung chất lỏng thu hoạch được, thêm TPGA cbp làm chất ổn định, để đạt $10^{5,3}\text{DICC50 \%}/\text{liều}$. Vaccin thử nghiệm được giữ đông lạnh ở nhiệt độ từ -20°C đến -30°C đến khi sử dụng.

Ví dụ 6. Đánh giá vaccin hoạt động tái tổ hợp rFAdV9-435 in vitro được sử dụng cùng hoặc không cùng với vaccin kháng bệnh Marek

Nghiên cứu được thực hiện với mục đích xác định hiệu quả của vaccin hoạt động của sáng chế và chứng minh rằng nó không gây ảnh hưởng hoặc tác động khi được sử dụng cho chim kết hợp với vaccin kháng bệnh Marek. Vaccin được sử dụng trong trứng và dưới da.

Cuối cùng, 270 con gà con thương mại giống sáng Leghorn 1 ngày tuổi (DE) (CRL) được sử dụng, được chia thành 9 nhóm với mỗi nhóm 30 con gà con, theo như nội dung được thể hiện trong Bảng 2.

Vaccin hoạt động rFAdV9-435 được sử dụng trong trứng sau 8 ngày ủ (DI) qua khoang túi niệu (Ai) với tỷ lệ là $10^{6,1}\text{DICC50 \%}/0,2\text{ mL}$ một mình cho các nhóm 2 và 6, và được trộn và được sử dụng kết hợp với vaccin kháng chủng Marek HVT cho các nhóm 1 và 5. Mặt khác, các thử nghiệm được thực hiện bằng cách sử dụng vaccin một ngày sau khi sinh (DE), dưới da (SC) trên phần giữa và trên của cổ cho sự chủng ngừa với vaccin rFAdV9-435 ở tỷ lệ là $10^{6,1}\text{DICC50 \%}/0,2\text{ mL}$. Một mình vaccin được sử dụng cho các nhóm 4 và 8; và được trộn và được sử dụng kết hợp với vaccin kháng chủng Marek HVT cho các nhóm 3 và 7. Cuối cùng, ở 10 DE các nhóm 5 đến 8 được tái tiêm chủng SC với $10^{6,5}\text{DICC50 \%}/0.5\text{ mL}$ của vaccin rFAdV9-435.

Bảng 2. Điều trị các nhóm với vaccin rFAdV9-435.

Nhóm	Vaccin	Ngày sử dụng và đường dùng vaccin			Thử nghiệm với VIAAP-H5N2 ngày tuổi (DE)		
		18-DI	1-DE	10-DE	19 DE	31 DE	45 DE
G1	rFAdV9-435 + HVT	Ai			10	10	10
G2	rFAdV9-435	Ai			10	10	10
G3	rFAdV9-435 + HVT		SC		10	10	10
G4	rFAdV9-435		SC		10	10	10
G5	rFAdV9-435 + HVT + rFAdV9-435	Ai		SC	10	10	10
G6	rFAdV9-435 + rFAdV9-435	Ai		SC	10	10	10
G7	rFAdV9-435 + HVT + rFAdV9-435		SC	SC	10	10	10
G8	rFAdV9-435 + rFAdV9-435		SC	SC	10	10	10
G9	Đối chứng (không tiêm chủng)	----	-----	----	10	10	10

Các động vật thử nghiệm được nhốt trong lồng biệt lập, chúng được thử nghiệm ở 19, 31 và 45 DE được chia các nhóm vào trong ba nhóm phụ mỗi nhóm 10 con gà con, cho mỗi thử nghiệm.

Virut thử nghiệm là virut cúm gia cầm có khả năng gây bệnh cao, VIAAP-H5N2, chủng A/chicken/Querétaro, mà được điều chỉnh với PBS đến pH 7,2, để sử dụng $10^{7,5}$ DI₅₀ % trong 0,3 mL cho mỗi con gà, thể tích mà mỗi con gà được nhận sử dụng 0,06 ml (hai giọt) vào mỗi mắt và 0,09 ml (3 giọt) vào mỗi bên mũi.

Ví dụ 6A. Đánh giá tiềm năng

Tất cả các nhóm được quan sát hàng ngày trong 10 ngày sau khi thử nghiệm để đánh giá dữ liệu thử nghiệm; mỗi con gà được kiểm tra riêng và được ghi lại với trị số bằng số theo dữ liệu trong bảng 3.

Bảng 3. Sự đánh giá hàng ngày của dữ liệu lâm sàng sau thử nghiệm với VIAAP-H5N2.

Các biểu hiện lâm sàng	Nhẹ	Nặng
Viêm kết mạc	1	2
Viêm kết mạc + lông xù	3	4
Viêm kết mạc + lông xù + hôn mê	5	6
Chết	7	-

Trị số lớn nhất cho độ nghiêm trọng dữ liệu lâm sàng (MCDS) của mỗi nhóm thử nghiệm tương ứng với trung bình của tổng trị số riêng biệt. Tỷ lệ tử vong (M) được ước tính trong cơ sở tích lũy trong 10 ngày quan sát, điều chỉnh trị số lớn nhất của các tín hiệu lâm sàng ở 100%.

Tỷ lệ mắc bệnh lớn nhất của nhóm (MM) bằng tỷ lệ phần trăm tối đa của các con gà bị ốm trong một trong số 10 ngày quan sát. Chỉ số tỷ lệ mắc bệnh (IMb) được tính toán như sau:

$$\text{IMb} = \frac{(\text{SMCC}) (\text{MM})}{100}$$

Ví dụ:

$$\text{IMb} = \frac{(56\%) (80\%)}{100} \quad \text{IMb} = \underline{44,8\%}$$

Các kết quả của sự bảo vệ đối với tỷ lệ tử vong (PM) và IMb trên các con gà được thử nghiệm với VIAAP-H5N2 ở 19, 31 và 45 DE được thể hiện trong bảng 4.

Bảng 4. Hiệu quả trên gà con CRL được tiêm chủng với rFAdV9-435 và được thử nghiệm với VIAAP-H5N2.

Nhóm	PM (%)			IMb (%)		
	19 DE	31 DE	45 DE	19 DE	31 DE	45 DE
G1	90	100	100	16,8	12,7	8,2
G2	90	100	100	26,7	6,5	7,1
G3	100	100	100	3,9	1,5	1,0
G4	100	100	100	1,2	1,2	0,9
G5	100	100	100	9,1	9,7	7,6
G6	100	100	100	10,2	8,8	5,0
G7	100	100	100	0,1	1,2	0,6
G8	100	100	100	0,5	0,6	0,1
G9	0	0	0	100	100	100

Như số liệu trên Bảng 4, hiệu quả vacxin rFAdV9-435 của sáng chế cho việc sử dụng của nó trong kiểm soát dịch cúm gia cầm H5N2 được xác nhận, và đề xuất là có thể được sử dụng để kiểm soát các phân nhóm cúm gia cầm khác.

Tương tự, các kết quả này xác nhận là hỗn hợp và việc sử dụng của vacxin kháng bệnh Marek không cản trở với vacxin hoạt động rFAdV9-435 khi được sử dụng kết hợp.

Ví dụ 6B. Đánh giá khả năng miễn dịch

Kết quả về các kiểm tra ức chế ngưng kết hồng cầu (IH) đã cho thấy các mức kháng thể đối với kháng nguyên (Ag) của VIA-435, của cả hai nhóm được tiêm chủng và đối chứng đã thể hiện các mức rất cao của các kháng thể mẹ, của $2^{9,0}$ ở $2^{9,3}$ trong huyết thanh chim thu được ở 1 DE (Fig.6), và từ $2^{8,6}$ đến $2^{8,8}$, cho huyết thanh thu được ở 10 DE (Fig.7).

Trong trường hợp của huyết thanh thu được ở 19 DE từ tất cả các nhóm (cả nhóm đối chứng và nhóm được tiêm chủng, bao gồm nhóm được chủng ngừa trong trứng hoặc ở DE với việc tái tiêm chủng của rFAdV9-435 ở 10 DE, các mức kháng thể được phát hiện nằm trong phạm vi từ $2^{3,6}$ đến $2^{4,6}$ (Fig.8 và 9).

Các kết quả ở trên thể hiện rằng các mức kháng thể khi được phát hiện tương ứng với các kháng thể mẹ mà không được gây ra bởi việc sử dụng vacxin rFAdV9-435. Tuy nhiên, như vừa được đề cập ở trên, PM được cấp cho thử nghiệm sớm ở 19 DE cho các nhóm khác nhau là từ 90 % và 100 %, mà chỉ ra rằng hiệu quả của vacxin của sáng chế không bị ảnh hưởng bởi các kháng thể mẹ đối với VIA-435. Ngoài ra, đề nghị là có thể kích thích đáp ứng miễn dịch cụ thể kiểu tế bào, tạo ra sự bảo vệ trước khi thử nghiệm, mà phù hợp tài liệu khoa học chỉ ra rằng miễn dịch tế bào là một trong số các phần quan trọng cho việc kiểm soát bệnh do virus.

Hơn nữa, như có thể thấy trên Fig.10 cho huyết thanh thu được ở 31 DE, các kết quả chỉ ra rằng các nhóm được chủng ngừa trong trứng không có đáp ứng kháng thể có thể phát hiện cho kiểm tra IH, trong khi cho các nhóm được chủng ngừa ở các mức kháng thể DE do vacxin rFAdV9-435 được phát hiện với độ chuẩn là $2^{6,3}$ và $2^{5,8}$ cho các nhóm 5 và 6, trái ngược với nhóm đối chứng không tiêm chủng mà dẫn đến trung bình của $2^{2,1}$.

Như được thể hiện trên Fig.11, trong trường hợp của các nhóm được chủng ngừa trong trứng với việc tái tiêm chủng ở 10 DE, các mức độ vừa phải của các kháng thể được gây ra bởi vacxin rFAdV9-435 được phát hiện, với độ chuẩn là $2^{4,4}$ và $2^{4,0}$ cho

các nhóm 5 và 6, tương ứng. Một cách tương đối, nhóm đối chứng không tiêm chủng dẫn đến độ chuẩn kháng thể IH trung bình là $10^{2.1}$, mà về kỹ thuật được xem là các độ chuẩn tiêu cực. Trong trường hợp các nhóm được chủng ngừa ở DE, với việc tái tiêm chủng ở 10 DE, kết quả là $2^{6.9}$ và $2^{6.8}$ cho các nhóm 7 và 8 tương ứng, đề xuất là đáp ứng miễn dịch tiền sử đã có.

Trong trường hợp của huyết thanh thu được ở 38 D, các kết quả trên Fig.12 chỉ ra, cho các nhóm được chủng ngừa trong trứng, mà vacxin rFAdV9-435 dùng cho lần đầu cho phép phát hiện các nhóm kháng thể đã nêu đối với VIA-435 Ag; cụ thể hơn, cho nhóm 1 của $2^{4.4}$ và cho nhóm 2 của $2^{4.1}$. Mặt khác, cho các nhóm được chủng ngừa ở DE, các mức độ kháng thể dẫn đến độ chuẩn là $2^{8.8}$ và $2^{8.4}$ cho các nhóm 3 và 4, tương ứng, trái ngược với nhóm đối chứng không tiêm chủng mà dẫn đến trung bình là $2^{1.2}$.

Nhờ đó đề cập đến các nhóm được chủng ngừa trong trứng với việc tái tiêm chủng ở 10 DE (Fig.13), các mức độ của các kháng thể được gây ra được phát hiện cho vacxin rFAdV9-435, với độ chuẩn là $2^{5.5}$ và $2^{6.1}$ cho các nhóm 3 và 4, tương ứng, tương quan với nhóm đối chứng, không tiêm chủng mà có kết quả với trung bình là $10^{1.2}$. Trong trường hợp các nhóm được chủng ngừa ở DE, với việc tái tiêm chủng ở 10 DE, kết quả là $2^{8.9}$ và $2^{8.4}$ for các nhóm 7 và 8, tương ứng, mà chỉ ra rằng ngay cả ở 38 mức kháng thể DE tiếp tục tăng cho tất cả các nhóm.

Cuối cùng, cho huyết thanh thu được ở 45 DO, các kết quả chỉ ra, có thể được hiểu là trên Fig.14, cho các nhóm được chủng ngừa trong trứng, mà vacxin rFAdV9-435 cho phép phát hiện các kháng thể đối với VIA-435 Ag, cho nhóm 1 của $2^{4.3}$ và cho nhóm 2 của $2^{4.6}$, trong khi cho các nhóm 3 và 4 các mức độ kháng thể dẫn đến độ chuẩn là $2^{8.4}$ và $2^{8.1}$, tương ứng, trái ngược với nhóm đối chứng không tiêm chủng mà dẫn đến trung bình của $2^{0.8}$.

Trong các nhóm được chủng ngừa trong trứng với việc tái tiêm chủng ở 10 DE (Fig.15), các mức kháng thể được phát hiện được gây ra bởi vacxin rFAdV9-435, với chuẩn độ là $2^{6.6}$ và $2^{6.8}$, cho nhóm 5 và nhóm 6, tương ứng, tương quan với nhóm đối chứng, không tiêm chủng mà được kết quả với trung bình là $10^{0.8}$. Đối với trường hợp các nhóm được chủng ngừa ở DE, với việc tái tiêm chủng ở 10 DE, kết quả là $2^{9.6}$ và $2^{10.0}$ cho các nhóm 7 và 8, tương ứng; điều này chỉ ra là ngay cả ở 45 mức kháng thể

DE được duy trì ở mức giống nhau cho các nhóm 5 và 6, trong khi cho các nhóm 7 và 8 mức kháng thể này tiếp tục tăng.

Như có thể được quan sát từ ở trên, các kết quả này chỉ ra là vacxin rFAdV9-435, được tạo ra theo sáng chế, có khả năng gây ra các mức độ kháng thể có thể phát hiện cho kiểm tra IH, cho các nhóm được tiêm chủng trong trứng với sự phát hiện bắt đầu từ 31 DE cho các nhóm được chủng ngừa trong trứng và việc tái tiêm chủng ở 10 DE. Trong khi đối với các nhóm được tiêm chủng ở DE, không có tái tiêm chủng, sự phát hiện cũng được đưa ra bắt đầu từ 31 DE, nhưng với độ chuẩn cao hơn độ chuẩn cho nhóm được tiêm chủng trong trứng và được tái tiêm chủng ở 10 DE; cho nhóm được tiêm chủng ở DE và được tái tiêm chủng ở 10 DE, các mức kháng thể được phát hiện không bộc lộ ở thời điểm này đáp ứng tiền sử quan trọng.

Các mức kháng thể cho nhóm 1 được phát hiện dùng cho lần đầu ở 38 DE (tiêm chủng trong trứng), và cho nhóm 3 (tiêm chủng ở DE) tăng lên trong mức kháng thể được phát hiện, mà chỉ ra rằng vacxin rFAdV9-435 tiếp tục tăng đáp ứng dịch thể ngay cả ở 38 DE. Tương tự, ở 38 DE, cho nhóm được tiêm chủng trong trứng với việc tái tiêm chủng ở 10 DE, tăng mức kháng thể cao hơn mức kháng thể của nhóm mà chỉ nhận trong trứng liều được ghi chú; trong khi cho nhóm được tiêm chủng ở DE, với việc tái tiêm chủng ở 10 DE, các kháng thể tăng lên ở 38 DE không đáng kể so với nhóm mà chỉ nhận duy nhất một liều ở DE.

Ở 45 DE, cả hai cho nhóm với một liều của vacxin trong trứng và nhóm với một liều của vacxin ở DE, các mức độ kháng thể được duy trì gần như giống với 38 DE, mà chỉ ra rằng cho các nhóm này mức tối đa của các kháng thể lưu thông có thể phát hiện bởi kiểm tra IH đạt được ở 38 DE. Trong khi cho các nhóm được tiêm chủng trong trứng và một ngày sau khi sinh, với việc tái tiêm chủng ở 10 DE, quan trọng tăng lên trong các mức độ kháng thể vẫn được phát hiện.

Ví dụ 7. Đánh giá vacxin hoạt động tái tổ hợp rFAdV9-435 in vitro được sử dụng riêng lẻ hoặc kết hợp với vacxin kháng bệnh Marek, với việc tiếp xúc nguồn bệnh ở 93 DE

Nghiên cứu thứ hai được thực hiện để xác định hiệu quả của vacxin hoạt động theo sáng chế.

Vacxin được sử dụng qua SC cho 180 ở gà con CRL được chia thành 6 các nhóm với mỗi nhóm 30 con gà con, theo kết quả được thể hiện trong bảng 5; HVT vacxin

kháng bệnh Marek được sử dụng kết hợp với vaccin theo sáng chế là vaccin thương mại với độ chuẩn là 4200 UFP/mL và vaccin này được sử dụng theo các chỉ dẫn của nhà cung cấp.

Cho mục đích của các ví dụ sau, được xem là 1 liều cho gà (DP) tương ứng với số mũ liều lượng trong thang logarit được sử dụng cho mỗi con gà, được biểu diễn trong DICC50 %; ví dụ, nếu một liều là $10^{7,1}$ DICC50% được sử dụng, điều này tương đương với 7,1 DP.

Các con vật thử nghiệm được nhốt trong các chuồng biệt lập, mà chúng được thử nghiệm ở 19, 31 và 93 DE qua đường mắt và qua mũi với 0,3 mL của VIAAP-H5N2 (chủng A/chicken/Querétaro/14588-19/95), sử dụng $10^{8,0}$ DICC50 % trong 0,3 mL cho mỗi con gà.

Bảng 5. Điều trị các nhóm với vaccin rFAdV9-435.

Nhóm	Vaccin	Các ngày sử dụng, liều lượng và đường dùng vaccin		Các thử nghiệm với VIAAP-H5N2 ở DE khác		
		1 DE	10 DE	19 DE	31 DE	93 DE
G1	rFAdV9-435 +HVT	SC (7,1 DP/0,2 mL)		10	10	10
G2	rFAdV9-435	SC (7,1 DP/0,2 mL)		10	10	10
G3	rFAD9-435	SC (7,1 DP/0,2 mL)	SC (7,5 DP/0,5 mL)	10	10	10
G4	rFAdV9-435	SC (6,1 DP/0,2 mL)		10	10	10
G5	rFAdV9-435	SC (6,1 DP/0,2 mL)	IM (6,5 DP/0,5 mL)	10	10	10
G6	Đối chứng không tiêm chủng	-	-	10	10	10

Ví dụ 7A. Đánh giá tiềm năng

Tất cả các nhóm được quan sát hàng ngày trong 10 ngày sau mỗi thử nghiệm. Để thực hiện đánh giá lâm sàng, mỗi con gà được kiểm tra riêng và mỗi kết quả đánh giá theo số liệu thay đổi lâm sàng được quan sát, theo bảng 3.

M và IMb được tính toán theo cách nêu trong ví dụ 6A. Các kết quả được thể hiện trên các Fig.16 đến 18.

Hiệu quả trước khi thử nghiệm sớm ở 19 DE, đã chỉ ra rằng vaccin được tạo vector rFAdV9-435 được sử dụng qua SC ở tỷ lệ là 0,2 mL với 7,1 DP khi kết hợp với vaccin HVT trong vaccin Marek pha loãng hoặc riêng biệt, đã tạo ra sự bảo vệ với tỷ lệ tử vong (PM) ở 70 % với IMb thấp, là 18,4 % và 19,3% tương ứng. Kết quả này xác nhận là khả năng miễn dịch của vaccin rFAdV9-435 không bị ảnh hưởng bởi vaccin HVT kháng bệnh Marek.

Kết quả đánh giá về hiệu quả trước khi thử nghiệm sớm ở 19 DE cho thấy rằng vaccin được vector rFAdV9-435 được sử dụng cùng với vaccin Marek HVT hoặc riêng biệt, tạo ra PM từ 70 % đến 90 % và IMb thấp (xem Fig.16). Kết quả này xác nhận là khả năng miễn dịch của vaccin rFAdV9-435 không bị ảnh hưởng bởi vaccin HVT kháng bệnh Marek.

Tương tự, các kết quả này chỉ ra là chỉ cần sử dụng một lần 6,1 DP vaccin rFAdV9-435 một ngày sau khi nở, cho phép các con chim có sự bảo vệ tương tự với khi chỉ sử dụng là 7,1 DP được sử dụng hoặc mà khi liều thứ hai được sử dụng ở 10 DE.

Trong trường hợp của thử nghiệm ở 31 DE, các kết quả được quan sát trên Fig.17 chỉ ra là vaccin được tạo vector rFAdV9-435 được sử dụng qua SC, một mình hoặc kết hợp với vaccin HVT kháng bệnh Marek, đã tạo ra PM của 100 % với gần như vô hiệu IMb trong tất cả các nhóm được tiêm chủng, mà cũng được xác nhận với đó là khả năng miễn dịch của vaccin rFAdV9-435 không bị ảnh hưởng bởi vaccin HVT kháng bệnh Marek.

Tương tự, được quan sát là sử dụng một liều duy nhất là 6,1 DP của vaccin rFAdV9-435 là đủ để tạo ra sự bảo vệ ưu việt đến thử nghiệm ở 31 DE.

Theo cách tương tự, trên Fig.18 các hiệu quả trước khi thử nghiệm muộn ở 93 DE chỉ ra là vaccin được tạo vector của sáng chế, được sử dụng riêng lẻ hoặc kết hợp với vaccin HVT kháng bệnh Marek, đã tạo ra PM là 100 % và IMb gần như vô hiệu. Với điều đó, đã thể hiện là vaccin rFAdV9-435 giữ khả năng miễn dịch giống nhau ít nhất lên đến 93 DE, ngay cả khi sử dụng một liều là 6,1 DP được sử dụng một ngày sau khi sinh.

Ví dụ 7B. Đánh giá khả năng miễn dịch

Các mẫu huyết thanh thu được từ tất cả các nhóm ở 19, 31 và 93 DE, được giữ ở -20 °C đến khi sử dụng. Tiến hành pha loãng gấp đôi theo loạt huyết thanh và cho tiếp xúc với 4 đơn vị ngưng kết hồng cầu (UHA) của VIABP-435 trong kiểm tra IH.

Các kết quả được tổng hợp trên các Fig.19 đến 21, mà tương tự có thể được quan sát với các kết quả về PM và IMb, do các mức độ kháng thể được đo trong các nhóm được chủng ngừa cho các thử nghiệm được thực hiện ở 19, 31 và 93 DE là tương tự cho tất cả vacxin được kiểm tra.

Ví dụ 8. Hiệu quả của vacxin rFAdV9-435 hoạt động tái tổ hợp được sử dụng qua IM, so với việc sử dụng qua SC, và sự phát hiện của virut HVT của bệnh Marek trên nang lông

330 con gà con LPE được sử dụng, được chia thành 22 nhóm với mỗi nhóm 15 con, theo như các nhóm thể hiện trên bảng 6. Vacxin được sử dụng ở 1 DE, cũng như ở các giờ khác nhau sau khi sinh (HE) và DE (ngoại trừ nhóm đối chứng không tiêm chủng), một mình hoặc kết hợp với vacxin thương mại HVT kháng bệnh Marek, mà có độ chuẩn là 4200 UFP/mL và nó được sử dụng theo các chỉ dẫn phòng thử nghiệm thương mại.

Các con chim thử nghiệm được nhốt trong các chuồng riêng biệt, mà chúng được thử nghiệm ở 31 DE qua đường mắt và qua mũi với 0,3 mL của VIAAP-H5N2 (chủng A/chicken/Querétaro/14588-19/95), với liều lượng sử dụng là $10^{8,0}$ D₅₀ % cho mỗi con gà.

Bảng 6. Điều trị các nhóm với vacxin rFAdV9-435 và/hoặc HVT.

Nhóm	Vacxin, các đường dùng và liều lượng được sử dụng ở HE và DE khác nhau					Các thử nghiệm ở 31 DE
	1 DE	2 HE	4 DE	10 DE	14 DE	
G1	SC rFAdV9-435 (7,1 DP) +HVT (được trộn)					10
G2	SC rFAdV9-435 (7,1 DP) + SC HVT					10
G3	SC rFAdV9-435 (6,1					10

	DP)+HVT (được trộn)					
G4	SC rFAdV9-435 (6,1 DP) + SC HVT					10
G5	SC HVT	SC rFAdV9-435 (7,1 DP)				10
G6	SC HVT		SC rFAdV9-435 (7,1 DP)			10
G7	SC HVT			SC rFAdV9-435 (7,1 DP)		10
G8	SC HVT			SC rFAdV9-435 (6,1 DP)		10
G9	SC HVT				SC rFAdV9-435 (7,1 DP)	10
G10	SC HVT					10
G11	SC rFAdV9-435 (7,1 DP)					10
G12	SC rFAdV9-435 (6,1)					10
G13	IM rFAdV9-435 (7,1 DP) + SC HVT					10
G14	IM rFAdV9-435 (6,1) + SC HVT					10
G15	SC HVT	IM rFAdV9-435 (7,1 DP)				10
G16	SC HVT		IM rFAdV9-435 (7,1 DP)			10
G17	SC HVT			IM rFAdV9-435 (7,1 DP)		10
G18	SC HVT			IM rFAdV9-435 (6,1 DP)		10

G19	SC HVT				IM rFAdV9-435 (7,1 DP)	10
G20	IM rFAdV9-435 (7,1)					10
G21	IM rFAdV9-435 (6,1)					10
G22	Đối chứng không tiêm chủng					10

Ví dụ 8A. Sự phát hiện chủng virus HVT Marek

15 ngày sau khi tiêm chủng (PV), ba nang lông từ năm con gà của mỗi nhóm được tiêm chủng và của nhóm đối chứng không tiêm chủng thu được và được sử dụng để chuẩn bị khối lượng được ngâm trong tỷ lệ 1:5 với PBS ở pH 7,2 và các kiểm tra PCR và PCRtr được thực hiện trên các mẫu. Các kiểm tra các kết quả được thể hiện trong bảng 7.

Bảng 7. Các kết quả thu được từ các nhóm điều trị với vacxin rFAdV9-435 và/hoặc HVT

Nhóm	PCR/HVT 15 ngày PV	PCRtr/HVT 15 ngày PV	VIAAP thử nghiệm sự bảo vệ ở 31 DE	IMb
G1	Pos	1,6 x 10 ⁶	100%	1,2
G2	Pos	6,4 x 10 ⁶	100 %	2,3
G3	Pos	3,1 x 10 ⁶	100 %	0,8
G4	Pos	5,5 x 10 ⁶	100 %	1,2
G5	Pos	7,1 x 10 ⁶	100 %	0,7
G6	Pos	7,8 x 10 ⁶	100 %	2,1
G7	Pos	5,9 x 10 ⁶	100 %	0,0
G8	Pos	5,0 x 10 ⁶	100 %	0,1
G9	Pos	8,3 x 10 ⁶	100 %	2,3
G10	Pos	9,7 x 10 ⁶	0 %	100 %
G11	Neg	Neg	100 %	1.0
G12	Neg	Neg	100 %	2.3
G13	Pos	2,4 x 10 ⁶	100 %	1,2

G14	Pos	$3,4 \times 10^6$	100 %	2,6
G15	Pos	$3,2 \times 10^6$	100 %	1,3
G16	Pos	$5,7 \times 10^6$	100 %	2,4.
G17	Pos	$1,3 \times 10^6$	100 %	2,0
G18	Pos	$2,6 \times 10^6$	100 %	1,7
G19	Pos	$4,9 \times 10^6$	100 %	2,0
G20	Neg	Neg	100 %	1.8
G21	Neg	Neg	100 %	2,6
G22	Neg	Neg	0 %	100 %

Như có thể được quan sát, tất cả các nhóm được tiêm chủng với HVT chủng vaccin kháng bệnh Marek riêng lẻ hoặc kết hợp với rFAdV9-435 với các lịch tiêm chủng khác nhau, đã tạo kết quả tích cực đến kiểm tra PCR cụ thể cho virus HVT sự phát hiện trên nang lông. Ngược lại, các nhóm được chủng ngừa chỉ với rFAdV9-435 và đối chứng không chủng ngừa đã tạo tiêu cực cho kiểm tra PCR/HVT giống nhau.

Đối với các kết quả PCRtr, kết quả cho nhóm được tiêm chủng chỉ với vaccin HVT là $9,7 \times 10^{6,0}$, trong khi đối với tất cả các nhóm được tiêm chủng với các lịch khác nhau với việc sử dụng HVT và rFAdV9-435, các kết quả đã thay đổi từ $1,6 \times 10^{6,0}$ lên đến $8,3 \times 10^{6,0}$. Trong trường hợp của các nhóm được tiêm chủng riêng với rFAdV9-435 và nhóm đối chứng không tiêm chủng, các kết quả là tiêu cực.

Theo đường dùng vaccin rFAdV9-435 (SC hoặc IM) và virus HVT gây ra bệnh Marek (SC), các kết quả đối với cả hai PCR và PCRtr chỉ ra là virus vaccin HVT có thể tái tạo phù hợp trong các cơ quan khác nhau và cuối cùng được chứa trong các nang lông, nhờ đó các sự chênh lệch (không đáng kể) trong cơ sở 10 logarit được phát hiện trong kiểm tra PCRtr không biểu thị là vaccin rFAdV9-435 cản trở sự tái tạo virus HVT, hoặc lượng virus của nó hoặc sự lưu thông trong sinh vật đến mức độ mà đáp ứng miễn dịch vaccin HVT phù hợp tránh được.

Ví dụ 8B. Đánh giá tiềm năng

Tất cả các nhóm được quan sát hàng ngày trong 10 ngày sau khi thử nghiệm (PD). Để thực hiện đánh giá lâm sàng, mỗi con gà được kiểm định riêng và nó được cho trị số bằng số theo các thay đổi lâm sàng được quan sát, theo bảng 3.

PM và IMb được tính toán theo những gì được chỉ ra trong ví dụ 6A. Các kết quả cũng được thể hiện trong bảng 7.

Các kết quả công hiệu chỉ ra là vaccin rFAdV9-435 được sử dụng qua SC hoặc IM, có hoặc không có vaccin HVT và với các lịch tiêm chủng khác nhau, có thể tạo ra sự ưu việt 100 % PM và IMb gần như vô hiệu cho tất cả các trường hợp, trái ngược với đối chứng không chủng ngừa mà PM là 0 % với IMb tối đa là 100 %.

Trên cơ sở các kết quả từ các ví dụ 8A và 8B, có thể nói là vaccin căng HVT kháng bệnh Marek và vaccin rFAdV9-435 kháng IAAP-H5N2, có thể được sử dụng cùng nhau mà không ảnh hưởng đáp ứng miễn dịch của cả hai vaccin.

Ví dụ 9. Hiệu quả của vaccin rFAdV9-435 hoạt động tái tổ hợp được sử dụng qua IM, so với sử dụng qua SC

5 nhóm mỗi nhóm gồm 10 LPE con gà được tạo ra, 4 trong số đó được tiêm chủng và 1 được để lại làm đối chứng không chủng ngừa, theo bảng 8.

Các con gà được nhốt trong lồng biệt lập và được thử nghiệm ở 31 DE qua đường mắt và qua mũi với 0,3 mL của VIAAP-H5N2 (chủng A/gà/Querétaro/14588-19/95), sử dụng 7,5 DP cho mỗi con gà.

Bảng 8 Các nhóm điều trị với vaccin rFAdV9-435.

Nhóm	Vaccin	Ngày sử dụng, liều lượng và đường dùng vaccin		Thử nghiệm với VIAAP-H5N2
		1 DE	10 DE	31 DE
G1	rFAdV9-435	IM (6,1 DP/0,2 mL)		10
G2	rFAdV9-435		IM (6,5 DP/0,5 mL)	10
G3	rFAdV9-435	SC (6,1 DP/0,2 mL)		10
G4	rFAdV9-435		SC (6,5 DP/0,5 mL)	10
G5	đối chứng không tiêm chủng	----	-----	10

Ví dụ 9A. Đánh giá tiềm năng

Tất cả các nhóm được quan sát hàng ngày trong 10 ngày PD. Để thực hiện đánh giá lâm sàng, mỗi con gà được đánh giá riêng và kết quả số liệu đối với thay đổi lâm sàng được quan sát, được thể hiện trên bảng 3.

PM và IMb được tính theo như phương pháp nêu trong ví dụ 6A. Các kết quả được thể hiện trên Fig.22.

Các kết quả công hiệu trước khi thử nghiệm ở 31 DE với VIAAP-H5N2, chỉ ra là vacxin được tạo vector rFAdV9-435 được sử dụng qua IM một ngày sau khi sinh ở G1 và G2 được cấp PM của 100 % với IMb của 1,2 và 2,3 tương ứng. Các kết quả từ G3 và G4, được chủng ngừa qua SC là 100 % PM và IMb của 1,3 và 2,6, mà xác nhận khả năng sử dụng của đường SC, cũng như đường IM, để sử dụng vacxin rFAdV9-435.

Ví dụ 9B. Đánh giá khả năng miễn dịch

Các mẫu huyết thanh thu được từ tất cả các nhóm ở 31 DE, mà được giữ ở -20 °C đến khi sử dụng. Sự pha loãng gấp đôi theo tuần tự của huyết thanh được đối mặt với với 4 đơn vị ngưng kết hồng cầu (UHA) của VIABP-435 trong kiểm tra IH.

Kiểm tra IHs các kết quả được thể hiện trên Fig.23. Huyết thanh được thực hiện ở 31 DE phản ánh trung bình là $2^{4,6}$, $2^{5,1}$, $2^{4,5}$ và $2^{4,8}$ cho G1, G2, G3 và G4 tương ứng, chỉ ra mối tương quan cao với sự bảo vệ của các con chim trước khi thử nghiệm.

Các kết quả này xác nhận là vacxin của sáng chế có hiệu quả bằng nhau trong việc gây ra các kháng thể lưu thông khi được sử dụng qua IM và khi được sử dụng qua SC.

Ví dụ 10. Đánh giá vacxin hoạt động tái tổ hợp rFAdV9-gB in vitro kháng virus gây bệnh viêm thanh khí quản lây nhiễm trên gia cầm

Theo cách tương tự với phương pháp được mô tả trong ví dụ 5, vacxin tái tổ hợp trong vector adenovirus gia cầm với phần chèn glycoprotein B của virus gây bệnh viêm thanh khí quản lây nhiễm gia cầm (LTI), được gọi là vacxin rFAdV9-gB được tạo ra và hiệu quả của nó được kiểm tra.

90 LPE con gà, được chia thành 9 nhóm mỗi nhóm gồm 10 con, 1 nhóm đối chứng không tiêm chủng, 1 đối chứng không chủng ngừa và một nhóm không được thử nghiệm và 7 các nhóm được chủng ngừa với vacxin sau đây được sử dụng: a) vacxin rFAdV9-gB; và b) vacxin thương mại với virus hoạt động được biến đổi phôi gà (CEP-LTI). Các nhóm được chủng ngừa theo những gì được thể hiện trong bảng 9.

Các con vật thử nghiệm được nhốt trong các lồng riêng biệt và được thử nghiệm ở 31 DE với virus có lượng virus cao LTI (vvLTI), USA 63,140 chủng, mà được sử

dụng cho mỗi con gà ở tỷ lệ liều lượng là 3,9 DP trong 0,3 mL, sử dụng hai giọt trên mỗi mắt và 3 giọt trên mỗi bên mũi.

Bảng 9. Các nhóm điều trị với vaccin FAdV9-gB

Nhóm	Liều lượng và sử dụng vaccin kháng LTI, qua SC và mắt (O) ở 1, 4 và 10 DE			thử nghiệm với vvLTI
	1 DE	4 DE	10 DE	31 DE
G1	SC rFAdV9-gB (7,1 DP/0,2 mL)			10
G2			SC rFAdV9-gB (7,5 DP/0,5 mL)	10
G3	SC rFAdV9-gB (7,1 DP/0,2 mL)		SC rFAdV9-gB (7,5 DP/0,5 mL)	10
G4	SC rFAdV9-gB (6,1 DP/0,2 mL)			10
G5			SC rFAdV9-gB (6,5 DP/0,5 mL)	10
G6	SC rFAdV9-gB (6,1 DP/0,2 mL)		SC rFAdV9-gB (6,5 DP/0,5 mL)	10
G7			O CEP-LTI (3,1 DP/0,03 MI)	10
G8	Đối chứng không được tiêm chủng			10
G9	Không được tiêm chủng cũng không được thử nghiệm			10

Ví dụ 10A. Đánh giá tiềm năng

Tất cả các nhóm được quan sát hàng ngày trong 9 ngày PD. Để thực hiện đánh giá lâm sàng, mỗi con gà được kiểm định riêng và cho số liệu về các thay đổi lâm sàng được quan sát, theo bảng 3.

M và IMb được tính theo phương pháp nêu trong ví dụ 6A. Các kết quả được thể hiện trong bảng 10.

Các kết quả IMb được quan sát trong các nhóm khác nhau của con gà LPI được tiêm chủng đã chỉ ra rằng 9 ngày PD, với vvLTI, các biểu hiện lâm sàng thường thấp hơn cường độ vừa phải, thấp hơn biểu hiện được quan sát đối với G8, đối chứng không chủng ngừa.

Đối với G1, G2 và G3, được chủng ngừa với 7,1 và/hoặc 7,5 DP của rFAd9-gB vaccin qua SC, IMb là 6,2, 6,1 và 3,5 tương ứng, trong khi cho các nhóm G4, G5 và G6, được chủng ngừa với 10 lần liều lượng thấp hơn của vaccin rFAdV9-gB (6,1 và/hoặc 6,5 DP), tương tự IMb thu được, của 6,5, 6,3 và 5,2, tương ứng (Bảng 10). Các kết quả này chỉ ra rằng việc sử dụng 10 lần liều lượng thấp hơn của vaccin được tạo vectơ rFAdV9-gB không cho thấy khác biệt đáng kể để tạo ra các con chim được tiêm chủng đối với sự xuất hiện của các biểu hiện lâm sàng của LT trong được chủng ngừa các con chim. Mặt khác, chúng thể hiện rằng vaccin tái tổ hợp của sáng chế, với phần chèn gen gB của virus LTI, rFAdV9-gB, đã thể hiện kết quả để ngăn các tổn thương trên thanh quản và khí quản hơi kém hơn vaccin thương mại CEP-LTI.

Đối với M, không được quan sát trong cả nhóm.

Bảng 10. hiệu quả vaccin rFAdV-gB

Nhóm	IMb	Mức độ tổn thương chung của nhóm
G1	6,2	++
G2	6,1	++
G3	3,5	++
G4	6,5	++
G5	6,3	++
G6	5,2	++
G7	2,4	+
G8	37,0	+++++
G9	0	-

Ví dụ 10B. Đánh giá khả năng về phòng ngừa tổn thương vĩ mô

Chín ngày sau khi thử nghiệm các con chim từ tất cả các nhóm bị giết, các thanh quản và khí quản từ các con chim trong mỗi nhóm được kiểm tra để xác định liệu có tổn thương vĩ mô (sự có mặt của dịch rỉ huyết thanh và xuất huyết trên hạ niêm thanh quản và khí quản), so sánh mức độ thay đổi vĩ mô với không tiêm chủng nhưng được

thử nghiệm G8 mà số 5 (+++++) được cấp, và nhóm đối chứng không được tiêm chủng cũng không được thử nghiệm (được gọi là G9) mà số không (-) được cấp.

Các kết quả phòng ngừa tổn thương vĩ mô được quan sát trong các nhóm khác nhau của con gà LPE được tiêm chủng, cũng được thể hiện trong bảng 10, chỉ ra là tất cả các nhóm được chủng ngừa bằng vaccin rFAdV9-gB, (ngay cả đối với G4, G5 và G6, mà liều lượng thấp hơn 10 lần của vaccin này được sử dụng cho nó), đã thể hiện các chỉ số bảo vệ tổn thương vĩ mô tương tự, rất gần với sự bảo vệ được tạo ra bởi vaccin thương mại CEP-LTI.

Các kết quả này xác nhận là việc sử dụng liều lượng thấp hơn 10 lần của rFAdV9-gB không cho thấy khác biệt đáng kể trong việc giảm sự xuất hiện của tổn thương vĩ mô ở loài chim được tiêm chủng, và có thể thu được các kết quả gần với các kết quả thu được với vaccin thương mại được tạo ra với virus hoàn chỉnh và được lan truyền trong phôi gà, mà không gây ra các rủi ro vật chất của nó.

Theo mô tả ở trên, có thể thấy được là vaccin tái tổ hợp trong vector adenovirus gia cầm kiểu huyết thanh 9, đã được đưa ra để có vaccin tái tổ hợp ổn định, tạo ra hiệu quả ngay cả khi được sử dụng kết hợp với vaccin bệnh Marek, và mà hiệu quả không bị ảnh hưởng bởi sự có mặt của các kháng thể mẹ, và rõ ràng đối với những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật là các phương án của vaccin tái tổ hợp trong vector adenovirus gia cầm kiểu huyết thanh 9 và việc sử dụng của nó, theo mô tả ở trên và được minh họa trong các hình vẽ đi kèm, chỉ minh họa và không giới hạn sáng chế, do một số thay đổi khi xem xét chi tiết của nó không xa rời phạm vi của sáng chế. Ví dụ, đã chỉ ra bằng thực nghiệm là có thể đạt sự ổn định trong các lần cấy chuyển liên tiếp của môi trường nuôi cấy tế bào với các gen ngoại sinh khác nhau và có thể sử dụng các loại khác nhau của các chất dẫn thuốc có thể chấp nhận được cho sự điều chế vaccin.

Do đó, sáng chế không nên được coi là bị giới hạn ngoại trừ các yêu cầu trong tình trạng kỹ thuật và bởi phạm vi các yêu cầu bảo hộ kèm theo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Vacxin tái tổ hợp bao gồm vector adenovirut gia cầm kiểu huyết thanh 9 (FAdV-9) có ít nhất một chuỗi nucleotit ngoại sinh được chèn mã hóa ít nhất một kháng nguyên của bệnh được quan tâm và thay thế vùng không thiết yếu của bộ gen adenovirut, và chất mang được dụng, chất phụ trợ và/hoặc tá dược, trong đó vector FAdV-9 này là còn sống, và chuỗi nucleotit ngoại sinh được chèn vào giữa các nucleotit 491 và 2782, và trong đó vacxin tái tổ hợp này tạo ra tác dụng bảo vệ, bằng một liều, đến ít nhất 90 ngày sau khi sử dụng.
2. Vacxin tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó vector FAdV-9 bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1.
3. Vacxin tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó chuỗi nucleotit ngoại sinh mã hóa ít nhất một kháng nguyên của bệnh được quan tâm, được chọn từ bệnh cúm gia cầm, bệnh viêm thanh khí quản lây nhiễm ở loài chim, bệnh Newcastle, túi hoạt dịch nhiễm Fabricius, viêm phế quản lây nhiễm, bệnh được gây ra bởi metapneumovirut (MPNV), bệnh Marek, bệnh thiếu máu lây nhiễm ở loài chim và gen bất kỳ khác có kích thước cho phép chèn được vào trong vector FAdV-9.
4. Vacxin tái tổ hợp theo điểm 3, trong đó chuỗi nucleotit ngoại sinh mã hóa kháng nguyên của nhóm bao gồm ngưng kết tố hồng cầu (HA) của dịch cúm gia cầm virut; glycoprotein B (gB) và glycoprotein D (gD) virut viêm thanh khí quản lây nhiễm ở loài chim (LTI); các protein HN và F của virut gây bệnh Newcastle; protein VP2 lây nhiễm virut của túi hoạt dịch của Fabricius; protein S1 và S2 của viêm phế quản lây nhiễm virut; protein F của metapneumovirut (MPNV); và protein VP1, VP2 và VP3 của bệnh thiếu máu lây nhiễm ở loài chim.
5. Vacxin tái tổ hợp theo điểm 4, trong đó HA của virut cúm gia cầm được chọn từ ít nhất một trong số các phân nhóm H1, H2, H3, H5, H6, H7 hoặc H9 của protein đã nêu.
6. Vacxin tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó chuỗi nucleotit ngoại sinh bao gồm gen mã hóa ít nhất một kháng nguyên của adenovirut gia cầm khác với FAdV-9 được sử dụng làm vector virut.
7. Vacxin tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó nồng độ virut ít nhất là $10^{5,0}$ DICC50 % mỗi liều.

8. Vacxin tái tổ hợp theo điểm 7, trong đó nồng độ virus yêu cầu để đạt đáp ứng kháng nguyên ít nhất là $10^{6,0}$ DICC50 % mỗi liều.
9. Vacxin tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó chất mang được dùng là các dung dịch chứa nước, tốt hơn là được chọn từ nhóm các dung dịch chứa nước bao gồm chất ổn định TPGA trehaloza, phosphat, glutamat, albumin; các dung dịch chứa nước bao gồm chất ổn định pepton; và các dung dịch chứa nước bao gồm sữa tách kem.
10. Vacxin tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó vacxin này còn sống hoặc hoạt động được bào chế thích hợp để sử dụng trong cơ, trong mũi, dưới da, bằng cách phun, khí dung, qua đường miệng hoặc qua đường uống, hoặc trong trứng.
11. Vacxin tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó bao gồm vacxin toàn phần virus bệnh Marek.
12. Vacxin tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó bao gồm vector FAdV-9 có ít nhất hai chuỗi nucleotit ngoại sinh được chèn mã hóa ít nhất hai kháng nguyên hoặc từ bệnh được quan tâm giống nhau hoặc từ các bệnh được quan tâm khác nhau, và thay thế vùng không thiết yếu của bộ gen của adenovirus, được chèn vào giữa các nucleotit 491 và 2782.
13. Vacxin tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó bao gồm ít nhất vacxin thứ hai trên cơ sở vector FAdV-9 có ít nhất một chuỗi nucleotit ngoại sinh được chèn mã hóa ít nhất một kháng nguyên khác với kháng nguyên của vacxin thứ nhất, hoặc từ bệnh được quan tâm giống nhau hoặc từ các bệnh được quan tâm khác nhau, và thay thế vùng không thiết yếu của bộ gen của adenovirus, được chèn vào giữa các nucleotit 491 và 2782.
14. Giống gốc của virus tái tổ hợp adenovirus gia cầm kiểu huyết thanh 9 (FAdV-9) có chuỗi nucleotit ngoại sinh được chèn mã hóa kháng nguyên bệnh được quan tâm và thay thế vùng không thiết yếu của bộ gen adenovirus, được chèn vào giữa các nucleotit 491 và 2782, trong đó giống gốc này thu được sau từ 6 đến 11 lần cấy chuyển trong môi trường nuôi cấy tế bào.

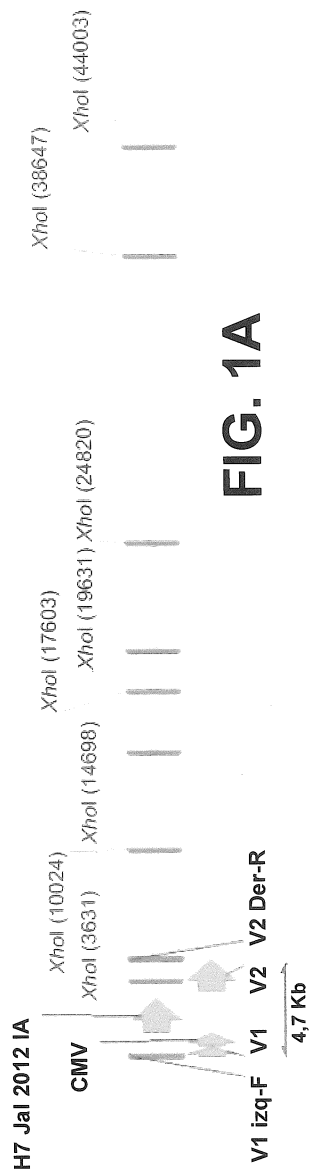


FIG. 1A

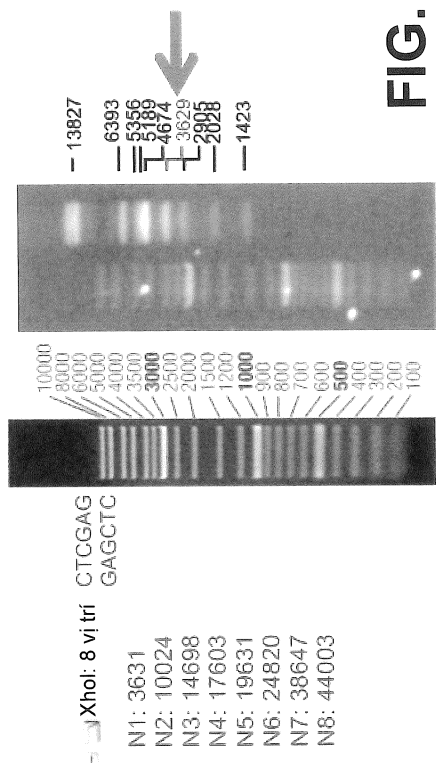


FIG. 1B

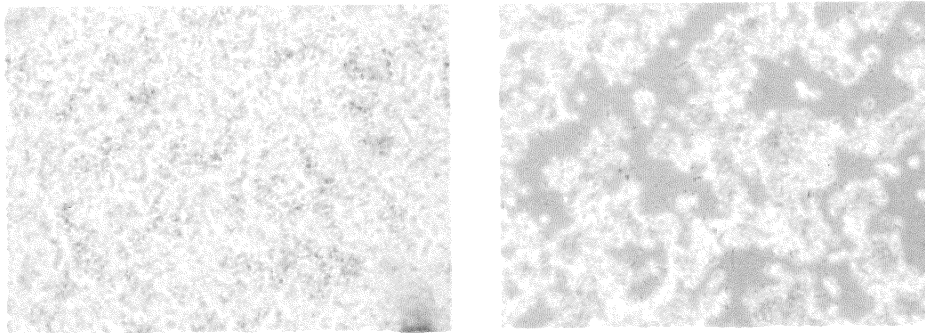


FIG. 1C

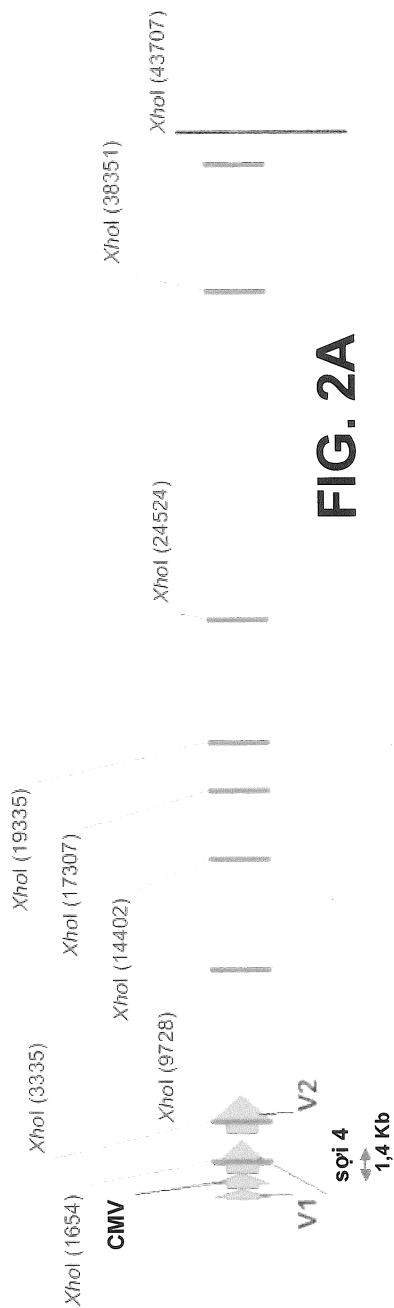


FIG. 2A

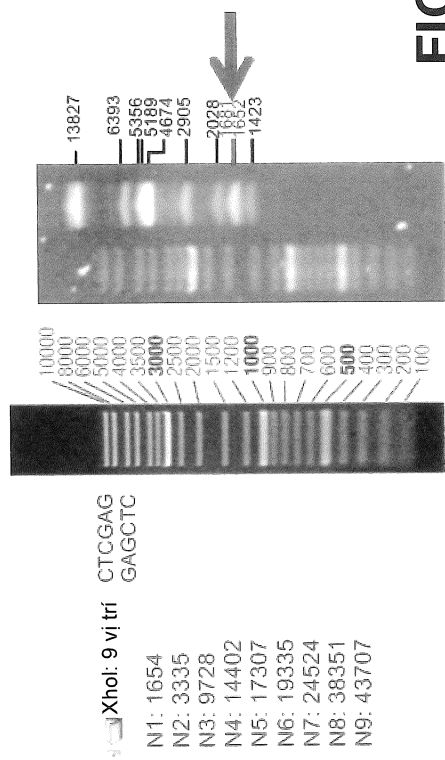


FIG. 2B

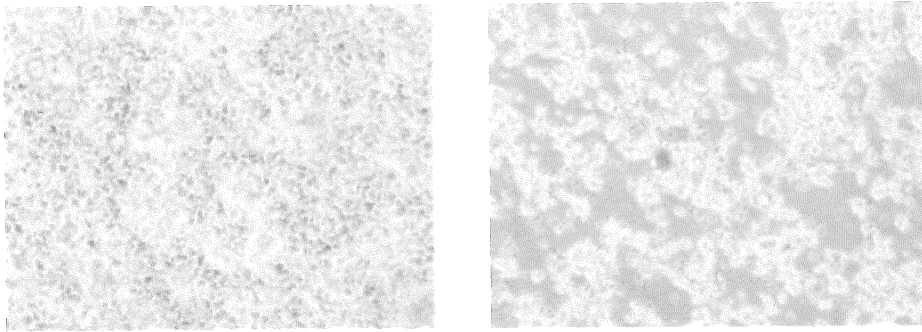


FIG. 2C

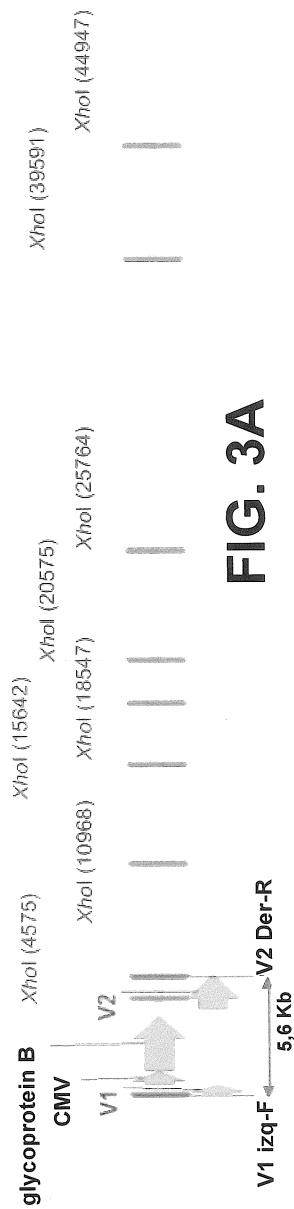


FIG. 3A

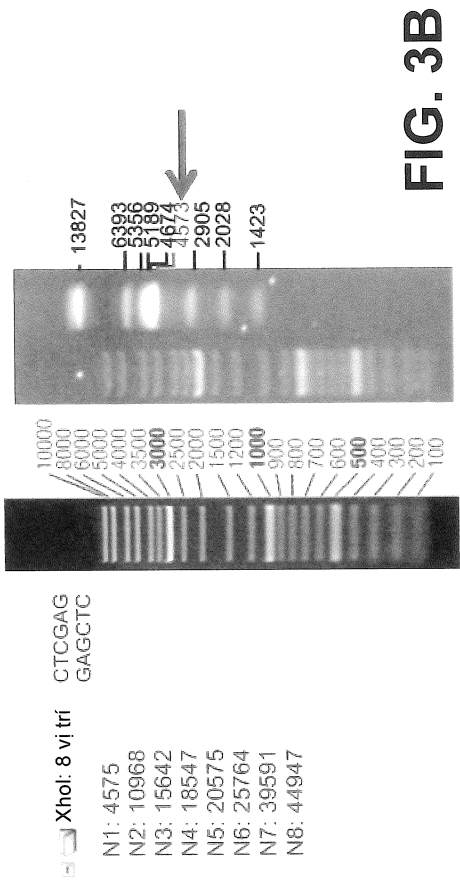


FIG. 3B

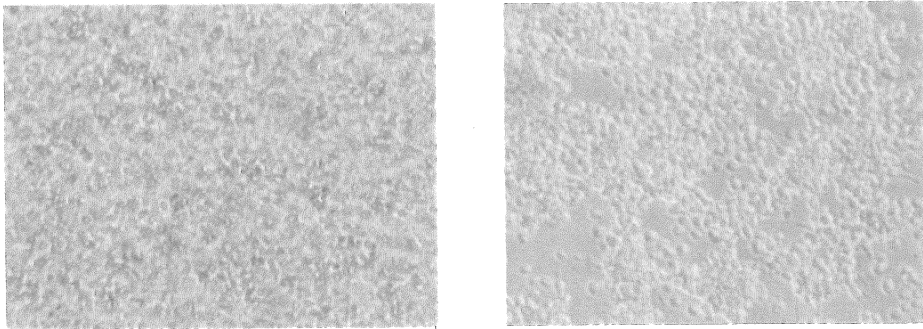


FIG. 3C

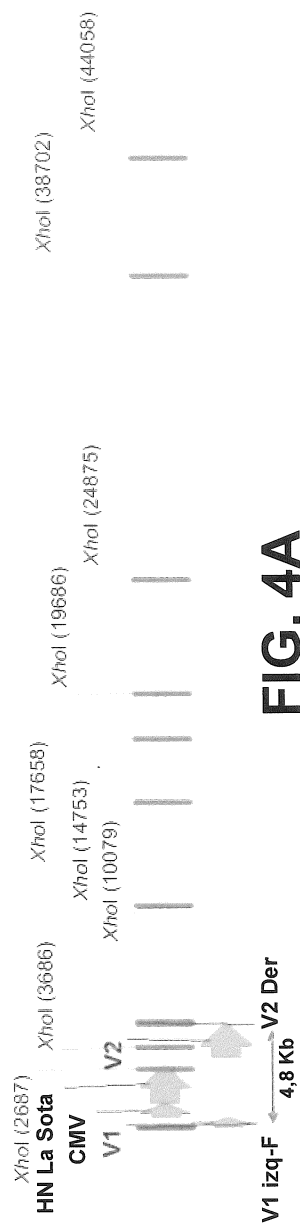


FIG. 4A

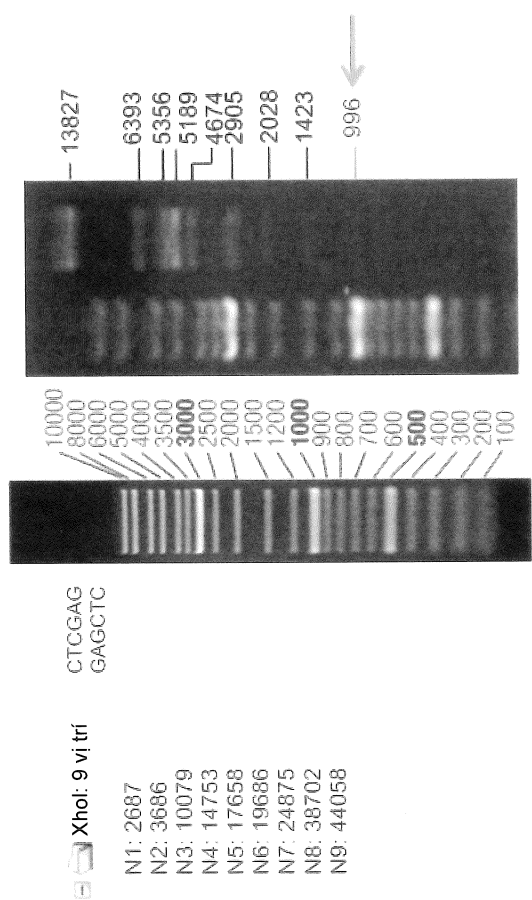


FIG. 4B

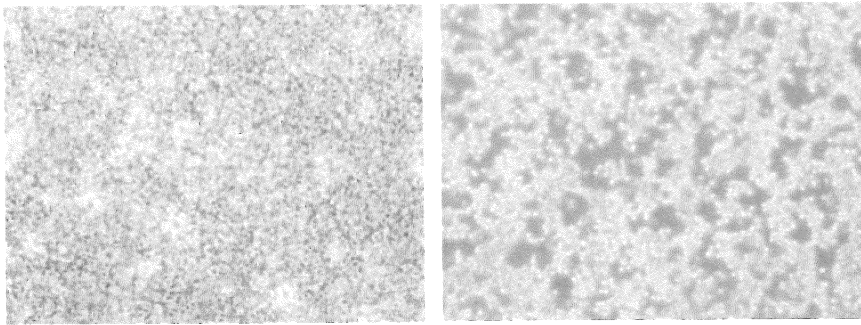


FIG. 4C

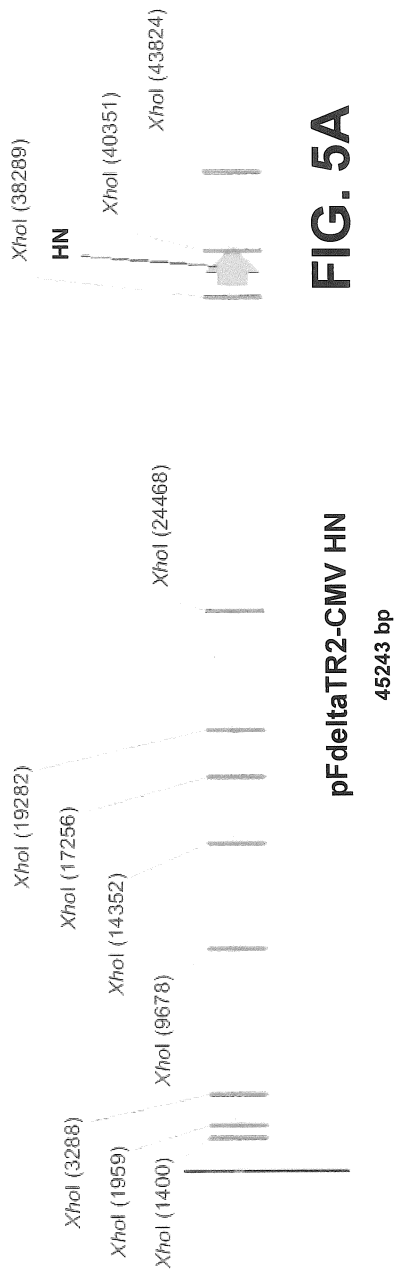
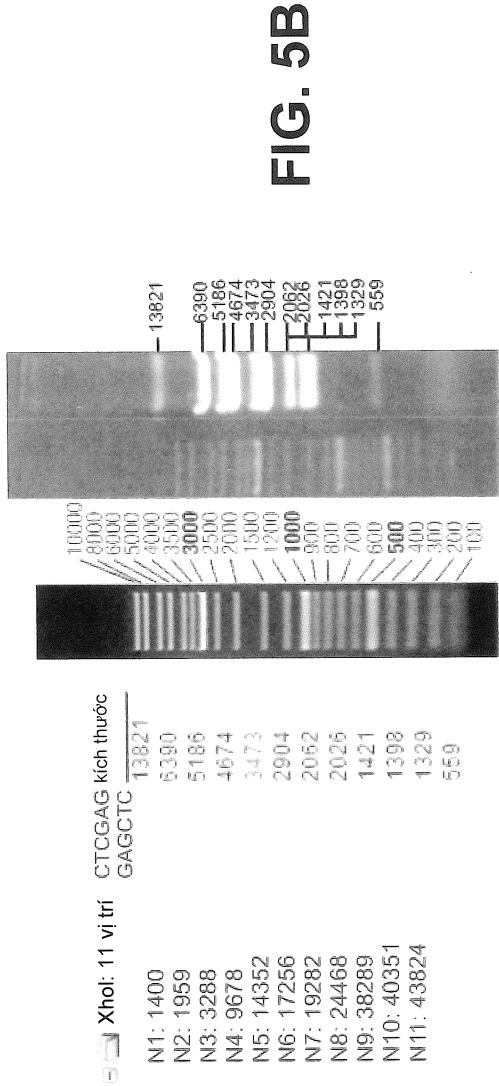


FIG. 5A



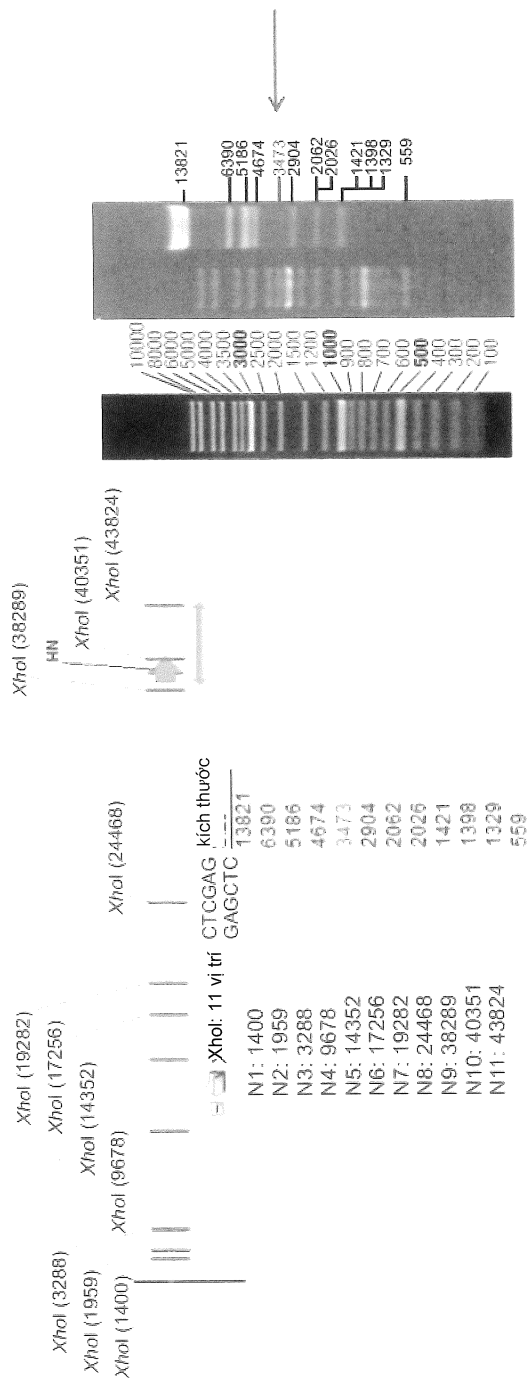


FIG. 5C

35072

11/19

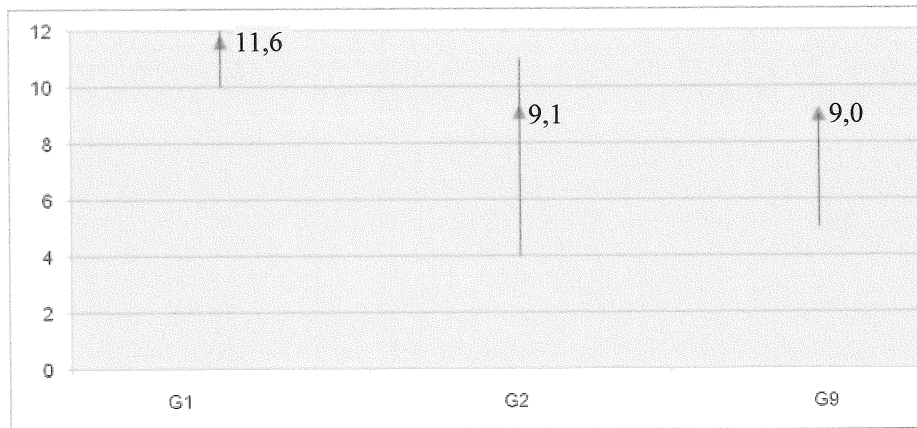


FIG. 6

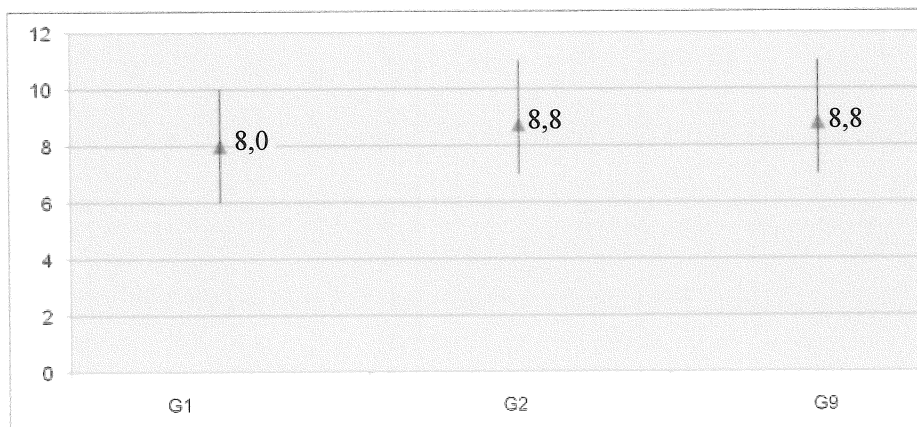
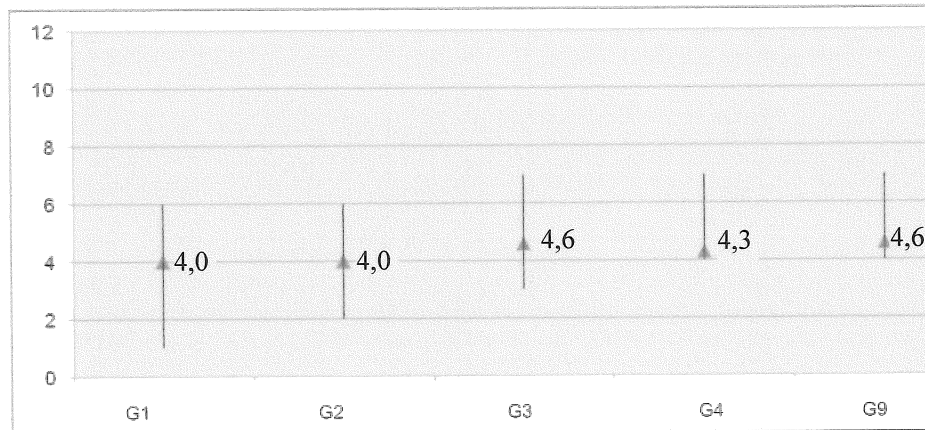
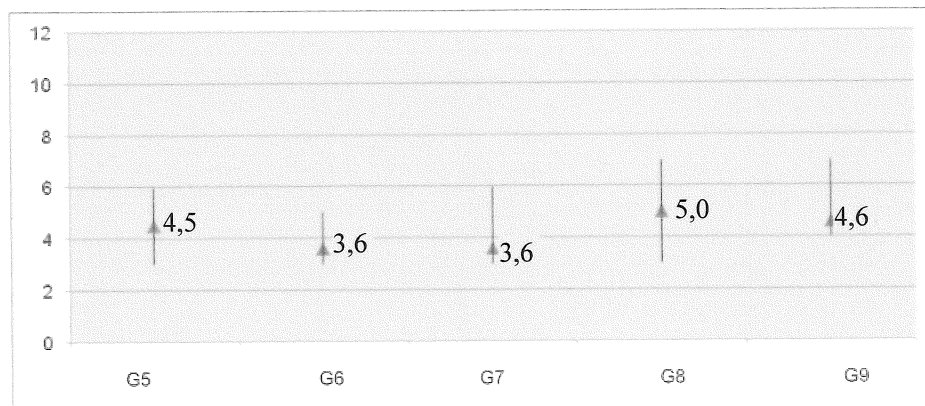
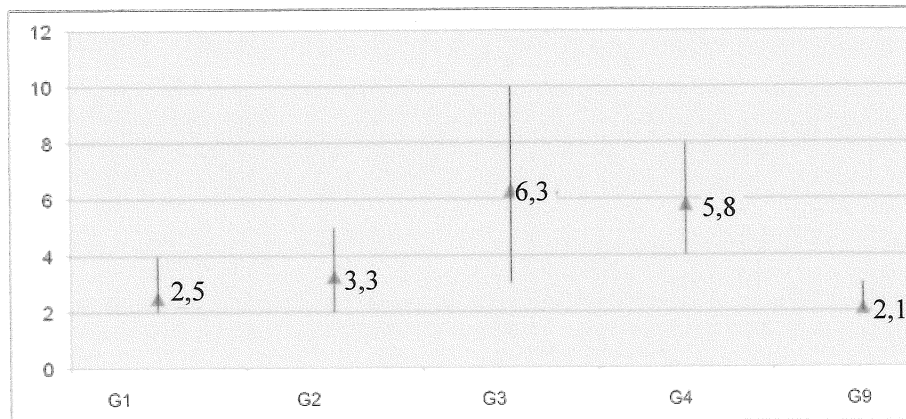
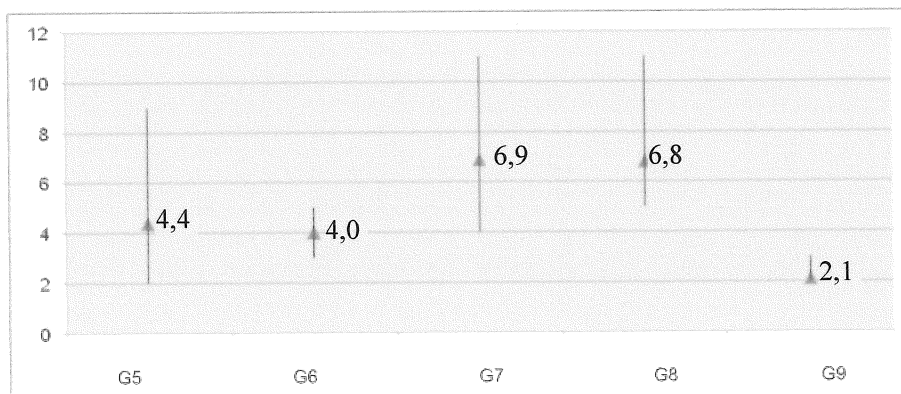
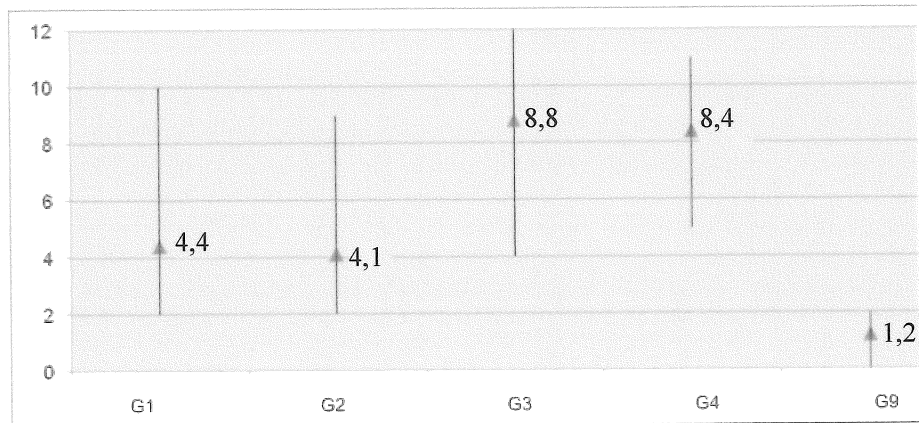
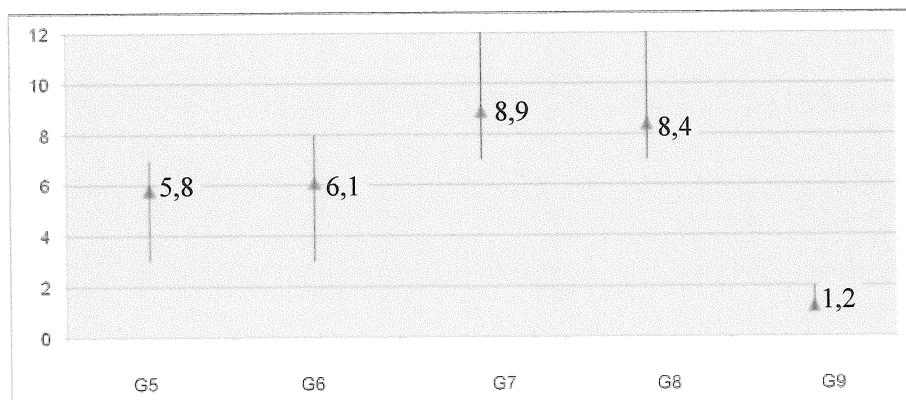
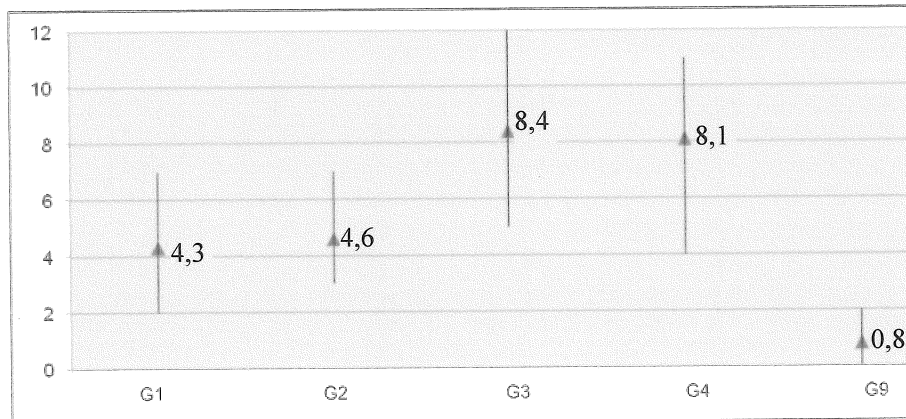
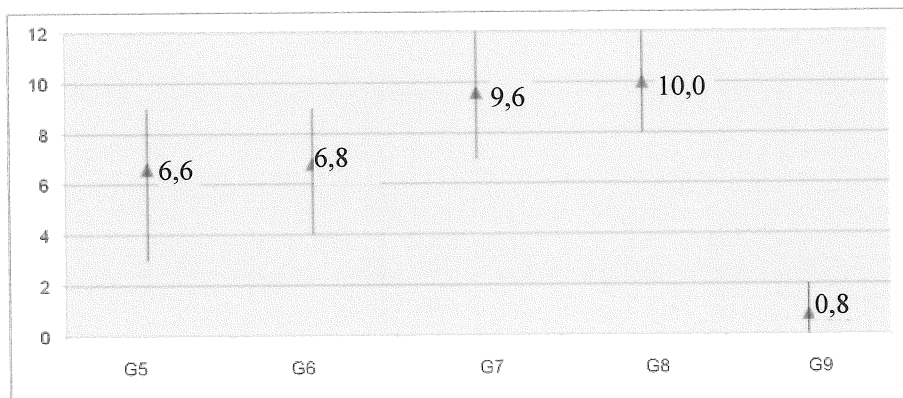


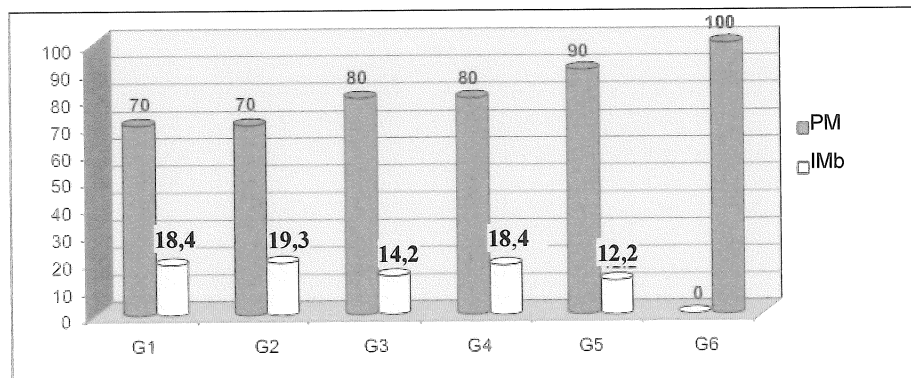
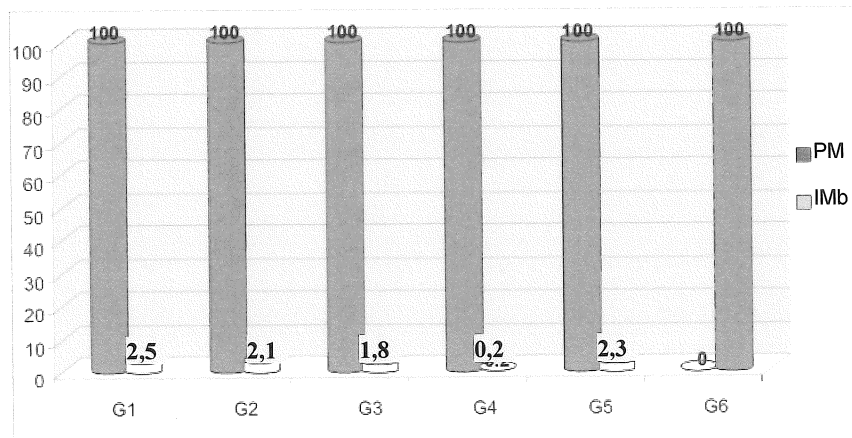
FIG. 7

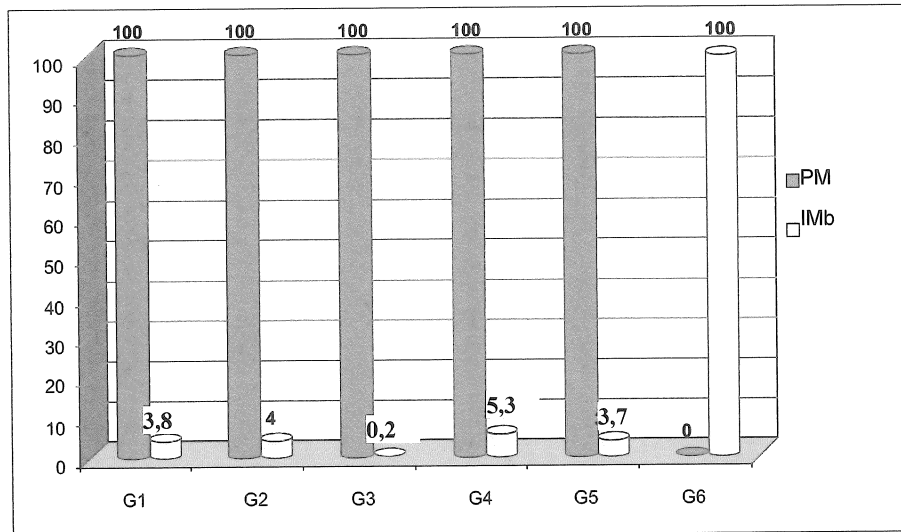
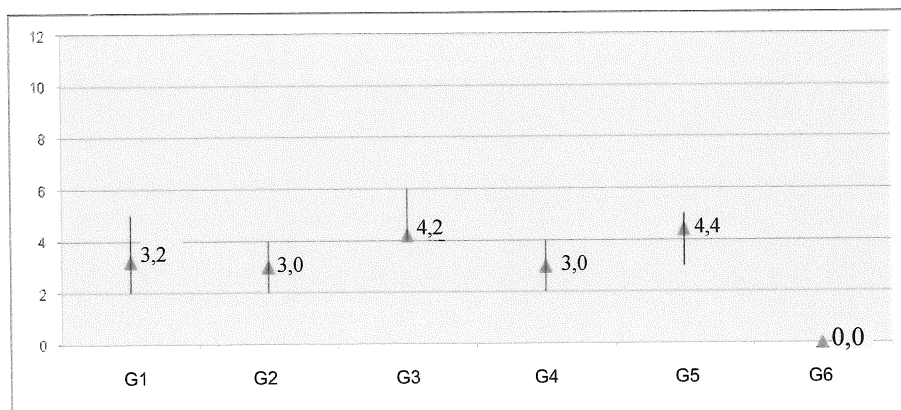
**FIG. 8****FIG. 9**

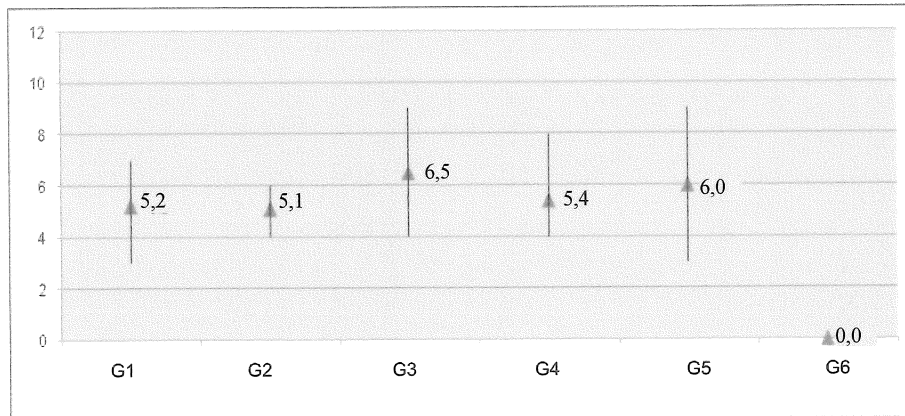
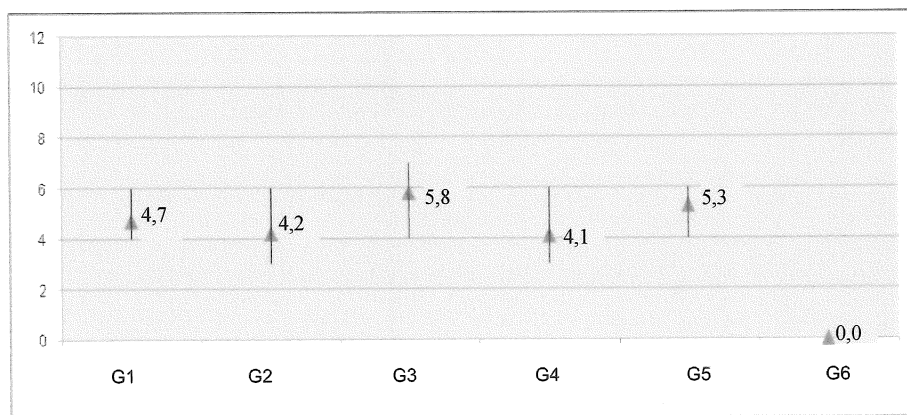
**FIG. 10****FIG. 11**

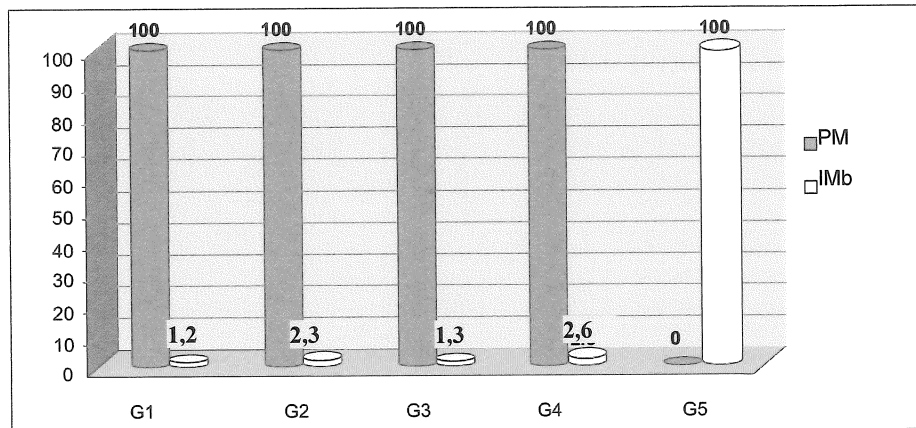
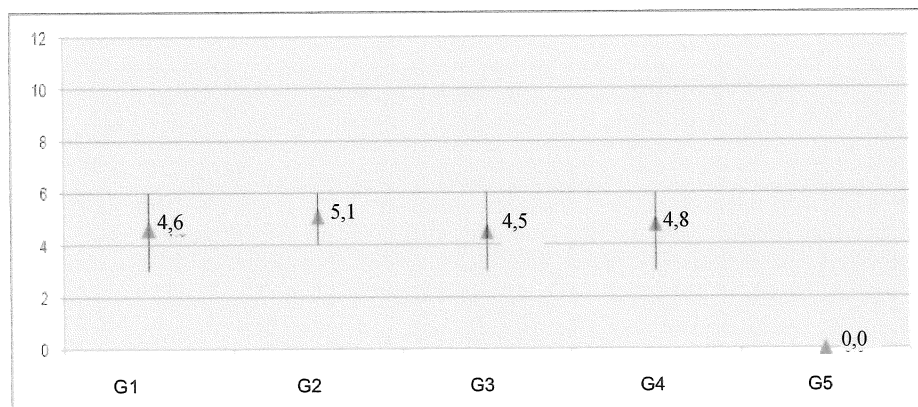
**FIG. 12****FIG. 13**

**FIG. 14****FIG. 15**

**FIG. 16****FIG. 17**

**FIG. 18****FIG. 19**

**FIG. 20****FIG. 21**

**FIG. 22****FIG. 23**

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> LABORATORIO AVI-MEX, S.A. DE C.V.

<120> Vacxin tái tổ hợp bao gồm vectơ adenovirut gia cầm kiểu huyết thanh 9 (FADV-9) và giống gốc của virut tái tổ hợp adenovirut gia cầm kiểu huyết thanh 9 (FADV-9)

<130> PCT15-1044

<150> PCT/IB2014/063809

<151> 2014-08-08

<160> 2

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 593

<212> ADN

<213> Adenovirut gia cầm 9

<400> 1

atgggagcca cctacttcga catcaagggc gttctagaca gaggaccttc ttttaaacca	60
tacggaggaa ccgcatacaa tcccctcgcg ccccgcggaag cctttttcaa caattggctt	120
gagtcagagc cgaacaagac cgctattacg gggttaatga ccaccccta ccgaaacgac	180
caggggaaca agaccaatac tgctgacgta gttaatagcg tgtcgggagt ttatccgaac	240
cccaatctcg gaccctgcat cagcgagatg ggagcactgg atgatgcaac tgctgacctt	300
gtcggctttg cgggacgggtt tgcgaaagtt acaaacgaga atacgcgttt ggcatacgga	360
gcgtatgtga aaccgttgaa aaacgatggg tgcgagtcac taaacccac tccttactgg	420
gtaatggaca agactgacgc caagtatctg ggcgtgatgg ccgtggaaga tttcagcacc	480
agtctcacct atccggacag cttgttaatc cctccgccct cggactactc aaccgttaac	540
acgggcgcaa tgaaagcaaa ccgtcctaac tacatcgggt tcagagataa ctt	593

<210> 2

<211> 1695

<212> ADN

<213> virut cúm A

<400> 2

atggaaagaa tagtgattgc ctttgcaata atcagcattg ttacaggtga ccaaactctgc	60
attggttatc atgcaaacaa ttcaacaaaa caagttgata caatcatgga aaagaatgtg	120
acggtcacac atgctcagga catactagaa aaagaacaca atggaagact ctgcagtctt	180
aaaggagtaa agcccctcat cctgaaggat tgcagcgtag ctgggtggat tctgggaaat	240
cctatgtgtg gtgaattcct gaatgtgccg gaatggatcat acattgtgga gaaagacaac	300

ccatccaatg gcctgtgtta ccctggaaac ttcgacaatt atgaagaatt gaagcattta	360
atgagcagca caaatcacat cgagagaatt cagatatttc ctaggagctc ttggtccaac	420
cataatgcct catcaggagt gagctcggca tgcccgtcca atggtatatc ttcctttttc	480
cggaatgtag tgtggttgat caagaaggat aatgtgtacc gaacactaaa gaagaactac	540
accaacacca atgtagaaga ccttttaata atgtggggag ttcatcaccc tactgatgca	600
actgagcaga caaaactcta ccagaacctg aacacttatg tatcggtggg aacatcaaca	660
ctaaatcaga ggtcaatccc gaaaatagcc accagacccc aggtgaacgg acagagagga	720
aggatggaat ttttttgac aatattaaag ccgaacgatt caatcttttt tgagagtact	780
gggaacttta tagctcccga atatgcatac aagatcacta aaaaaggga atcagcagtc	840
atgaaaagtg aactggatta tggcgactgt aataccaaat gccagacccc agtgggtgct	900
gtaaattcca gtctgccttt ccacaatgtc catcccttta ccattgggga atgccccagg	960
tatgtaaaat cgaagaaact ggtccttgca acaggattaa gaaatgtacc caaaaagaa	1020
acaagaggct tatttgagc aatagctgga ttcatagaag gggggtggca aggaatggtg	1080
gatggatggt atggatacca tcatagcaat gagcagggtg gtgggtatgc tgcagacaaa	1140
gaatctacac agaaagcaat taatggaatc actaataaag tcaactcaat cattggcaaa	1200
atgaacactc agttcgaagc cattgggaaa gaattcaaca acctagaaag gagaatagaa	1260
aatttgaata agaaaatgga agatgacttt ttggatgtat ggacttacia tgcagaactt	1320
ctagtgtca tggaaaacga gagaactctg gatctccatg attcaaagt caagaattta	1380
tacgataagg tccgactcca actgagagat aatgcaaaag aactaggcaa cggatgcttt	1440
gaattctacc acaagtgtga caatgaatgc atggaaagtg tgagaaatgg aacgtatgat	1500
taccacaaat actcaaaaga gtcaaaactg aatagagagg aaatagaagg ggtcaaatta	1560
gaatcaacag ggacttatca gatactttca atctattcaa cagtggcgag ttccttagca	1620
ctggcaatca tggtagctgg tctatctttt tggatgtgct ccaatggatc attgcagtgc	1680
agaatttgca tctaa	1695