



(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)



1-0036090

(51)⁷ C12N 7/00; A61K 39/00; A61K 39/12; (13) B
A61P 31/16; C07K 14/005; C12N 15/86;
A61K 35/76; A61K 39/145

(21) 1-2018-00713

(22) 03/11/2016

(86) PCT/RU2016/050066 03/11/2016

(87) WO/2017/078577 11/05/2017

(30) 2015147703 06/11/2015 RU

(45) 26/06/2023 423

(43) 25/04/2019 373A

(73) "PHARMENTERPRISES BIOTECH" LIMITED LIABILITY COMPANY (RU)
Bolshoi Bulvar, 42, bldg. 1, 1st floor, part of office 335, Innovation Center
"Skolkovo" Moscow, 143026 (RU)

(72) EGOROV, Andrei Yurievich (RU); FERKO, Boris (AT); KROKHIN, Artem
Alexandrovich (RU); ROMANOVA, Yulia Romanovna (RU).

(74) Công ty TNHH Tư vấn đầu tư và Sở hữu trí tuệ INTERFIVE (INTERFIVE CO.,
LTD)

(54) VIRUT CÚM A NHƯỢC ĐỘC, VECTƠ VIRUT CÚM NHƯỢC ĐỘC VÀ DƯỢC
PHẨM CHỨA VECTƠ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến lĩnh vực y tế và virus. Cụ thể là, sáng chế đề cập đến virus cúm A
nhược độc, vectơ dựa trên virus cúm này và dược phẩm chứa vectơ này, có thể sử dụng để
ngăn ngừa và/hoặc điều trị bệnh nhiễm khuẩn. Ngoài ra, sáng chế đề cập đến virus cúm A
nhược độc, vectơ dựa trên virus cúm và dược phẩm chứa vectơ này để điều trị bệnh ung
thư.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực y tế và các bệnh virus, cụ thể là, sáng chế đề cập đến virus A dạng khả được giảm độc lực, vector cúm giảm độc lực dựa trên virus này để ngăn ngừa và/hoặc điều trị các bệnh nhiễm trùng và các bệnh ung thư.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Ngày nay, hầu hết các phương pháp bảo vệ quan trọng để điều trị nhiễm trùng và hạn chế sự lan rộng của chúng là tiêm vaccin ngăn ngừa. Các loại vaccin hiện nay, có nguyên tắc là tạo thành kháng thể kháng kháng nguyên virus bề mặt. Hiệu quả của vaccin phụ thuộc trực tiếp vào mức độ phù hợp giữa cấu trúc của chủng virus có trong vaccin và các chủng đang phát tán trong cộng đồng. Các protein bề mặt của hầu hết các virus đều có sự biến đổi kháng nguyên cố định (độ lệch kháng nguyên), đòi hỏi sự thay đổi không ngừng của các chế phẩm vaccin chống virus. Việc phát triển các vaccin có khả năng gây miễn dịch cao và an toàn tạo ra các đáp ứng miễn dịch phổ rộng hiện là các vấn đề chính trong việc ngăn ngừa virus cúm hiệu quả.

Trong số các bệnh hô hấp do virus gây ra, cúm gây ra tình trạng bệnh nghiêm trọng nhất và gây ra các tổn thất lớn nhất đối với sức khỏe và kinh tế của cộng đồng. Việc thiếu đáp ứng miễn dịch cộng đồng với các chủng virus gây dịch bệnh nổi lên định kỳ làm cho việc nhiễm cúm đặc biệt nguy hiểm. Đã biết rằng chủng Spanish flu gây tử vong cho từ 30 đến 50 triệu người năm 1918. Hiện nay, theo số liệu của Tổ chức Y tế thế giới (WHO), mỗi năm có xấp xỉ 20% dân số thế giới, bao gồm 5-10% là người lớn và 20-30% là trẻ em, bị nhiễm cúm trong thời gian phát dịch bệnh (World Health Organization) URL: <http://www.who.int/biologicals/vaccines/influenza/en/> (accessed date: 28.03.2016)). Theo báo cáo thì có 3-5 triệu trường hợp mắc bệnh nặng và từ 250.000 đến 500.000 trường hợp tử vong. Tổn thất về kinh tế do cúm gây ra và các bệnh nhiễm trùng đường hô hấp cấp khác do virus (ARVI) chiếm khoảng 77% tổng số thiệt hại do bệnh nhiễm trùng gây ra. Các tổn thất quan trọng liên quan đến cả chi phí trực tiếp cho việc điều trị và phục hồi của bệnh nhân, cũng như các thiệt hại gián tiếp do giảm năng suất lao

động và giảm lợi nhuận. Cúm và các bệnh đường hô hấp cấp do virus gây ra khoảng từ 12 đến 14% tổng số các trường hợp mất sức tạm thời.

Các vaccin hiện tại có thể được chia thành hai typ: loại được giảm độc lực (còn sống, chứa toàn bộ và phần gây độc còn hoạt tính ở mức độ thấp) và bất hoạt (chứa các đoạn của các hạt virus hoặc toàn bộ virus bị bất hoạt). Các virus sống sao chép trong vật chủ bị nhiễm gây ra đáp ứng miễn dịch mạnh và kéo dài chống lại các kháng nguyên biểu hiện của các virus này. Chúng gây ra cả các đáp ứng miễn dịch dịch thể và đáp ứng miễn dịch tế bào và kích thích đáp ứng miễn dịch qua trung gian xytokin và chemokin. Do đó, các virus được giảm độc lực còn sống có một số các ưu điểm so với các vaccin dựa trên các chất gây miễn dịch đã bất hoạt hoặc các dưới đơn vị riêng biệt của các chất gây miễn dịch, thường chỉ kích thích hệ thống miễn dịch dịch thể.

Để gây miễn dịch cho động vật và người mắc các bệnh nhiễm trùng khác nhau, các virus thuộc các họ khác nhau có thể được sử dụng làm các vector biểu hiện các trình tự hệ gen ngoại lai. Các vector này có thể được sử dụng trong các trường hợp khi không tạo ra được các vaccin sống hoặc chết truyền thống hoặc hiệu quả của chúng không kiểm soát được bệnh. Trong số các hệ thống phân phối kháng nguyên hiện có, các vector virus có một vị trí đặc biệt nhờ các đặc tính sau đây: chúng có cơ chế tương tác tự nhiên với tế bào và thâm vào trong tế bào, chuyển các vật liệu hệ gen ngoại lai vào tế bào chất và nhân tế bào và có sự biểu hiện kéo dài của kháng nguyên và vỏ virus bảo vệ axit nucleic mã hóa gen chuyển được đưa vào.

Không phải tất cả các virus có các đặc tính cần thiết để cấu trúc nên các vector để tạo ra các vaccin tái tổ hợp giảm độc lực có hiệu quả. Hiện nay, để phát triển các vaccin dựa trên vector virus, các virus được sử dụng phổ biến nhất là poxvirus (Poxviridae) [J. Gen. Virol. 2005. V. 86. No. 11. P. 2925-2936], virus gây bệnh Newcastle (NDV) [Virol. 2001. V. 75. No.23. P. 11868-11873] và adenovirus (Adenoviridae) [Biotechnology. 2007. V. 5, P. 38-44]. Trong số các poxvirus được sử dụng làm vector virus, virus phổ biến nhất là virus đậu mùa có các ưu điểm như đơn giản và giá thành sản xuất thấp cũng như có khả năng bao gói cao (lên tới 25 kbp) [J. Gen. Virol. 2005. V. 86. No. 11. P. 2925-2936]. Một nhược điểm quan trọng của vector dựa trên virus đậu mùa là đã có sự miễn dịch trong cộng đồng đối với virus này, tồn tại trong một phần cộng đồng là kết quả của việc tiêm chủng đậu mùa. Do đó, nên sử dụng các vector dựa trên poxvirus, như

canarypox (Canarypox) và poxvirus gia cầm (Flowpox). Tuy nhiên, Canarypox và Flowpox chỉ tạo ra đáp ứng miễn dịch yếu đối với các kháng nguyên đích hơn virus đậu mùa và cần phải tiêm nhắc lại hoặc sử dụng thêm tá dược [Vaccine. 1991. V. 9. No. 5, P. 303-308]. Nhược điểm quan trọng của vector vaccine NDV là tác dụng của việc sử dụng NDV tái tổ hợp chưa được nghiên cứu đầy đủ và chưa có kết luận rõ ràng là các vaccine dựa trên NDV có an toàn cho người không. Ngoài ra, NDV có đặc điểm là có khả năng bao gói thấp và khó khăn trong việc tạo ra các vector mang một vài kháng nguyên đích [Chem. Biodivers. 2010. V. 7. No. 3. P.677-689]. Adenovirus cũng có một số nhược điểm làm hạn chế việc sử dụng của chúng để làm vector chuyển gen. Các nhược điểm chính của các vector adenovirus là: (1) phân bố không đồng nhất của thụ thể virus trên bề mặt tế bào của cơ thể, làm cho nhiều tế bào nhạy cảm với việc nhiễm adenovirus; (2) đã có miễn dịch bảo vệ mạnh trong cộng đồng đối với vector adenovirus; và (3) về mặt lý thuyết thì có khả năng gắn kết của ADN hệ gen adenovirus vào nhiễm sắc thể người (Stephen SL, Montini E, Sivanandam VG, Al-Dhalimy M, Kestler HA, Finegold M, Grompe M, Kochanek S. Chromosomal integration of adenoviral vector DNA in vivo. J Virol. 2010 Oct;84(19):9987-94. doi: 10.1128/JVI.00751-10. Epub 2010 Aug 4).

Các vector được tạo ra dựa trên virus cúm có một số ưu điểm so với các vector virus khác là do:

- virus cúm không có pha ADN trong chu trình sao chép và không thể cài vào hệ gen của người hoặc động vật;
- virus cúm gây ra đáp ứng miễn dịch hệ thống và đáp ứng tế bào B và tế bào T dịch thể đối với các kháng nguyên khi nhiễm tế bào đường hô hấp ở người;
- có nhiều nhóm phụ virus cúm khác nhau có thể sử dụng được. Do các kháng thể đối với các nhóm phụ khác nhau này không có phản ứng chéo nên có thể tránh trường hợp đã có miễn dịch tồn tại sẵn đối với vector virus trong vật chủ, thường là một vấn đề với các vector sống khác. Việc gây miễn dịch cũng có hiệu quả cao vì có nhiều typ phụ virus cúm biểu hiện cùng kháng nguyên;
- có một vài typ vaccine cúm sống có thể sử dụng theo đường trong mũi (LIVE allantoic INFLUENZA VACCINE ULTRAVAC® (RF) and Flumist® (USA)) and industrial technology of their production by using 10-day-old chicken embryos (Guideline on influenza vaccine - Quality Module, European Medicines Agency, 25 April

2014 [electronic resource] URL:
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2014/06/WC500167817.pdf (accessed date: 11.01.2015)).

Virut cúm thuộc họ *Orthomyxoviridae*, bao gồm các giống: virut cúm A, B, và C. Hệ gen của virut cúm A và B có cấu trúc tương tự và bao gồm tám đoạn ARN hệ gen cực âm: PB2, PB1, PA, HA, NA, NP, M và NS (Chou YY, Vafabakhsh R, Doğanay S, Gao Q, Ha T, Palese P. Một hạt virut cúm bao gói tám ARN virut riêng biệt theo phân tích FISH. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Jun 5;109(23):9101-6. doi: 10.1073/pnas.1206069109. Epub 2012 Apr 30). Phức hệ polymeraza PB2, PB1 và PA dịch mã một ARN thông tin từ mỗi đoạn hệ gen, được dịch mã thành protein cùng tên. ARN thông tin của các đoạn M và NS hệ gen có thể ghép lại với nhau để tạo thành các ARN mã hóa lần lượt các protein M2 và NEP. Tất cả các protein trừ NS1 và PB1-F2 (không phải có ở tất cả các chủng) đều là các thành phần cấu trúc của các hạt virut. Protein không-cấu trúc NS1 tích lũy trong tế bào chất của các tế bào bị nhiễm và có tác dụng làm chất ức chế interferon (Krug RM. Functions of the influenza A virus NS1 Protein in antiviral defense. *Curr Opin Virol*. 2015 Jun; 12:1-6. doi: 10.1016/j.coviro.2015.01.007. Epub 2015 Jan 29. Review).

Cấu trúc dạng phân đoạn của hệ gen virut cúm là nguồn các chủng mới khác, là kết quả của quá trình phân loại lại. Đây là một trong những cơ chế của việc đa dạng hóa kháng nguyên tự nhiên của virut cúm và việc xuất hiện các dịch cúm.

Các đặc tính kháng nguyên của virut cúm được xác định bởi các glycoprotein bề mặt - hemagglutinin (HA) và neuraminidaza (NA) tạo ra các gai trên bề mặt hạt virion. Phân tử HA có vai trò trong cơ chế liên kết của virut với thụ thể axit sialic trên tế bào và dung hợp virut và màng tế bào để thẩm vật liệu di truyền vào tế bào chất và nhân của tế bào. Trong quá trình sao chép virut, HA được tách ra (hoạt hóa HA) bằng các proteaza tế bào thành hai dưới đơn vị - HA1 và HA2 –mà vẫn giữ cầu nối disulfua (Bullough PA, Hughson FM, Skehel JJ, Wiley DC. Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion. *Nature* 1994; 371, 37-43). Phân tử HA bao gồm hai phần: phần hình cầu bao gồm dưới đơn vị HA1 và vùng thân được tạo thành chủ yếu bởi HA2 và một phần bởi dưới đơn vị HA1. Phần hình cầu bao gồm vị trí liên kết thụ thể và năm vị trí kháng nguyên và làm đích chính để tạo thành kháng thể. Các kháng thể chặn sự liên kết

của virus với thụ thể tế bào là kháng thể trung hòa. Dưới đơn vị HA1 có khả năng biến đổi cao. Phần thân HA nằm ở vị trí tương đối gần với màng virus là phần có tính bảo toàn cao và có khả năng gây miễn dịch thấp. Chức năng chính của dưới đơn vị HA2 là đảm bảo sự dung hợp của màng virus và màng nội bào; dưới đơn vị này có tính bảo toàn rất cao. Dựa vào tính đặc hiệu kháng nguyên, cho đến nay đã biết 18 typ phụ của HA và 11 typ phụ của NA của virus cúm A. Các typ phụ H1, H2, H5, H6, H8, H9, H11, H12, H13, H16, H17 và H18 thuộc nhóm thứ nhất và các typ phụ H3, H4, H7, H10, H14 và H15 thuộc nhóm thứ hai. Trong khi đó, chỉ có typ phụ H1, H2 và H3 của virus cúm A và các biến thể kháng nguyên khác nhau của virus cúm B, lưu thông trong cộng đồng người, mới gây ra các đại dịch và dịch cúm theo mùa.

Tính miễn dịch đặc hiệu được tạo ra sau khi mắc bệnh hoặc sau khi tiêm chủng bởi một typ phụ virus cúm A sẽ tạo ra một mức bảo vệ yếu khỏi nhiễm các typ phụ virus khác. Việc gây miễn dịch đối với typ phụ virus cúm A bất kỳ không bảo vệ khỏi nhiễm virus cúm B, và ngược lại, việc gây miễn dịch kháng lại virus cúm B không có hiệu quả với virus cúm A. Do đó, rất cần phát triển một loại vaccin cúm phổ quát kháng lại tất cả các biến thể đã biết của virus cúm A và B.

Hai cơ chế gây ra sự biến đổi rất mạnh của virus cúm và, do đó, tạo ra khả năng thoát khỏi kháng thể trung hòa: 1) tích lũy các đột biến điểm dẫn đến thay đổi cấu trúc kháng nguyên của glycoprotein bề mặt (dịch chuyển kháng nguyên) và 2) sắp xếp lại các đoạn hệ gen. Điều này dẫn đến việc xuất hiện các typ phụ của virus (dịch chuyển kháng nguyên) có thể gây ra đại dịch.

Tất cả các vaccin cúm hiện có có hiệu quả rất thấp đối với người già và trẻ con (Jefferson T, Rivetti A, Di Pietrantonj C, Demicheli V, Ferroni E. Vaccines for preventing influenza in healthy children. Cochrane Database Syst Rev 2012; 8, CD004879; Osterholm MT, Kelley NS, Sommer A, Belongia EA. Efficacy and effectiveness of influenza virus: a systematic review and meta-analysis. Lancet Infect Dis 2011; 12, 36-44; Pfleiderer M, Trouvin JH, Brasseur D, Granstrom M, Shivji R, Mura M, Cavaleri M. Summary of knowledge gaps related to quality and efficacy of current influenza vaccines. Vaccine 2014; 32, 4586-91). Hơn nữa, các vaccin này có thể bảo vệ chống lại các virus đang lưu thông chỉ khi vaccin đó có cùng các đặc tính kháng nguyên với chủng gây dịch. Chính sự do biến đổi mạnh của các kháng nguyên bề mặt của virus

cúm - HA và NA –nên cần phải tiêm chủng hàng năm và thay đổi chế phẩm vaccin. Cần chú ý là các vaccin theo mùa được phát triển theo khuyến nghị của WHO không có hiệu quả trong trường hợp xuất hiện chủng virus gây dịch mới khác biệt cơ bản với tất cả các chủng đang lưu thông, như trường hợp xảy ra năm 2009 khi virus gây dịch A/California/7/2009 (H1N1pdm09) nổi lên. Một ví dụ nữa về tính hiệu quả thấp của thành phần H3N2 của vaccin theo mùa năm 2014 do sự xuất hiện của biến thể kháng nguyên mới của typ phụ của virus này là kết quả của việc dịch chuyển kháng nguyên (Skowronski DM, Chambers C, Sabaiduc S, De Serres G, Dickinson JA, Winter AL, Drews SJ, Fonseca K, Charest H, Gubbay JB, Petric M, Krajden M, Kwindt TL, Martineau C, Eshaghi A, Bastien N, Li Y. Interim estimates of 2014/15 vaccine effectiveness against influenza A(H3N2) from Canada's Sentinel Physician Surveillance Network, January 2015. *Euro Surveill* 2015; 20). Trong vòng 60 năm qua, rất nhiều vaccin đã được phát triển với một số ưu điểm và nhược điểm, tuy nhiên, không có vaccin hiện có nào có thể giải quyết được vấn đề kiểm soát được sự hoành hành của cúm vì không có khả năng gây ra miễn dịch bảo vệ chéo với virus cúm không ngừng tiến hóa. Do đó, rất cần phát triển một loại vaccin phổ quát có hiệu quả có khả năng gây miễn dịch bảo vệ chéo phổ rộng kéo dài và có khả năng bảo vệ kháng lại virus cúm A và B thuộc tất cả các typ phụ đã biết.

Chức năng của tất cả các virus cúm bất hoạt đã biết (toàn bộ virion, tách từng phần hoặc dưới đơn vị) hoặc còn sống (nhược độc, thích ứng lạnh) – để tạo ra khả năng miễn dịch đối với phần hình cầu của HA. Ngược lại với phần hình cầu dễ biến đổi, phần thân HA của virus cúm A (nhóm I và II) và virus B có tính bảo toàn cao hơn nhiều. Có một số cơ chế trung hòa trực tiếp và gián tiếp đã biết đối với kháng thể được tạo ra từ phần này của HA. Một cơ chế để trung hòa trực tiếp là nhằm ngăn ngừa sự thay đổi cấu hình của HA cần để giải phóng peptit dung hợp và sau đó dung hợp màng virus và màng nội bào để đưa vật liệu di truyền của virus vào tế bào. Cơ chế thứ hai để trung hòa trực tiếp là nhằm ngăn ngừa việc cắt HA thành các dưới đơn vị HA1 và HA2 bằng cách tương tác các kháng thể với phần HA nằm ở gần vị trí cắt. Tính độc tế bào phụ thuộc bề mặt và phụ thuộc kháng thể liên quan đến các cơ chế trung hòa gián tiếp (Terajima M, Cruz J, Co MD, Lee JH, Kaur K, Wrammert J, Wilson PC, Ennis FA. Complement-dependent lysis of virus cúm A-infected cells by broadly cross-reactive human monoclonal antibodies. *J*

Virol 2011; 85, 13463-7; Jegaskanda S, Weinfurter JT, Friedrich TC, Kent SJ. Antibody-dependent cellular cytotoxicity is associated with control of pandemic H1N1 influenza virus infection of macaques. J Virol 2013; 87, 5512-22).

Việc tiêm chủng không tạo ra kháng thể đối với vùng thân HA, trong khi đó nếu bị nhiễm tự nhiên thì có thể phát hiện thấy một lượng nhỏ các kháng thể này trong cơ thể (Moody MA, Zhang R, Walter EB, Woods CW, Ginsburg GS, McClain MT, Denny TN, Chen X, Munshaw S, Marshall DJ, Whitesides JF, Drinker MS, Amos JD, Gurley TC, Eudailey JA, Foulger A, DeRosa KR, Parks R, Meyerhoff RR, Yu JS, Kozink DM, Barefoot BE, Ramsburg EA, Khurana S, Golding H, Vandergrift NA, Alam SM, Tomaras GD, Kepler TB, Kelsoe G, Liao HX, Haynes BF. H3N2 influenza infection elicits more cross-reactive and less clonally expanded anti-hemagglutinin antibodies than influenza vaccination. PLoS ONE 2011; 6, e25797).

Phần lớn các hướng phát triển thế hệ vaccin mới phổ quát hiện nay đều hướng đến các vùng bảo toàn của protein virus cúm. Các kháng thể hướng đến các protein bảo toàn PB2, PB1, PA, NP, và M1 không có hoạt tính trung hòa nhưng có thể đóng vai trò quan trọng trong việc tiêu diệt virus bằng việc gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC).

Một số ví dụ về việc tạo ra một vaccin phổ quát là dựa vào dưới đơn vị HA2. Gây miễn dịch ba đích cho chuột nhắt bằng peptit trình diện ectodomain HA2 (các gốc axit amin từ 23-185) hoặc peptit dung hợp (các gốc axit amin từ 1-38) kết hợp với protein keyhole limpet hemocyanin (KLH) và các tá dược Freund gây ra miễn dịch phản ứng chéo dẫn đến giảm mức độ tử vong ở động vật khi sử dụng liều gây chết chứa chủng khác loại (Stanekova Z, Kiraly J, Stropkova A, Mikuskova T, Mucha V, Kostolansky F, Vareckova E. Heterosubtypic protective immunity against virus cúm A induced by fusion peptide of the hemagglutinin in comparison to ectodomain of M2 protein. Acta Virol 2011; 55, 61-7). Khả năng bảo vệ tốt hơn được phát triển trong trường hợp tiêm vaccin bằng cấu trúc HA dạng khảm. Krammer và cộng sự cho thấy là miễn dịch dịch thể typ phụ khác loại được tạo ra ở chuột được gây miễn dịch bằng protein khảm, chứa các phần HA dạng cầu từ các virus thuộc các typ phụ khác nhau kết hợp với vùng thân HA của cùng loại virus (Krammer F, Palese P, Steel J. Advances in universal influenza virus vaccine design and antibody mediated therapies based on conserved regions of the hemagglutinin. Curr Top Microbiol Immunol 2014; 386, 301-21.; Krammer F, Hai R,

Yondola M, Tan GS, Leyva-Grado VH, Ryder AB, Miller MS, Rose JK, Palese P, Garcia-Sastre A, Albrecht RA. Assessment of influenza virus hemagglutinin stalk-based immunity in ferrets. *J Virol* 2014; 88, 3432-42). Quy trình gây miễn dịch phức tạp bao gồm điện di ADN động vật gây miễn dịch kép bằng cách tiêm bắp và sử dụng qua đường bằng cấu trúc protein được bổ sung tá được poly (I:C) là các nhược điểm của phương pháp này.

Việc sử dụng các cấu trúc được làm ổn định (mini-HA) được tạo ra bằng công nghệ gen, dựa trên trình tự axit amin của vùng thân HA của virus H1N1, là một ví dụ về một phương pháp khác để tạo ra vắc xin cúm phổ quát. Chỉ có các cấu trúc có ái tính cao với các kháng thể có phổ trung hòa rộng được chọn từ thư viện lớn. Việc gây miễn dịch cho chuột bằng các cấu trúc này cũng bảo vệ được động vật khỏi tử vong khi nhiễm typ phụ virus H5N1 của virus cúm chim có độc tố cao (Impagliazzo A, Milder F, Kuipers H, Wagner MV, Zhu X, Hoffman RM, van Meersbergen R, Huizingh J, Wanningen P, Verspuij J, de Man M, Ding Z, Apetri A, Kukrer B, Sneekes-Vriese E, Tomkiewicz D, Laursen NS, Lee PS, Zakrzewska A, Dekking L, Tolboom J, Tettero L, van Meerten S, Yu W, Koudstaal W, Goudsmit J, Ward AB, Meijberg W, Wilson IA, Radosevic K. A stable trimeric influenza hemagglutinin stem as a broadly protective immunogen. *Science* 2015; 349, 1301-6). Việc bảo vệ hoàn toàn chuột khỏi tử vong có thể đạt được bằng cách gây miễn dịch kép bằng tiêm bắp 30µg protein mini-HA tinh chế được bổ sung tá được Matrix-M của Novavax sản xuất.

Một hướng triển vọng trong việc phát triển vắc xin cúm phổ quát dựa trên thiết kế hạt nano tự lắp ghép kích thích đáng kể đặc tính gây miễn dịch của HA (Kanekiyo M, Wei CJ, Yassine HM, McTamney PM, Boyington JC, Whittle JR, Rao SS, Kong WP, Wang L, Nabel GJ. Self-assembling influenza nanoparticle vaccines elicit broadly neutralizing H1N1 antibodies. *Nature* 2013; 499, 102-6). Các động vật được gây miễn dịch 2 hoặc 3 lần bằng cách tiêm bắp các hạt nano được bổ sung tá được mới SAS (Sigma Adjuvant System). Mặc dù thiếu kháng thể trung hòa sau khi gây miễn dịch bằng các hạt nano nhưng chuột cũng như chồn vẫn được bảo vệ hoàn toàn không bị tử vong khi bị nhiễm virus cúm chim H5N1 có độc tố cao.

Một trong số các kỹ thuật tiên tiến để tạo ra vắc xin sống là dựa trên cấu trúc của các vectơ vắc xin có khả năng biểu hiện kháng nguyên của một virus bằng một virus khác.

Các virus chứa ADN khác nhau, được gọi là: adenovirus, herpesvirus, baculovirus hoặc poxvirus được sử dụng làm các vector để biểu hiện kháng nguyên cúm (Dudek T, Knipe DM. Replication-defective viruses as vaccines and vaccine vectors. *Virology* 2006; 344, 230-9; He F, Madhan S, Kwang J. Baculovirus vector as a delivery vehicle for vaccine. *Expert Rev Vaccines* 2009; 8, 455-67; Draper SJ, Cottingham MG, Gilbert SC. Utilizing poxvirus derived vaccines for antibody induction-progress and prospects. *Vaccine* 2013; 31, 4223-30. Price GE, Soboleski MR, Lo CY, Mispelson JA, Pappas C, Houser KV, Tumpey TM, Epstein SL. Vaccination focusing immunity on conserved antigens protects mice and ferrets against virulent H1N1 and H5N1 influenza A virus. *Vaccine* 2009; 27, 6512-21). Do đó, các thử nghiệm với vector adenovirus cho thấy thử nghiệm gây miễn dịch ba đích bằng plasmid (50µg) chứa các trình tự của protein bảo toàn NP và M2 của virus cúm A, sau đó sử dụng qua đường mũi hai vector adenovirus biểu hiện cùng protein, dẫn đến có thể bảo vệ hoàn toàn chuột và chồn bị nhiễm virus A/FM/1/47 (H1N1) hoặc typ phụ H5N1 của virus cúm chim có độc tố cao khỏi tử vong và giảm thể trọng.

Do đó, tất cả các hướng nêu trên với mục đích tạo đáp ứng miễn dịch với các vùng bảo toàn của kháng nguyên virus cúm chứng minh khả năng tạo ra một vaccine có thể bảo vệ khỏi nhiễm các biến thể khác nhau của virus cúm A. Tuy nhiên, cần phải sử dụng quy trình phức tạp gồm nhiều lần tiêm chủng cho động vật bằng cách sử dụng các tá dược gây miễn dịch có bản chất khác nhau để đạt được mục đích này. Ngoài ra, không có chế phẩm vaccine cúm phổ quát thử nghiệm đã biết nào có thể bảo vệ chống lại virus cúm B. Ngoài ra, các chế phẩm thử nghiệm nêu trên cần quy trình kỹ thuật phức tạp để tạo ra các vaccine đa thành phần, đi kèm với giá thành cao không chấp nhận được đối với một sản phẩm thương mại.

Việc biểu hiện các kháng nguyên trong tế bào của khoang mũi đã được biết là gây ra đáp ứng miễn dịch hệ thống và đáp ứng miễn dịch của tế bào B- và tế bào T ở dịch thể tại chỗ. Đã có nhiều nỗ lực nhằm sử dụng virus cúm làm vector để phân phối và biểu hiện các trình tự hệ gen lạ trong tế bào đường hô hấp của động vật. Trong số 8 đoạn thuộc hệ gen của virus cúm A hoặc B, chỉ có đoạn NS hệ gen là có khả năng cài hơn 800 nucleotit ổn định vào khung đọc của protein không cấu trúc NS1 mà không làm ảnh hưởng đến cấu trúc của các virion thu được (Kittel C, Sereinig S, Ferko B, Stasakova J, Romanova J,

Wolkerstorfer A, Katinger H, Egorov A. Rescue of influenza virus expressing GFP from the NS1 khung đọc. *Virology*. 2004 Jun 20;324(1):67-73. PubMed PMID: 15183054).

Hơn nữa, trong số tất cả các protein virus cúm, thường chỉ có protein NS1 là chứa từ 230 đến 237 gốc axit amin có thể bị cắt đến 50% ở đầu carboxyl mà không ảnh hưởng đáng kể đến hoạt tính sinh sản của virus trong môi trường tế bào, phôi gà hoặc trong đường hô hấp của động vật (Egorov A, Brandt S, Sereinig S, Romanova J, Ferko B, Katinger D, Grassauer A, Alexandrova G, Katinger H, Muster T. Transfectant virus cúm Aes with long deletions in the Protein NS1 grow efficiently in Vero cells. *J Virol*. 1998 Aug;72(8):6437-41. PubMed PMID: 9658085; PubMed Central PMCID: PMC109801).

Việc cắt protein NS1 tạo ra một khoảng trống để đưa một đoạn dài của trình tự hệ gen lạ vào mà không làm phá vỡ hình thái và chức năng cơ bản của virus, do đó có thể tạo ra vector ổn định về mặt di truyền. Như vậy, vector virus cúm dựa trên virus cúm A được tạo ra mã hóa khung đọc đã bị cắt có từ 80 đến 126 gốc axit amin của protein NS1, trong đó khung đọc bị cắt có thể được kéo dài bằng cách đưa các trình tự kháng nguyên của các virus hoặc vi khuẩn gây bệnh khác nhau vào, ví dụ các trình tự protein của vi khuẩn lao, brucella abortus hoặc virus gây suy giảm miễn dịch ở người (Tabynov K, Sansyzbay A, Kydyrbayev Z, Yespembetov B, Ryskeldinova S, Zinina N, Assanzhanova N, Sultankulova K, Sandybayev N, Khairullin B, Kuznetsova I, Ferko B, Egorov A. Influenza virus vectors expressing the Brucella OMP16 or L7/L12 proteins as vaccines against B. abortus infection. *Virol J*. 2014 Apr 10;11:69. doi: 10.1186/1743-422X-11-69. PubMed PMID: 24716528; PubMed Central PMCID: PMC3997475; Sereinig S, Stukova M, Zabolotnyh N, Ferko B, Kittel C, Romanova J, Vinogradova T, Katinger H, Kiselev O, Egorov A. Influenza virus NS vectors expressing the vi khuẩn lao ESAT-6 protein induce CD4+ Th1 immune response and protect animals against tuberculosis challenge. *Clin Vaccine Immunol*. 2006 Aug;13(8):898-904. PubMed PMID: 16893990; PubMed Central PMCID: PMC1539114; Ferko B, Stasakova J, Sereinig S, Romanova J, Katinger D, Niebler B, Katinger H, Egorov A. Hyperattenuated recombinant influenza A virus nonstructural-protein-encoding vectors induce human immunodeficiency virus type 1 Nef-specific systemic and mucosal immune responses in mice. *J Virol*. 2001 Oct;75(19):8899-908. PubMed PMID: 11533153; PubMed Central PMCID: PMC114458. Các cấu trúc mang protein NS1 bị cắt đến 124 gốc axit amin (sau đây gọi là

vector NS1-124) thể hiện là tối ưu dựa trên các thông số về sự sinh sản trong phôi gà và khả năng gây miễn dịch ở động vật (Ferko B, Stasakova J, Romanova J, Kittel C, Sereinig S, Katinger H, Egorov A. Immunogenicity and protection efficacy of replication-deficient influenza A virus with altered NS1 genes. *J Virol.* 2004 Dec; 78(23):13037-45. PubMed PMID: 15542655; PubMed Central PMCID: PMC524997).

Các cấu trúc protein NS1 bị cắt nhiều hơn thì bị giảm khả năng phát triển trong các tế bào có interferon (MDCK cells, A549), bao gồm phôi gà 10 ngày tuổi và chỉ thích hợp để tạo ra trong tế bào vero thiếu hụt interferon. Mặt khác, các vector chứa protein NS1 bao gồm từ 124 đến 126 gốc axit amin thay đổi về mức độ nhược độc và không đủ an toàn cho động vật. Ví dụ, mức độ sinh sản của vector virus mang protein mycobacterium ESAT-6 ở các vị trí đặc hiệu ở phổi chuột có thể đạt tới các giá trị gần với giá trị của virus cúm gây bệnh (số lượng hạt virus lên đến 10^4 và cao hơn ở mỗi gam mô phổi). Hơn nữa, các vector NS1-124, ở liều $> 5,0$ log/chuột, có thể tạo ra mức độ sinh sản đáng kể của virus trong mô phổi của chuột được gây nhiễm và việc hình thành bệnh lý có thể nhìn thấy được ở phổi (Egorov A, Brandt S, Sereinig S, Romanova J, Ferko B, Katinger D, Grassauer A, Alexandrova G, Katinger H, Muster T. Transfectant influenza A viruses with long deletions in the Protein NS1 grow efficiently in Vero cells. *J Virol.* 1998 Aug;72(8):6437-41. PubMed PMID: 9658085; PubMed Central PMCID: PMC109801; Stukova MA, Sereinig S, Zabolotnyh NV, Ferko B, Kittel C, Romanova J, Vinogradova TI, Katinger H, Kiselev OI, Egorov A. Vaccine potential of influenza vector expressing Mycobacterium tuberculosis ESAT-6 protein. *Tuberculosis (Edinb).* 2006 May-Jul; 86 (3-4):236-46. PubMed PMID: 16677861). Do đó, các vector cúm có khung đọc NS1 bị cắt 124 gốc axit amin không thể sử dụng để tiêm chủng cho người vì không đáp ứng các thông số an toàn đối với vacxin cúm sống, theo đó các điều kiện cơ bản là độ nhạy nhiệt độ của virus (khả năng sinh sản giảm ở 39°C) và virus không sinh sản được ở đường hô hấp dưới của động vật (Maassab HF, Bryant ML. The development of live attenuated cold-adapted influenza virus vaccine for humans. *Rev Med Virol.* 1999 Oct-Dec;9(4):237-44. Review. PubMed PMID: 10578119; Gendon IuZ. [Live cold-adapted influenza vaccine: state-of-the-art]. *Vopr Virutol.* 2011 Jan-Feb;56(1):4-17. Review.Russian. PubMed PMID: 21427948; Aleksandrova GI, Gushchina MI, Klimov AI, Iotov VV. [Genetic basis for construction of the live influenza type Vacxin using

temperature-sensitive mutants]. *Mol Gen Mikrobiol Virutol.* 1990 Mar;(3):3-8. Review. Russian. PubMed PMID: 2194119; Kendal AP. Cold-adapted live attenuated vaccins developed in Russia: can they contribute to meeting the needs for influenza control in other countries? *Eur J Epidemiol.* 1997 Jul;13(5):591-609. Review. PubMed PMID: 9258574).

Không giống các vaccin sống đã được cấp phép (LIVE allantoic INFLUENZA VACCINE ULTRAVAC® (RF) or Flumist® (USA)), vectơ cúm NS1-124 đã biết và các cấu trúc gần giống với nó không có chất đánh dấu nhạy cảm với nhiệt độ (kiểu hình ts) và có mức độ sinh sản trong phổi chuột gần với mức độ sinh sản của virus kiểu dại chứa protein NS1 có chiều dài đầy đủ.

Vào những năm 50-60 của thế kỷ 20, có nhiều nỗ lực để sử dụng virus cúm làm chất diệt tế bào ung thư bằng cách ly giải, dựa trên các quan sát của bác sĩ điều trị ở các bệnh nhân có thuyên giảm sau khi hồi phục bệnh cúm (Lindenmann J, Klein PA. Viral oncolysis: increased immunogenicity of host cell antigen associated with influenza virus. *J Exp Med.* 1967 Jul 1;126(1):93-108).

Nhờ sự phát triển của các kỹ thuật di truyền đối với virus cúm ở cuối thập niên 90, tăng khả năng tạo ra các vectơ cúm diệt tế bào ung thư chứa protein NS1 được biến đổi. Đã biết rằng việc cắt protein NS1 có thể dẫn đến làm tăng cường tác dụng ly giải tế bào ung thư khi đưa virus tái tổ hợp vào khối u, nhờ sự kích thích của hệ miễn dịch bẩm sinh mà protein NS1 là chất đối kháng (Sturlan S, Stremitzer S, Bauman S, Sachet M, Wolschek M, Ruthsatz T, Egorov A, Bergmann M. Endogenous expression of proteases in colon cancer cells facilitate virus mediated oncolysis. *Cancer Biol Ther.* 2010 Sep 15;10(6):592-9; Ogbomo H, Michaelis M, Geiler J, van Rikxoort M, Muster T, Egorov A, Doerr HW, Cinatl J Jr. Tumor cells infected with oncolytic virus cúm A prime natural killer cells for lysis of resistant tumor cells. *Med Microbiol Immunol.* 2010 May;199(2):93-101. doi: 10.1007/s00430-009-0139-0. Epub 2009 Dec 15. PubMed PMID: 20012989; Efferson CL, Tsuda N, Kawano K, Nistal-Villán E, Sellappan S, Yu D, Murray JL, García-Sastre A, Ioannides CG. Prostate tumor cells infected with a recombinant influenza virus expressing a truncated Protein NS1 activate cytolytic CD8+ cells to recognize noninfected tumor cells. *J Virol.* 2006 Jan;80(1):383-94).

Hơn nữa, khả năng thao tác các kỹ thuật di truyền với độ dài của protein virus cúm NS1 cho phép phát triển các vector mà hiệu quả của chúng được tăng cường bởi sự biểu hiện của chất có tiềm năng miễn dịch, ví dụ intolokin-15 (van Rikxoort M, Michaelis M, Wolschek M, Muster T, Egorov A, Seipelt J, Doerr HW, Cinatl J Jr. Oncolytic effects of a novel influenza A virus expressing interleukin-15 from the NS reading frame. PLoS One. 2012;7(5):e36506).

Không may mắn là, các công việc sử dụng virus cúm có khả năng sinh sản hạn chế trong một số môi trường tế bào không có độ ổn định di truyền cần thiết để gen chuyển có thể sinh sản với số lượng lớn trong phôi gà, là cơ chất tối ưu để sản xuất các chế phẩm vaccin cúm.

Do đó, cần có vector virus hiệu quả mới, cụ thể là vector cúm giảm độc lực, có đặc điểm là virus không có khả năng sinh sản chủ động trong cơ thể động vật và có kiểu hình nhạy cảm với nhiệt độ và có thể sử dụng để ngăn ngừa và/hoặc điều trị bệnh nhiễm khuẩn, cũng như điều trị bệnh ung thư.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến virus cúm A nhược độc gây ra đáp ứng bảo vệ chéo kháng lại virus cúm A và B, bao gồm đoạn NS khảm chứa khung đọc được cắt của protein NS1 và trình tự gen Nep ngoại lai thu được từ typ phụ cúm A khác với typ phụ virus cúm A nhược độc nêu trên.

Cụ thể là, sáng chế đề cập đến virus cúm A nhược độc, trong đó khung đọc được cắt này mã hóa protein NS1 bao gồm từ 80 đến 130 gốc axit amin, tốt hơn là, trong đó khung đọc được cắt mã hóa Protein NS1 bao gồm 124 gốc axit amin.

Một phương án của sáng chế đề cập đến virus cúm A nhược độc, trong đó khung đọc được cắt này của protein NS1 thu được từ typ phụ virus cúm H1N1, và trình tự gen ngoại lai Nep thu được từ typ phụ virus cúm H2N2.

Theo một phương án khác nữa của sáng chế, virus cúm A nhược độc chứa đoạn NS khảm bao gồm khung đọc được cắt của protein NS1 và trình tự gen ngoại lai Nep, trong đó khung đọc được cắt này của Protein NS1 thu được từ H1N1 typ phụ virus cúm, và trình tự gen ngoại lai Nep thu được từ typ phụ virus cúm H2N2 và trong đó khung đọc được cắt này mã hóa Protein NS1 bao gồm 124 gốc axit amin.

Sáng chế cũng đề cập đến vectơ virus cúm nhược độc biểu hiện protein hoặc một đoạn của nó được chọn từ nhóm bao gồm proteins hoặc các đoạn của nó từ vi khuẩn, virus, và động vật nguyên sinh, trong đó vectơ là virus cúm A nhược độc theo sáng chế, trong đó khung đọc được cắt của gen protein NS1 được kéo dài bằng cách cài xen vào trình tự của ít nhất một gen chuyển mã hóa protein hoặc một đoạn của nó từ vi khuẩn, virus, và động vật nguyên sinh.

Một phương án của sáng chế đề cập đến vectơ virus cúm nhược độc biểu hiện protein hoặc một đoạn của nó được chọn từ nhóm bao gồm protein của virus cúm A, virus cúm B, vi khuẩn lao, virus hecpet, virus hợp bào đường hô hấp, virus gây suy giảm miễn dịch ở người, virus viêm gan C, ký sinh trùng sốt rét, *Trichomonas*, *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Chlamydia*, chất gây bệnh “sốt lán sóng”, hoặc các hỗn hợp của chúng.

Một phương án khác của sáng chế đề cập đến vectơ virus cúm nhược độc biểu hiện protein hoặc một đoạn của nó từ vi khuẩn, virus hoặc động vật nguyên sinh gây bệnh trong đó protein này hoặc một đoạn của nó bao gồm từ 10 đến 400 axit amin.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến vectơ virus cúm nhược độc, trong đó đoạn cài mã hóa vùng protein HA của virus cúm, tốt hơn là trong đó vùng protein HA là vùng dưới đơn vị HA2 được chọn từ nhóm bao gồm 1-185 axit amin (aa) của virus cúm A, 1-186 aa của virus cúm B, 23-185 aa của virus cúm A, hoặc 65-222 aa của virus cúm A.

Phương án tiếp theo của sáng chế đề cập đến vectơ virus cúm nhược độc, trong đó đoạn cài xen vào mã hóa trình tự của vùng dưới đơn vị HA2 virus cúm A hoặc B có từ 1 đến 21 aa và trình tự của vùng protein NP virus cúm A có từ 243 đến 251 aa.

Một phương án khác của sáng chế đề cập đến vectơ virus cúm nhược độc, trong đó đoạn cài xen vào mã hóa protein ESAT-6, Ag85A, Ag85B, Mpt64, HspX, Mtb8.4, hoặc 10.4 của vi khuẩn lao, hoặc một đoạn của nó, cụ thể là, trong đó trình tự hệ gen virus có thêm trình tự mã hóa peptit 2A tự cắt giữa các trình tự mã hóa NS1-124 và ESAT6.

Sáng chế cũng đề cập đến vectơ virus cúm nhược độc biểu hiện protein hoặc một đoạn của nó, trong đó vectơ này là virus cúm A nhược độc bao gồm đoạn NS khảm bao gồm khung đọc được cắt của protein NS1 và trình tự gen ngoại lai Nep, trong đó khung đọc được cắt này của protein NS1 thu được từ H1N1 typ phụ virus cúm, và trình tự gen ngoại lai Nep thu được từ H2N2 typ phụ virus cúm và trong đó khung đọc được cắt này

mã hóa protein NS1 bao gồm 124 gốc axit amin, trong đó khung đọc được cắt của Gen protein NS1 được kéo dài bằng cách cài xen vào trình tự mã hóa 1-21 aa của protein HA2 cúm B và 243-251 aa của protein NP cúm A.

Sáng chế cũng đề cập đến vector virus cúm nhược độc có hoạt tính diệt ung thư, trong đó vector này là virus cúm A nhược độc theo sáng chế, trong đó khung đọc được cắt của gen protein NS1 được kéo dài bằng cách cài xen vào trình tự của ít nhất một gen chuyển mã hóa protein hoặc một đoạn của nó thu được từ vi khuẩn, virus hoặc động vật nguyên sinh.

Một phương án của sáng chế là vector virus cúm nhược độc có hoạt tính diệt ung thư, trong đó đoạn cài xen vào mã hóa protein hoặc một đoạn của nó được chọn từ nhóm bao gồm các protein hoặc các đoạn của nó từ virus cúm A, virus cúm B, vi khuẩn lao, virus hecpet, virus hợp bào đường hô hấp, virus gây suy giảm miễn dịch ở người, virus viêm gan C, ký sinh trùng sốt rét, *Trichomonas*, *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Chlamydia*, hoặc kết hợp các loại này.

Phương án tiếp theo của sáng chế đề cập đến virus cúm nhược độc có hoạt tính diệt ung thư, trong đó protein này hoặc một đoạn của nó chứa từ 10 đến 400 axit amin.

Một phương án được ưu tiên của sáng chế đề cập đến vector virus cúm nhược độc có hoạt tính diệt ung thư, trong đó đoạn cài xen vào mã hóa protein ESAT-6, Ag85A, Ag85B, Mpt64, HspX, Mtb8.4, hoặc 10.4 của vi khuẩn lao, hoặc một đoạn của nó, cụ thể là, trong đó khung đọc được cắt của Gen protein NS1 được kéo dài bằng cách cài xen vào trình tự mã hóa protein ESAT-6 của vi khuẩn lao, tốt hơn là trong đó khung đọc được cắt của gen protein NS1 được kéo dài bằng cách cài xen vào trình tự mã hóa peptit 2A từ cắt và trình tự mã hóa protein ESAT-6 của vi khuẩn lao.

Sáng chế cũng đề cập đến vector virus cúm nhược độc tạo ra đáp ứng bảo vệ chéo virus cúm A và B, bao gồm:

trình tự nucleotit của protein của gen PB2 thu được từ virus cúm A/PR/8/34 (H1N1) hoặc trình tự nucleotit có ít nhất 95% mức độ tương đồng trình tự với trình tự nucleotit của protein của gen PB2;

trình tự nucleotit của gen protein PB1 thu được từ virus cúm A/PR/8/34 (H1N1) hoặc trình tự nucleotit có ít nhất 95% mức độ tương đồng trình tự với trình tự nucleotit của gen protein PB1;

trình tự nucleotit của gen protein PA thu được từ virus cúm A/PR/8/34 (H1N1) hoặc trình tự nucleotit có ít nhất 95% mức độ tương đồng trình tự với trình tự nucleotit của gen protein PA;

trình tự nucleotit của gen protein NP thu được từ virus cúm A/PR/8/34 (H1N1) hoặc trình tự nucleotit có ít nhất 95% mức độ tương đồng trình tự với trình tự nucleotit của gen protein NP;

trình tự nucleotit của gen protein M thu được từ virus cúm A/PR/8/34 (H1N1) hoặc trình tự nucleotit có ít nhất 95% mức độ tương đồng trình tự với trình tự nucleotit của Gen protein M;

trình tự nucleotit của gen protein HA thu được từ virus cúm A/California/7/09-like (H1N1pdm) hoặc trình tự nucleotit có ít nhất 95% mức độ tương đồng trình tự với trình tự nucleotit của gen protein HA;

trình tự nucleotit của gen protein NA thu được từ virus cúm A/California/7/09-like (H1N1pdm) hoặc trình tự nucleotit có ít nhất 95% mức độ tương đồng trình tự với trình tự nucleotit của gen protein NA; và

trình tự nucleotit của gen protein NS khả năng bao gồm:

khung đọc của protein NS1 thu được từ A/PR/8/34 (H1N1) cúm, trong đó khung đọc này được cắt và mã hóa protein NS1 bao gồm 124 gốc axit amin,

và trình tự gen Nep thu được từ virus cúm A/Singapore/1/57-like (H2N2) hoặc

trình tự nucleotit có ít nhất 95% mức độ tương đồng trình tự với trình tự của gen NS khả năng;

trong đó khung đọc được cắt của protein NS1 này được kéo dài bằng cách cài xen vào trình tự nucleotit mã hóa peptit dung hợp của vùng dưới đơn vị HA2 của virus cúm B và trình tự nucleotit mã hóa epitop tế bào B bảo toàn của nucleoprotein virus cúm A (NP). Theo một phương án đặc biệt, trình tự nucleotit của gen protein NS khả năng được nêu trong SEQ ID NO:21.

Sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm để điều trị và/hoặc ngăn ngừa bệnh nhiễm khuẩn ở bệnh nhân, chứa một lượng có hiệu quả của virus cúm A nhược độc theo sáng chế hoặc vector virus cúm nhược độc theo sáng chế, và chất mang dược dụng.

Sáng chế cũng đề xuất dược phẩm để ngăn ngừa bệnh cúm, chứa một lượng có hiệu quả của vector virus cúm nhược độc theo sáng chế và chất mang dược dụng.

Cụ thể là, dược phẩm theo sáng chế chứa từ 6,5 đến 10,5 log EID₅₀/ml virus cúm A nhược độc và dung dịch đệm chứa từ 0 đến 1,5% theo trọng lượng muối đơn trị, từ 0 đến 5% theo trọng lượng hợp chất chứa imidazol, từ 0 đến 5 % theo trọng lượng thành phần cacbohydrat, từ 0 đến 2% theo trọng lượng thành phần protein, từ 0 đến 2% theo trọng lượng thành phần axit amin, và từ 0 đến 10% theo trọng lượng tinh bột được hydroxyetyl hóa.

Một phương án được ưu tiên của sáng chế là đề xuất dược phẩm, trong đó dung dịch đệm có chứa từ 0,5 đến 1,5% theo trọng lượng muối đơn trị, từ 0,01 đến 5% theo trọng lượng hợp chất chứa imidazol, từ 1 đến 5% theo trọng lượng thành phần cacbohydrat, từ 0,1 đến 2% theo trọng lượng thành phần protein, từ 0,01 đến 2% theo trọng lượng thành phần axit amin, và từ 1 đến 10% theo trọng lượng tinh bột được hydroxyetyl hóa, tốt hơn là muối đơn trị là natri clorua, thành phần cacbohydrat là sucroza, trehaloza, hoặc lactoza, thành phần protein là albumin tái tổ hợp của người, casiton, lactalbumin hydrolysat, hoặc gelatin, thành phần axit amin là arginin, glyxin, hoặc natri glutamat, và hợp chất chứa imidazole là L-carnosin hoặc N,N'-bis[2-(1H-imidazol-5yl)etyl]propandiamit.

Một phương án khác của sáng chế đề xuất dược phẩm để điều trị và/hoặc ngăn ngừa bệnh nhiễm khuẩn, trong đó bệnh nhiễm khuẩn này là do tác nhân gây bệnh được chọn từ nhóm bao gồm virus cúm A, virus cúm B, vi khuẩn lao, virus hecpet typ I và II, virus hợp bào đường hô hấp, virus gây suy giảm miễn dịch ở người, virus viêm gan C, ký sinh trùng sốt rét, Trichomonas, Chlamydia, Trypanosoma, Leishmania, hoặc chất gây bệnh “sốt lán sóng”. Theo một phương án được ưu tiên, sáng chế đề cập đến đối tượng là động vật có vú hoặc chim; cụ thể là, đối tượng là người.

Sáng chế cũng đề cập đến vaccin kháng lại bệnh nhiễm khuẩn, chứa một lượng có hiệu quả của virus cúm A nhược độc theo sáng chế hoặc vector virus cúm nhược độc theo sáng chế, và chất mang dược dụng.

Sáng chế cũng đề xuất vaccin kháng lại bệnh cúm, chứa một lượng có hiệu quả của vector virus cúm nhược độc theo sáng chế và chất mang dược dụng.

Cụ thể là, vaccin theo sáng chế chứa từ 6,5 đến 10,5 log EID₅₀/ml của vector virus cúm nhược độc và dung dịch đệm chứa từ 0 đến 1,5% theo trọng lượng muối đơn trị, từ 0 đến 5% theo trọng lượng hợp chất chứa imidazol, từ 0 đến 5% theo trọng lượng thành

phần cacbohydrat, từ 0 đến 2% theo trọng lượng thành phần protein, từ 0 đến 2% theo trọng lượng thành phần axit amin, và từ 0 đến 10% theo trọng lượng tinh bột được hydroxyetyl hóa.

Một phương án khác của sáng chế đề xuất vacxin trong đó dung dịch đệm có chứa từ 0,5 đến 1,5% theo trọng lượng muối đơn trị, từ 0,01 đến 5% theo trọng lượng hợp chất chứa imidazol, từ 1 đến 5% theo trọng lượng thành phần cacbohydrat, từ 0,1 đến 2% theo trọng lượng thành phần protein, từ 0,01 đến 2% theo trọng lượng thành phần axit amin, và từ 1 đến 10 % theo trọng lượng tinh bột được hydroxyetyl hóa. Theo một phương án được ưu tiên, muối đơn trị trong dung dịch đệm là natri clorua, thành phần cacbohydrat là sucroza, trehaloza, hoặc lactoza, thành phần protein là albumin tái tổ hợp của người, casiton, lactalbumin hydrolysat, hoặc gelatin, thành phần axit amin là arginin, glyxin, hoặc natri glutamat, và hợp chất chứa imidazol là L-carnosin hoặc N,N'-bis[2-(1H-imidazol-5yl)etyl]propandiamit.

Một phương án của sáng chế đề xuất vacxin kháng lại bệnh nhiễm khuẩn, trong đó bệnh nhiễm khuẩn là do tác nhân gây bệnh được chọn từ nhóm bao gồm virus cúm A, virus cúm B, vi khuẩn lao, virus hecpet typ I và II, virus hợp bào đường hô hấp, virus gây suy giảm miễn dịch ở người, virus viêm gan C, ký sinh trùng sốt rét, Trichomonas, Chlamydia, Trypanosoma, Leishmania, hoặc chất gây bệnh “sốt lán sóng”.

Sáng chế cũng đề cập đến việc sử dụng virus cúm A nhược độc theo sáng chế, vector virus cúm nhược độc theo sáng chế hoặc được phẩm theo sáng chế để điều trị và/hoặc ngăn ngừa bệnh nhiễm khuẩn ở bệnh nhân, cụ thể là để điều trị và/hoặc ngăn ngừa bệnh do chất gây bệnh được chọn từ nhóm bao gồm virus cúm A, virus cúm B, vi khuẩn lao, virus hecpet typ I và II, virus hợp bào đường hô hấp, virus gây suy giảm miễn dịch ở người, virus viêm gan C, ký sinh trùng sốt rét, Trichomonas, Chlamydia, Trypanosoma, Leishmania, hoặc chất gây bệnh “sốt lán sóng”. Theo một phương án được ưu tiên, sáng chế đề cập đến đối tượng là động vật có vú hoặc chim; cụ thể là, đối tượng là người.

Sáng chế cũng đề cập đến việc sử dụng vector virus cúm nhược độc hoặc được phẩm theo sáng chế để ngăn ngừa bệnh cúm ở đối tượng.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp điều trị và/hoặc ngăn ngừa bệnh nhiễm khuẩn ở đối tượng cần điều trị, phương pháp này bao gồm việc cho đối tượng sử dụng

một lượng hiệu quả virus cúm A nhược độc theo sáng chế, vector virus cúm nhược độc theo sáng chế, hoặc được phẩm theo sáng chế, tốt hơn là, đề cập đến phương pháp điều trị bệnh do chất gây bệnh được chọn từ nhóm bao gồm virus cúm A, virus cúm B, vi khuẩn lao, virus hecpet typ I và II, virus hợp bào đường hô hấp, virus gây suy giảm miễn dịch ở người, virus viêm gan C, ký sinh trùng sốt rét, *Trichomonas*, *Chlamydia*, *Trypanosoma*, *Leishmania*, hoặc chất gây bệnh “sốt lán sóng”. Theo một phương án được ưu tiên, sáng chế đề cập đến đối tượng là động vật có vú hoặc chim; cụ thể là, đối tượng là người.

Sáng chế cũng đề xuất được phẩm để điều trị bệnh ung thư ở đối tượng, chứa virus cúm A nhược độc theo sáng chế hoặc vector virus cúm A nhược độc theo sáng chế với lượng có hiệu quả, và chất mang được dụng.

Một phương án của sáng chế đề xuất được phẩm chứa từ 8,5 đến 10,5 log EID₅₀/ml virus cúm A nhược độc theo sáng chế hoặc vector virus cúm A nhược độc theo sáng chế và dung dịch đệm chứa từ 0 đến 1,5% theo trọng lượng muối đơn trị, từ 0 đến 5% theo trọng lượng hợp chất chứa imidazol, từ 0 đến 5% theo trọng lượng thành phần cacbohydrat, 0 đến 2% theo trọng lượng thành phần protein, từ 0 đến 2% theo trọng lượng thành phần axit amin, và từ 0 đến 10% theo trọng lượng tinh bột được hydroxyetylat hóa, trong đó theo một phương án được ưu tiên, sáng chế đề cập đến, dung dịch đệm có chứa từ 0,5 đến 1,5% theo trọng lượng muối đơn trị, từ 0,01 đến 5% theo trọng lượng hợp chất chứa imidazol, từ 1 đến 5% theo trọng lượng thành phần cacbohydrat, từ 0,1 đến 2% theo trọng lượng thành phần protein, từ 0,01 đến 2% theo trọng lượng thành phần axit amin, và từ 1 đến 10% theo trọng lượng tinh bột được hydroxyetylat hóa.

Một phương án khác của sáng chế đề xuất được phẩm, trong đó trong dung dịch đệm, muối đơn trị là natri clorua, thành phần cacbohydrat là tinh bột, thành phần protein là albumin người, thành phần axit amin là arginin, và hợp chất chứa imidazol là L-carnosin hoặc N,N'-bis[2-(1H-imidazol-5yl)etyl]propandiamit.

Sáng chế cũng đề cập đến việc sử dụng vector virus nhược độc theo sáng chế, vector virus cúm nhược độc theo sáng chế hoặc được phẩm theo sáng chế để điều trị bệnh ung thư ở đối tượng, cụ thể là, bệnh được chọn từ nhóm bao gồm ung thư kết trực tràng, ung thư tim mạch, ung thư tuyến tụy, ung thư mật, u thần kinh đệm, ung thư não, và ung thư da. Theo một phương án được ưu tiên, sáng chế đề cập đến đối tượng là người.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp điều trị bệnh ung thư đối tượng cần điều trị, bao gồm việc sử dụng một lượng hiệu quả của virus cúm A nhược độc theo sáng chế, vector virus cúm nhược độc theo sáng chế, hoặc được phẩm theo sáng chế, tốt hơn là, đề cập đến phương pháp điều trị bệnh ung thư được chọn từ nhóm bao gồm ung thư kết trực tràng, ung thư tim mạch, ung thư tuyến tụy, ung thư mật, u thần kinh đệm, ung thư não, and ung thư da.

Theo một phương án của sáng chế, việc sử dụng này là tiêm vào khối u, tiêm vào vị trí được tạo ra sau khi cắt bỏ khối u, hoặc tiêm tĩnh mạch.

Giải pháp kỹ thuật của sáng chế là tạo ra virus cúm chứa đoạn gen NS khả và vector cúm tương ứng có mức độ an toàn cao cho người và động vật, cụ thể là, vector có đặc điểm là không sinh sản virus có hoạt tính trong cơ thể sinh vật, có kiểu hình nhạy nhiệt và có thể sử dụng để ngăn ngừa và/hoặc điều trị bệnh nhiễm khuẩn. Một giải pháp kỹ thuật khác của sáng chế là tạo ra virus cúm có các đặc tính của đoạn gen NS khả, có đặc tính của vaccine cúm phổ quát khi sử dụng trong niêm mạc nếu không có tá dược. Ngoài ra, giải pháp kỹ thuật này có tiềm năng phát triển cao để virus cúm và vector cúm được tạo ra trong phôi gà 10 ngày tuổi. Một giải pháp kỹ thuật khác là tạo ra vector cúm có đặc tính của vaccine cúm phổ quát. Một giải pháp kỹ thuật khác là tạo ra virus cúm và vector cúm có hoạt tính diệt tế bào ung thư. Một giải pháp kỹ thuật khác nữa là tạo ra vaccine cúm có giá thành giảm, nhờ không sử dụng tá dược.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Fig.1 thể hiện nguyên tắc thiết kế vector cúm giảm độc lực. Fig.1A là cấu hình đoạn NS hệ gen của virus cúm A/PR/8/34 (H1N1). Fig.1B là cấu hình đoạn gen NS khả được biến đổi di truyền trong đó khung đọc NS1 được cắt và có thể được kéo dài bằng cách cài đoạn gen ngoại lai vào. Trình tự mã hóa protein Nep được thay thế bằng trình tự dị tương đồng thu được từ typ phụ virus cúm A khác.

Fig.2 là trình tự nucleotit của các đoạn NS hệ gen của virus typ đại và các ví dụ về hai cấu trúc gen khả. Fig.2A là đoạn NS của virus cúm A/PR/8/34 (H1N1). Fig.2B là đoạn NS khả của virus cúm A trong đó của khung đọc của protein NS1 được cắt, và trình tự Nep (được in đậm) thu được từ virus A/Singapore/1/57 (H2N2).

Fig.2C là đoạn NS khảm của virus cúm A, trong đó khung đọc của protein NS1 được cắt, và trình tự Nep (được đánh dấu in đậm) thu được từ virus A/Leningrad/134/47/57 (H2N2).

FIG.3 là trình tự axit amin của các protein được dịch mã của khung đọc của vector cúm NS1 khảm chứa Nep dị tương đồng từ virus A/Leningrad/134/47/57 (H2N2).

Fig.4 là số liệu thể hiện khả năng gây bệnh và kiểu hình ts-củavirus withgen Nep dị tương đồng. Fig.4A là số liệu sinh sản của virus ở nhiệt độ tối ưu 34°C và ở nhiệt độ tăng lên đến 39°C trong tế bào Vero. Fig.4B là số liệu sinh sản của virus trong phổi chuột vào ngày 2 sau khi nhiễm.

Fig.5 là biểu đồ thể hiện tác dụng bảo vệ khi gây miễn dịch đơn cho chuột bằng vector biểu hiện vùng dưới đơn vị HA2 từ khung đọc cNS1 ở đối chứng nhiễm chủng cúm gây bệnh dị tương đồng. Fig.5A là mức độ gây chết ở đối chứng bị nhiễm virus A/Mississippi/85/1 (H3N2), và Fig.5B là mức độ gây chết ở đối chứng bị nhiễm virus B/Lee/40.

FIG.6 là số liệu về tác dụng diệt tế bào ung thư của virus cúm tái tổ hợp đối với ung thư da gây ra ở chuột bằng cách đưa 1×10^6 tế bào B16 vào bàn chân sau. Liệu pháp này được thực hiện bằng cách đưa virus vào ngày 5 sau khi cấy u vào trong u. Fig.6A là cỡ chân trung bình vào ngày 20 sau khi cấy u và điều trị bốn lần bằng vector diệt tế bào ung thư; và Fig.6B thể hiện mức độ sống sót của chuột sau khi điều trị bốn lần bằng vector diệt tế bào ung thư.

Fig.7 là cấu trúc của vector cúm giảm độc lực. Có tám đoạn của hệ gen virus và các đặc tính riêng biệt của chúng.

Fig này thể hiện các đoạn PB2, PB1, PA, NP và M của hệ gen thu được từ virus A/PR/8/34 (H1N1); gen glycoprotein HA và NA bề mặt thu được từ virus giống A/California/7/09 (H1N1pdm); đoạn NS hệ gen có cấu trúc khảm mã hóa hai protein: 1) protein NS1 được cắt đến 124 gốc axit amin, được kéo dài bằng cách cài trình tự vùng đầu tận cùng N của protein cúm B HA2 và bằng cách cài epitop tế bào B bảo toàn của protein cúm A NP; và 2) protein Nep có trình tự thu được từ chủng cúm A dị tương đồng, typ phụ huyết thanh giống H2N2 A/Singapore/1/57.

Fig.8 là trình tự nucleotit của các đoạn hệ gen của vector vaccin: PB2, PB1, PA, NP, và M thu được từ virus A/PR/8/34 (H1N1); HA và NA từ virus giống

A/California/7/09 (H1N1pdm); và NS khảm (đoạn cài trong khung đọc NS1 được in đậm).

FIG. 9 là kết quả thể hiện đặc tính bảo vệ của vector vacxin sau khi sử dụng trong mũi cho chuột để kháng lại các biến thể khác nhau của virus cúm Avàvirus cúm B. Biểu đồ thể hiện mức độ tử vong (theo %) ở chuột đã được chủng vacxin sau khi đối chứng được gây nhiễm bằng các typ huyết thanh được chỉ định của virus cúm A hoặc virus cúm Bso với các động vật đối chứng. Vacxin được sử dụng một lần ký hiệu là - 1x hoặc hai lần - 2x.

Fig.10 là số liệu thể hiện các đặc tính bảo vệ của vector vacxin sau khi gây miễn dịch trong mũi cho chồn. Biểu đồ A thể hiện động lực học của giá trị trung bình của giao động nhiệt sau khi gây nhiễm đối chứng bằng virus A/St.Petersburg/224/2015 (H3N2) ở động vật được chủng vacxin và động vật đối chứng. Sơ đồ B là kết quả gây nhiễm của virus đối chứng từ dịch nước mũi của chồn vào các ngày 2, 4 và 6 sau khi gây nhiễm. Mức độ chuẩn độ được biểu hiện ở nồng độ trung bình của virus trong dịch nước mũi, ở mức 50% liều gây bệnh tế bào/ml sau khi chuẩn độ đối với tế bào MDCK. Các vacxin được sử dụng một lần ký hiệu là - 1x hoặc hai lần là - 2x.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến virus cúm A nhược độc được tạo ra bằng phương pháp biến đổi di truyền và có thể được sử dụng để điều trị và/hoặc ngăn ngừa bệnh nhiễm khuẩn, cũng như để điều trị bệnh ung thư.

Cụ thể là, sáng chế đề cập đến virus cúm A nhược độc tạo ra đáp ứng bảo vệ chéo virus cúm A và B, chứa đoạn NS khảm bao gồm khung đọc NS1 được cắt và trình tự dị tương đồng của gen Nep thu được từ typ phụ cúm A khác với typ phụ của virus cúm A nhược độc này. Do đó, typ phụ virus cúm A có trình tự mã hóa protein NS1 được cắt khác với typ phụ virus thu được trình tự protein Nep. Cụ thể là, một phương án của sáng chế đề cập đến virus cúm A nhược độc, trong đó khung đọc NS1 được cắt thu được từ typ phụ cúm H1N1, và trình tự dị tương đồng của gen Nep thu được từ typ phụ cúm của người và động vật từ typ phụ H2 đến H18.

Khung đọc được cắt mã hóa protein NS1 bao gồm từ 80 đến 130 gốc axit amin, tốt hơn là khung đọc được cắt này mã hóa protein NS1 gồm 124 gốc axit amin.

Sáng chế đặc biệt dựa trên thực tế là các tác giả đã tìm ra vấn đề của việc nhược độc không đầy đủ (thiếu độ nhạy cảm nhiệt độ và mức độ sinh sản cao trong phổi chuột) của vector cúm, cụ thể là vector NS1-124, có thể được giải quyết bằng cách sửa đổi sản phẩm ghép nối thứ hai của đoạn NS hệ gen của virus cúm - protein Nep (NS2). Sự thay thế của trình tự hệ gen Nep của virus cúm A, cụ thể là virus cúm A/PR/8/34 (H1N1), bằng trình tự Nep thu được từ chủng cúm dị tương đồng, ví dụ từ virus A/Singapore/1/57 (H2N2) hoặc A/Leningrad/134/47/57 (H2N2), dẫn đến xuất hiện kiểu hình nhạy nhiệt độ và nhược độc ở virus cúm A, cụ thể là virus A/PR/8/34 (H1N1). Dựa trên hiện tượng này, đoạn NS khảm của virus cúm được cấu trúc để mã hóa khung đọc được cắt, NS1-124, của virus A/PR/8/34 (H1N1) kết hợp với khung đọc protein Nep thu được từ typ phụ huyết thanh H2N2. Virus cúm lai tổ hợp dựa trên virus A/PR/8/34, bất kể nguồn gốc của các kháng nguyên bề mặt H1N1, H5N1 hoặc H1N1pdm, mang đoạn gen NS khảm không có khả năng sinh sản ở 39°C và trong phổi chuột (kiểu hình nhược độc), nhưng vẫn có thể sinh sản ở mức chuẩn độ cao trong phổi gà 10 ngày tuổi.

Sáng chế cũng đề cập đến vector virus cúm nhược độc biểu hiện kháng nguyên hoặc một đoạn của nó được chọn từ nhóm bao gồm các protein hoặc các đoạn của nó từ vi khuẩn, virus, và động vật nguyên sinh, trong đó vector là virus cúm A nhược độc theo sáng chế, trong đó khung đọc được cắt của gen protein NS1 được kéo dài bằng cách cài xen vào trình tự của ít nhất một gen chuyển mã hóa kháng nguyên hoặc một đoạn của nó từ vi khuẩn, virus, và động vật nguyên sinh. Nói chung, virus nhược độc có thể được cài xen vào gen chuyển mã hóa protein hoặc một đoạn của nó từ vi khuẩn bất kỳ, virus hoặc động vật nguyên sinh, gây bệnh hoặc không gây bệnh cho người và động vật, cụ thể là, protein này có thể được chọn từ nhóm bao gồm các protein hoặc các đoạn của nó từ virus cúm A, virus cúm B, vi khuẩn lao, *Brucella abortus*, virus herpes, virus hợp bào đường hô hấp, virus gây suy giảm miễn dịch ở người, virus viêm gan C, ký sinh trùng sốt rét, *Trichomonas*, *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Chlamydia*, chất gây bệnh “sốt lán sóng”, hoặc kết hợp các loại này. Cụ thể là, trình tự của đoạn cài vào có thể mã hóa đoạn HA của virus cúm, protein ESAT-6 của vi khuẩn lao, Ag85A, Ag85B, Mpt64, HspX, Mtb8.4 hoặc 10.4, hoặc các đoạn của nó. Trình tự hệ gen của vector nhược độc theo sáng chế có thể bao gồm trình tự mã hóa peptit tự cắt 2A trong số các trình tự mã hóa NS1-124 và ESAT6.

Kháng nguyên hoặc đoạn của nó được mã hóa bởi trình tự của đoạn cài có thể có kích thước bất kỳ chỉ bị hạn chế bởi khả năng của đoạn hệ gen “nhận” trình tự nucleotit mã hóa kháng nguyên hoặc đoạn của nó. Tốt hơn là, kích thước của kháng nguyên là từ 10 đến 400 axit amin. Ví dụ, đoạn cài có thể mã hóa đoạn protein HA trình diện vùng dưới đơn vị HA2 được chọn từ nhóm bao gồm 1 đến 185 axit amin của virus cúm A, 1 đến 186 axit amin của virus cúm B, 23 đến 185 axit amin của virus cúm A, hoặc 65 đến 222 axit amin của virus cúm A. Việc đánh số axit amin được thực hiện theo các vị trí của axit amin trong HA2 vùng dưới đơn vị của virus cúm là nguồn gốc của gen chuyển.

Một phương án cụ thể khác của vector virus cúm nhược độc theo sáng chế là vector trong đó đoạn cài xen vào mã hóa trình tự của vùng dưới đơn vị HA2 của virus A hoặc B có từ 1 đến 21 axit amin và trình tự của virus vùng protein NP cúm A NP có từ 243 đến 251 axit amin. Các biến thể của vector này, mặc dù chỉ có một đoạn cài ngắn xen vào, nhưng thể hiện hiệu quả bảo vệ đáng ngạc nhiên kháng lại virus cúm B và typ phụ kháng nguyên dị tương đồng của virus cúm A sau khi tiêm chủng một lần cho chuột, nghĩa là, chúng có đặc tính của vaccin cúm phổ quát.

Các tác giả sáng chế cũng thấy rằng các đoạn cài của các trình tự kháng nguyên lạ xen vào khung đọc NS1, ví dụ, sau vị trí axit amin 124, không gây ra tác dụng đáng kể đối với kiểu hình nhược độc của virus khả năng được tạo ra theo sáng chế. Do đó, các vector cúm khác nhau thu được có các đặc tính sinh sản yêu cầu và kiểu hình biểu hiện và chất đánh dấu kiểu gen nhược độc có các yêu cầu của vaccin cúm còn sống. Dù đoạn cài có bản chất nào, virus đều không gây hại cho các động vật thí nghiệm và đều có sự tương tự của các chất đánh dấu biểu hiện kiểu hình nhược độc – là sự có mặt của kiểu hình ts. Sự tương tự ở các chất đánh dấu di truyền về tính nhược độc được xác định bằng sự có mặt của khung đọc được cắt của protein NS1 và bằng sự có mặt của trình tự dị tương đồng của gen Nep thu được từ typ phụ cúm A khác. Phụ thuộc vào đoạn cài, các vector thu được thể hiện các đặc tính của vaccin cúm phổ quát, vaccin kháng lao, v.v...

Cụ thể là, sáng chế đề cập đến vector vaccin virus cúm thu được bằng phương pháp kỹ thuật di truyền, có thể được sử dụng để ngăn ngừa cúm do tất cả các chủng đã biết gây ra, bao gồm virus cúm A và B. Cụ thể là, sáng chế đề cập đến virus cúm A nhược độc tạo ra đáp ứng bảo vệ chéo virus cúm A và B, bao gồm đoạn NS khả năng chứa khung đọc được cắt của protein NS1 và trình tự gen dị tương đồng Nep thu được từ typ phụ H2N2 của

virut cúm A. Do đó, typ phụ virut cúm A có trình tự mã hóa protein NS1 được cắt khác với typ phụ virut thu được trình tự mã hóa protein Nep. Cụ thể là, trong vector vaccin, khung đọc NS1 được cắt thu được từ typ phụ cúm H1N1, và trình tự dị tương đồng Nep thu được từ typ phụ cúm H2N2.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến vector cúm giảm độc lực tạo ra đáp ứng bảo vệ chéo virut cúm A và B, bao gồm:

trình tự nucleotit của protein của gen PB2 thu được từ virut cúm A/PR/8/34 (H1N1) hoặc trình tự nucleotit có ít nhất 95% hoặc hơn (ví dụ, 96, 97, 98 hoặc 99%) mức độ tương đồng trình tự với trình tự nucleotit của protein của gen PB2;

trình tự nucleotit của gen protein PB1 thu được từ virut cúm A/PR/8/34 (H1N1) hoặc trình tự nucleotit có ít nhất 95% hoặc hơn (ví dụ, 96, 97, 98 hoặc 99%) mức độ tương đồng trình tự với trình tự nucleotit của gen protein PB1;

trình tự nucleotit của gen protein PA thu được từ virut cúm A/PR/8/34 (H1N1) hoặc trình tự nucleotit có ít nhất 95% hoặc hơn (ví dụ, 96, 97, 98 hoặc 99%) mức độ tương đồng trình tự với trình tự nucleotit của gen protein PA;

trình tự nucleotit của gen protein NP thu được từ virut cúm A/PR/8/34 (H1N1) hoặc trình tự nucleotit có ít nhất 95% hoặc hơn (ví dụ, 96, 97, 98 hoặc 99%) mức độ tương đồng trình tự với trình tự nucleotit của gen protein NP;

trình tự nucleotit của gen protein M thu được từ virut cúm A/PR/8/34 (H1N1) hoặc trình tự nucleotit có ít nhất 95% hoặc hơn (ví dụ, 96, 97, 98, hoặc 99%) mức độ tương đồng trình tự với trình tự nucleotit của gen protein M;

trình tự nucleotit của gen protein HA thu được từ virut cúm giống A/California/7/09 (H1N1pdm) hoặc trình tự nucleotit có ít nhất 95% hoặc lớn hơn (ví dụ, 96, 97, 98 hoặc 99%) mức độ tương đồng trình tự với trình tự nucleotit của gen protein HA;

trình tự nucleotit của gen protein NA thu được từ virut cúm giống A/California/7/09 (H1N1pdm) hoặc trình tự nucleotit có ít nhất 95% hoặc hơn (ví dụ, 96, 97, 98 hoặc 99%) mức độ tương đồng trình tự với trình tự nucleotit của gen protein NA; và

trình tự nucleotit của gen protein NS khả năng bao gồm:

khung đọc của protein NS1 thu được từ virut cúm A/PR/8/34 (H1N1), trong đó khung đọc này được cắt và mã hóa protein NS1 bao gồm 124 gốc axit amin,

và trình tự gen Nep thu được từ virus giống cúm A/Singapore/1/57 (H2N2) hoặc trình tự nucleotide có ít nhất 95% hoặc hơn (ví dụ, 96, 97, 98 hoặc 99%) mức độ tương đồng trình tự với trình tự nucleotide của Gen NS khảm;

trong đó khung đọc NS1 được cắt của protein này được kéo dài bằng cách cài xen vào trình tự nucleotide mã hóa peptit dung hợp của vùng dưới đơn vị HA2 của virus cúm B và trình tự nucleotide mã hóa epitop tế bào B bảo toàn của nucleoprotein virus cúm A (NP).

Khung đọc được cắt này mã hóa protein NS1 có 124 gốc axit amin được kéo dài bằng hai glyxin, một đoạn của vùng đầu tận cùng N của dưới đơn vị hemagglutinin HA2 của virus cúm B (23 gốc axit amin) và một đoạn của trình tự của epitop virus cúm A của tế bào B bảo toàn (7 gốc axit amin).

Các gen glycoprotein bề mặt của vector này thu được từ virus cúm A/California/7/09 (H1N1pdm). Các gen của các protein nội sinh PB2, PB1, PA, NP và M thu được từ virus cúm A/PR/8/34 (H1N1). Do đó, vector cúm theo sáng chế là cấu trúc gen phức hợp bao gồm các trình tự gen của các chủng cúm khác nhau: 1) gen mã hóa PB2, PB1, PA, NP, và M thu được từ virus A/PR/8/34 (H1N1) (PB2 (Số đăng ký trong ngân hàng gen: AB671295), PB1 (Số đăng ký trong ngân hàng gen: CY033583), PA (Số đăng ký trong ngân hàng gen: AF389117), NP (Số đăng ký trong ngân hàng gen: AF389119), M (Số đăng ký trong ngân hàng gen: AF389121)), 2) gen mã hóa HA và NA thu được từ virus giống A/California/7/09 H1N1pdm (HA (GenBank: KM408964.1) và (NA GenBank: KM408965.1)), 3) gen NS là khảm, trong đó khung đọc của protein NS của virus A/PR/8/34 (H1N1) được cắt còn 124 gốc axit amin và được kéo dài bằng cách cài xen vào trình tự mã hóa peptit dung hợp của vùng dưới đơn vị HA2 của virus cúm B và trình tự mã hóa epitop tế bào B bảo toàn của nucleoprotein (NP) virus cúm A, và khung đọc protein NEP thu được từ typ phụ H2N2 của virus cúm.

Cụ thể là, sáng chế dựa trên thực tế là các tác giả sáng chế bất ngờ thấy rằng việc tiêm miễn dịch qua đường mũi cho chuột và chồn bằng vector có cấu trúc nói trên, không có tác dụng, sẽ bảo vệ được động vật kháng lại việc nhiễm chủ động không chỉ virus cúm A (H1N1) mà còn cả virus cúm A(H3N2) và virus cúm B. Do đó, vector vắc xin có đặc tính của vắc xin cúm phổ quát.

Thuật ngữ "vacxin phổ quát" trong ngữ cảnh của sáng chế có nghĩa là vacxin có khả năng bảo vệ kháng lại tất cả các biến thể đã biết và chưa biết của virus cúm. "Vacxin theo mùa" thông thường chỉ bảo vệ kháng lại các virus tương tự với các virus được đưa vào chế phẩm vacxin.

Thuật ngữ "vacxin màng nhầy đường ruột" có nghĩa là vacxin có thể được sử dụng trong các khoang của đường tiêu hóa và đường hô hấp và sử dụng cho các niêm mạc miệng và mũi, nghĩa là, sử dụng trong mũi, qua đường miệng hoặc qua đường dưới lưỡi.

Vector cúm dựa trên virus A/PR/8/34 mang đoạn gen NS khả năng không thể sinh sản chủ động ở 39°C và trong phổi chuột (kiểu hình nhược độc), nhưng vẫn sinh sản ở chuẩn độ cao trong phôi gà 10 ngày tuổi.

Sáng chế cũng đề cập đến vector virus cúm nhược độc có hoạt tính diệt tế bào ung thư, bao gồm virus cúm A nhược độc theo sáng chế, trong đó khung đọc được cắt của gen protein NS1 được kéo dài bằng cách cài xen vào trình tự của ít nhất một gen chuyển mã hóa kháng nguyên hoặc một đoạn của nó của vi khuẩn gây bệnh, virus, và động vật nguyên sinh. Kháng nguyên này có thể thu được từ vi khuẩn, virus hoặc động vật nguyên sinh bất kỳ gây bệnh cho động vật, cụ thể là kháng nguyên có thể được chọn từ nhóm bao gồm kháng nguyên của virus cúm A, virus cúm B, vi khuẩn lao, virus hecpet, virus hợp bào đường hô hấp, virus gây suy giảm miễn dịch ở người, virus viêm gan C, ký sinh trùng sốt rét, *Trichomonas*, *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Chlamydia*, hoặc các sự kết hợp của chúng. Cụ thể là, gen chuyển cài vào có thể mã hóa protein ESAT-6 của vi khuẩn lao, Ag85A, Ag85B, Mpt64, HspX, Mtb8.4 hoặc 10.4 hoặc các đoạn của nó; ngoài ra, khung đọc được cắt của gen protein NS1 có thể được kéo dài bằng đoạn cài của trình tự mã hóa protein ESAT-6 của vi khuẩn lao.

Kháng nguyên hoặc đoạn của nó mã hóa bởi trình tự của đoạn cài có thể có kích thước bất kỳ chỉ bị giới hạn bởi khả năng của đoạn gen NS trong việc "nhận" trình tự nucleotit mã hóa kháng nguyên hoặc đoạn của nó. Tốt hơn là, kích thước của kháng nguyên là từ 10 đến 400 axit amin.

Các tác giả sáng chế bất ngờ thấy rằng vector cúm giảm độc lực mang đoạn gen NS khả năng có hoạt tính diệt ung thư được tăng cường nhờ kết hợp với gen Nep dị tương đồng, với điều kiện là kháng nguyên gây bệnh, cụ thể là kháng nguyên vi khuẩn thu được từ khung đọc Protein NS1, được biểu hiện. Ví dụ, vector virus mã hóa protein Esat6 vi khuẩn

lao có thêm hoạt tính cao hơn các virus tái tổ hợp đã biết có Protein NS1 được cắt nhưng không có thêm đoạn cài. Không phụ thuộc vào bất cứ lý thuyết nào cũng có thể dự đoán được là khả năng miễn dịch kháng lao mạnh ở động vật có vú có vai trò trong việc tấn công miễn dịch của khối u bị nhiễm virus biểu hiện protein lao.

Sáng chế cũng đề cập đến được phẩm chứa một lượng hiệu quả của virus cúm A nhược độc theo sáng chế hoặc vector cúm giảm độc lực theo sáng chế và chất mang được dùng. Dược phẩm theo sáng chế có thể sử dụng để điều trị và/hoặc ngăn ngừa bệnh nhiễm khuẩn ở bệnh nhân, cụ thể là bệnh nhiễm khuẩn do yếu tố gây bệnh được chọn từ nhóm bao gồm virus cúm A, virus cúm B, vi khuẩn lao, virus hecpet typ I và II, virus hợp bào đường hô hấp, virus gây suy giảm miễn dịch ở người, virus viêm gan C, ký sinh trùng sốt rét, Trichomonas, Chlamydia, Trypanosoma hoặc Leishmania.

Ngoài ra, dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị các bệnh ung thư khác nhau; cụ thể là, bệnh ung thư có thể được chọn từ nhóm bao gồm ung thư kết trực tràng, ung thư tim mạch, ung thư tuyến tụy, ung thư mật, u thần kinh đệm, ung thư não và ung thư da.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được bào chế dưới dạng vacxin chứa một lượng hiệu quả của virus cúm A nhược độc theo sáng chế hoặc vector cúm giảm độc lực theo sáng chế và chất mang được dùng.

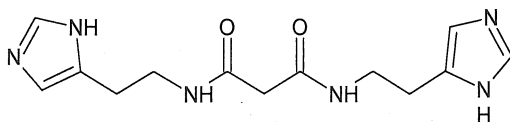
Thuật ngữ "đối tượng" hoặc "động vật" như được sử dụng ở đây có nghĩa là động vật có xương sống có khả năng nhiễm vi khuẩn, virus hoặc động vật nguyên sinh gây bệnh, bao gồm các loại chim (chim nước, gà, v.v...) và các đại diện của các loại động vật có vú khác nhau như chó, mèo, sói, chồn, gặm nhấm (chuột cống, chuột nhắt, v.v..), ngựa, bò, cừu, dê, lợn và linh trưởng. Theo một phương án của sáng chế, đối tượng là người.

Thuật ngữ "lượng hiệu quả" có nghĩa là lượng virus hoặc vector mà khi sử dụng cho đối tượng với liều đơn hoặc là một phần của chu trình điều trị, thì có hiệu quả để điều trị và/hoặc ngăn ngừa với tác dụng điều trị. Lượng này có thể thay đổi tùy vào tình trạng sức khỏe và điều kiện thể chất của bệnh nhân, tuổi, nhóm đối tượng cần điều trị, được phẩm, đánh giá tình trạng y tế của bác sĩ điều trị và các yếu tố khác. Lượng này có thể thay đổi trong một khoảng tương đối rộng mà chuyên gia trong lĩnh vực có thể xác định bằng các phương pháp tiêu chuẩn. Dược phẩm có thể chứa từ 6 đến 10,5 log EID₅₀/ml,

cụ thể hơn là từ 6,5 đến 10,5 log EID₅₀/ml, cụ thể là từ 6 đến 9,5 log EID₅₀/ml, cụ thể hơn nữa là từ 6,5 đến 8,5 log EID₅₀/ml virus cúm A khảm theo sáng chế của vector cúm theo sáng chế.

Thuật ngữ "chất mang được dụng", như được sử dụng ở đây, dùng để chỉ chất mang được sử dụng trong lĩnh vực, cụ thể là nước, nước muối sinh lý, dung dịch đệm và các chất tương tự. Theo một phương án, chất mang được dụng là dung dịch đệm chứa từ 0 đến 1,5% theo trọng lượng muối đơn trị, từ 0 đến 5% theo trọng lượng hợp chất chứa imidazol, từ 0 đến 5% theo trọng lượng thành phần cacbohydrat, từ 0 đến 2% theo trọng lượng thành phần protein, từ 0 đến 2% theo trọng lượng thành phần axit amin và từ 0 đến 10% theo trọng lượng tinh bột hydroxyetyl, tốt hơn là dung dịch đệm này chứa từ 0,5 đến 1,5% theo trọng lượng muối đơn trị, từ 0,01 đến 5% theo trọng lượng hợp chất imidazol, từ 1 đến 5% theo trọng lượng thành phần cacbohydrat, từ 0,1 đến 2% theo trọng lượng thành phần protein, từ 0,01 đến 2% theo trọng lượng thành phần axit amin và từ 1 đến 10% theo trọng lượng của tinh bột hydroxyetyl, tốt nhất là muối đơn trị là natri clorua, thành phần cacbohydrat là sucroza, trehaloz hoặc lactoza, thành phần protein là albumin người, casiton, lactalbumin hydrolyzat hoặc gelatin, thành phần axit amin là arginin, glyxin hoặc natri glutamat.

Hợp chất chứa imidazol là L-carnosin hoặc N,N'-bis[2-(1H-imidazol-5-yl)etyl]-propandiamit có công thức:



Albumin người có thể là albumin tái tổ hợp hoặc albumin cho.

Sáng chế cũng đề cập đến việc sử dụng virus cúm A nhược độc, vector virus cúm nhược độc hoặc được phẩm theo sáng chế để điều trị và/hoặc ngăn ngừa bệnh nhiễm khuẩn ở bệnh nhân, cụ thể là bệnh nhiễm khuẩn do yếu tố gây bệnh gây ra được chọn từ nhóm bao gồm virus cúm A, virus cúm B, vi khuẩn lao, virus hecpet typ I và II, virus hợp bào đường hô hấp, virus gây suy giảm miễn dịch ở người, virus viêm gan C, ký sinh trùng sốt rét, Trichomonas, Chlamydia, Trypanosoma hoặc Leishmania.

Sáng chế cũng đề cập đến việc sử dụng vector cúm giảm độc lực hoặc được phẩm theo sáng chế để ngăn ngừa cúm.

Hơn nữa, sáng chế cũng đề cập đến phương pháp điều trị, bao gồm việc sử dụng cho đối tượng virus cúm A nhược độc, vector cúm giảm độc lực hoặc được phẩm theo sáng chế. Các phương pháp dự định để điều trị và/hoặc ngăn ngừa bệnh nhiễm khuẩn do virus, vi khuẩn hoặc động vật nguyên sinh gây bệnh, cụ thể là bệnh nhiễm khuẩn do yếu tố gây bệnh được chọn từ nhóm bao gồm virus cúm A, virus cúm B, vi khuẩn lao, virus hecpet typ I và II, virus hợp bào đường hô hấp, virus gây suy giảm miễn dịch ở người, virus viêm gan C, ký sinh trùng sốt rét, *Trichomonas*, *Chlamydia*, *Trypanosoma* hoặc *Leishmania*. Ngoài ra, các phương pháp dự định để điều trị các bệnh ung thư ở bệnh nhân, cụ thể là, bệnh ung thư được chọn từ nhóm bao gồm ung thư kết trực tràng, ung thư tim mạch, ung thư tuyến tụy, ung thư mật, u thần kinh đệm, ung thư não và ung thư da.

Việc sử dụng cho đối tượng có thể được thực hiện bằng các phương pháp tiêu chuẩn, cụ thể là đường trong niêm mạc, trong tĩnh mạch, qua đường miệng, đường dưới lưỡi, đường hô hấp hoặc trong mũi. Vector cúm hoặc được phẩm có thể được sử dụng cho đối tượng một, hai hoặc nhiều lần; được ưu tiên là sử dụng một lần.

Ngoài ra, trong trường hợp điều trị bệnh ung thư, có thể sử dụng bằng cách tiêm vào khối u, tiêm vào vị trí được tạo ra sau khi cắt bỏ khối u, hoặc tiêm tĩnh mạch.

Các ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế được minh họa theo các phương án dưới đây mà không làm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1

Tạo ra vector cúm với đoạn gen NS được biến đổi

Các virus tái tổ hợp được lắp ghép theo một vài bước. Trong bước đầu tiên, các bản sao của ADN bổ trợ (cDNA) của tám đoạn gen của virus cúm A/PR/8/34 (H1N1) được tổng hợp bằng cách sử dụng ngân hàng gen: pHbank-PR8-HA (Số đăng ký trong ngân hàng gen: EF467821.1), pHW-PR8-NA (Số đăng ký trong ngân hàng gen: AF389120.1), pHW-PR8-PB2 (Số đăng ký trong ngân hàng gen: AB671295), pHW-PR8-PB1 (Số đăng ký trong ngân hàng gen: CY033583), pHW-PR8-PA (Số đăng ký trong ngân hàng gen: AF389117), pHW-PR8-NP (Số đăng ký trong ngân hàng gen: AF389119), pHW-PR8-M (Số đăng ký trong ngân hàng gen: AF389121), pHW-PR8-NS (Số đăng ký trong ngân hàng gen: J02150.1)). Trong bước thứ hai, các trình tự đã được tổng hợp được tách dòng vào các vector dựa trên plasmit hai đích pHW2000 (Hoffmann

E, Neumann G, Kawaoka Y, Hobom G, Webster RG, A DNA from eight plasmids, Proc Natl Acad Sci USA. 2000; 97 (11): 6108-13). Vector plasmit này, nhờ sự có mặt của các đoạn gen khởi động Pol I và Pol II, đã tạo ra sự phiên mã nội bào đồng thời của virus và ARN thông tin tương ứng khi chuyển nhiễm vào tế bào động vật có vú.

Đã tạo ra dòng 7 plasmit mã hóa PB1, PB2, PA, HA, NA, NP, và M không biến đổi, và nhóm các biến thể của đoạn NS hệ gen có các biến đổi, các nguyên tắc biến đổi được nêu trong FIG.1.

Fig.1A là sơ đồ của đoạn NS hệ gen của virus cúm A/PR/8/34 (H1N1). Đoạn gen có chiều dài đầy đủ của ARN virus cực âm (vRNA) có chiều dài 230 nucleotit (nt). Sự phiên mã của đoạn NS bởi phức hệ polymerazavirus cúm dẫn đến việc hình thành hai typ ARN thông tin: 1. Phiên mã trực tiếp, là ARN thông tin của protein NS1 mã hóa protein NS1 có 230 gốc axit amin (aa), và ARN thông tin ghép của protein Nep mã hóa protein có 121 aa. Fig.1B là sơ đồ thể hiện đoạn gen NS khả năng biến đổi di truyền, trong đó khung đọc của protein NS1 bao gồm từ 398 nucleotit và có thể kéo dài bằng cách cài một trình tự ngoại lai được kết thúc bằng ba mã kết thúc. Trình tự mã hóa protein Nep được thay thế bằng trình tự dị tương đồng thu được từ typ phụ virus cúm A khác. Kết quả của sự biến đổi là, đoạn gen NS khả năng có chiều dài phụ thuộc vào chiều dài của đoạn cài của trình tự ngoại lai cài vào khung đọc NS1.

Trình tự nucleotit của virus cúm A/PR/8/34 (H1N1), bao gồm vùng mã hóa và các vùng không mã hóa đầu tận cùng 5'- và 3'- (trình tự số J02150 trong dữ liệu Ngân hàng Gen), được sử dụng làm cơ sở để phát triển cấu trúc khả năng của đoạn NS hệ gen. Dựa vào mục đích, các biến thể khác nhau của các cấu trúc khả năng của đoạn NS hệ gen sẽ được cấu trúc, với các đặc tính thông thường như sau: 1) thay thế trình tự mã hóa protein Nep của virus A/PR/8/34 (H1N1) bằng trình tự thu được từ typ phụ virus cúm H2N2 (các chủng: A/Singapore/1/57 và A/Leningrad/134/47/57) (Các FIG. 2B và 2C); 2) loại bỏ trình tự bao gồm 30 nucleotit (các vị trí nucleotit từ 499 đến 428) từ vùng mã hóa NS1, cho đến vị trí ghép của Nep; 3) giới hạn khung đọc của protein NS1 đến 124 gốc axit amin bằng cách cài đoạn cắt-xét có ba mã kết thúc bảo toàn (TGATAATAA) sau vị trí nucleotit 399 (Fig. 2A và Fig. 2B); 4) sự có mặt hoặc không có mặt của trình tự gen ngoại lai được cài vào khung đọc NS1 sau vị trí nucleotit 398, ngay trước cắt-xét mã kết thúc.

Fig.2A thể hiện trình tự SEQ ID NO:1 của đoạn NS của virus cúm A/PR/8/34 (H1N1), trong đó trình tự này có 30 nucleotit cần được loại bỏ để tạo ra các cấu trúc B và C được tô đậm và gạch chân. Trình tự của gen Nep được thay thế bằng đoạn tương tự dĩ tương đồng từ typ phụ virus cúm A được bôi đậm. Fig. 2B thể hiện trình tự của SEQ ID NO: 2 của đoạn NS tái tổ hợp củavirus cúm A trong đó của khung đọc của Protein NS1 được cắt đến 398 nt bằng đoạn cài bao gồm ba mã kết thúc bảo tồn (gạch chân), và trình tự Nep (in đậm) được mượn từ virus A/Singapore/1/57 (H2N2). Fig. 2C thể hiện trình tự SEQ ID NO: 3 của đoạn NS tái tổ hợp củavirus cúm A trong đó của khung đọc của protein NS1 được cắt đến 398 nucleotit bằng đoạn cài gồm ba mã kết thúc bảo toàn (gạch chân), và trình tự Nep (in đậm) được mượn từ virus A/Leningrad/134/47/57 (H2N2).

AGCAAAAGCAGGGTGACAAAGACATAATGGATCCAAACACTGTGTCA
 AGCTTTCAGGTAGATTGCTTTCTTTGGCATGTCCGCAAACGAGTTGCAGACCA
 AGAACTAGGTGATGCCCCATTCCTTGATCGGCTTCGCCGAGATCAGAAATCC
 CTAAGAGGAAGGGGCAGCACTCTTGGTCTGGACATCGAGACAGCCACACGTG
 CTGGAAAGCAGATAGTGGAGCGGATTCTGAAAGAAGAATCCGATGAGGCAC
 TTAATAATGACCATGGCCTCTGTACCTGCGTCGCGTTACCTAACCGACATGACT
 CTTGAGGAAATGTCAAGGGAATGGTCCATGCTCATACCCAAGCAGAAAGTGG
 CAGGCCCTCTTTGTATCAGAATGGACCAGGCGATCATGGATAAAAACATCAT
ACTGAAAGCGAACTTCAGTGTGATTTTTGACCGGCTGGGAGACTCTAATATTG
 CTAAGGGCTTTCACCGAAGAGGGAGCAATTGTTGGCGAAATTTACCATTTGC
 CTTCTCTTCCAGGACATACTGCTGAGGATGTCAAAAATGCAGTTGGAGTC
 CTCATCGGAGGACTTGAATGGAATGATAACACAGTTTCGAGTCTCTGAAA
 CTCTACAGAGATTCGCTTGGAGAAGCAGTAATGAGAATGGGAGACCTCC
 ACTCACTCCAAAACAGAAACGAGAAATGGCGGGAACAATTAGGTCAGAA
 GTTTGAAGAAATAAGATGGTTGATTGAAGAAGTGAGACACAACTGAAG
 GTAACAGAGAATAGTTTTGAGCAAATAACATTTATGCAAGCCTTACATCT
 ATTGCTTGAAGTGGAGCAAGAGATAAGAAGCTTTCTCATTTCAGCTTATTT
 AATAATAAAAAACACCCTTGTTTCTACT (SEQ ID NO:1)

AGCAAAAGCAGGGTGACAAAGACATAATGGATCCAAACACTGTGTCA
 AGCTTTCAGGTAGATTGCTTTCTTTGGCATGTCCGCAAACGAGTTGCAGACCA
 AGAACTAGGTGATGCCCCATTCCTTGATCGGCTTCGCCGAGATCAGAAATCC

CTAAGAGGAAGGGGCAGCACTCTTGGTCTGGACATCGAGACAGCCACACGTG
 CTGGAAAGCAGATAGTGGAGCGGATTCTGAAAGAAGAATCCGATGAGGCAC
 TTAATAATGACCATGGCCTCTGTACCTGCGTCGCGTTACCTAACCGACATGACT
 CTTGAGGAAATGTCAAGGGAATGGTCCATGCTCATACCCAAGCAGAAAGTGG
 CAGGCCCTCTTTGTATCAGAATGGACCAGGCGATCATGTGATAATAAAGTGT
 GATTTTTGACCGGCTGGAGACTCTAATATTGCTAAGGGCTTTCACCGAAGAG
 GGAGCAATTGTTGGCGAAATTTACCATTCGCTTCTCTTCCAGGACATACTA
 ATGAGGATGTCAAAAATGCAATTGGGGTCCTCATCGGAGGACTTGAATG
 GAATGATAACACAGTTCGAGTCTCTAAACTCTACAGAGATTTCGCTTGGT
 GAAACAGTAATGAGAATGGGAGACCTCCACTCACTCCAAAACAGAAACG
 GAAAATGGCGAGAACAATTAGGTCAAAAGTTCTGAAGAAATAAGATGGCT
 GATTGAAGAAGTGAGACACAAATTGAAGATAACAGAGAATAGTTTTGAG
 CAAATAACATTTATGCAAGCCTTACAGCTACTATTTGAAGTGGAACAAGA
 GATAAGAACTTTCTCGTTTCAGCTTATTTAATAATAAAAAACACCCTTGTT
 TCTACT (SEQIDNO:2)

AGCAAAAGCAGGGTGACAAAGACATAATGGATCCAAACACTGTGTCA
 AGCTTTCAGGTAGATTGCTTTCTTTGGCATGTCCGCAAACGAGTTGCAGACCA
 AGAACTAGGTGATGCCCCATTCCTTGATCGGCTTCGCCGAGATCAGAAATCC
 CTAAGAGGAAGGGGCAGCACTCTTGGTCTGGACATCGAGACAGCCACACGTG
 CTGGAAAGCAGATAGTGGAGCGGATTCTGAAAGAAGAATCCGATGAGGCAC
 TTAATAATGACCATGGCCTCTGTACCTGCGTCGCGTTACCTAACCGACATGACT
 CTTGAGGAAATGTCAAGGGAATGGTCCATGCTCATACCCAAGCAGAAAGTGG
 CAGGCCCTCTTTGTATCAGAATGGACCAGGCGATCATGTGATAATAAAGTGT
 GATTTTTGACCGGCTGGAGACTCTAATATTGCTAAGGGCTTTCACCGAAGAG
 GGAGCAATTGTTGGCGAAATTTACCATTCGCTTCTCTTCCAGGACATACTA
 ATGAGGATGTCAAAAATGCAATTGGGGTCCTCATCGGAGGACTTGAATG
 GAATGATAACACAGTTCGAGTCTCTAAACTCTACAGAGATTTCGCTTGGG
 GAAGCAGTAATGAGAATGGGAGACCTCCACTCACTCCAAAACAGAAACG
 GAAAATGGCGAGAACAATTAGGTCAAAAGTTCTGAAGAAATAAGATGGCT
 GATTGAAGAAGTGAGACACAAATTGAAGATAACAGAGAATAGTTTTGAG
 CAAATAACATTTATACAAGCCTTACAGCTACTATTTGAAGTGGAACAAGA

GATAAGAACTTTCTCGTTTCAGCTTATTTAATAATAAAAAACACCCTTGTT
TCTACT (SEQ ID NO:3)

Do đó, các đoạn gen NS khảm được cấu trúc, khi được phiên mã bởi phức hợp polymeraza của virus cúm, sẽ tạo ra hai loại ARN thông tin: 1) ARN thông tin NS1 được dịch mã ở dạng Protein NS1 được cắt còn 124 gốc axit amin và bị giới hạn bởi các mã kết thúc hoặc được kéo dài bởi đoạn cài có trình tự gen chuyển khác nguồn gốc, việc dịch mã này bị giới hạn bởi cắt-xét mã kết thúc; 2) ARN thông tin Nep di tương đồng thu được từ typ kháng nguyên phụ khác của virus cúm A. Các biến thể dịch mã của Protein NS1 tái tổ hợp có các đoạn cài được thể hiện trong FIG.3 và Bảng 1 dưới đây.

Bảng 1

Trình tự axit amin của các protein được dịch mã trong khung đọc NS1, các virus tái tổ hợp có Nep di tương đồng từ virus A/Leningrad/134/47/57 (H2N2)

Virut	Trình tự axit amin	Mô tả
NS124/Nep-Len	MDPNTVSSFQVDCFLWHVRKRVAD QELGDAPFLDRLRRDQKSLRGRGST LGLDIETATRAGKQIVERILKEESDE ALKMTMASVPASRYLTDMTLEEMS REWSMLIPKQKVAGPLCIRMDQAIM (SEQ ID NO:4)	Virut có khung đọc của Protein NS1, được cắt còn 124 aa, không có đoạn cài trình tự ngoại lai
NS124-HA2(A)-185	MDPNTVSSFQVDCFLWHVRKRVAD QELGDAPFLDRLRRDQKSLRGRGST LGLDIETATRAGKQIVERILKEESDE ALKMTMASVPASRYLTDMTLEEMS REWSMLIPKQKVAGPLCIRMDQAIM -GG- GLFGAIAGFIEGGWTGMIDGWYG YHH QNEQSGGYAADQKSTQNAINGITN KVNTVIEKMNIQFTAVGKEFNKL EKR MENLNKKVDDGFLDIWTYNA ELLV LLENERTLDFHDSNVKNLYE	Virut có khung đọc của Protein NS1, được cắt đến 124 aa, được kéo dài bởi trình tự dịch mã của dưới đơn vị virus cúm A HA2 (in đậm), từ 1 đến 185 aa

	KVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHK CDNECMESVRNGTYDYPKYSEES KLNREKVDGVKLESMGIYQ(SEQ ID NO:5)	
NS124-HA2(A)- 65-222	MDPNTVSSFQVDCFLWHVRKRVAD QELGDAPFLDRLRRDQKSLRGRGST LGLDIETATRAGKQIVERILKEESDE ALKMTMASVPASRYLTDMTLEEMS REWSMLIPKQKVAGPLCIRMDQAIM -GG- <u>AVGKEFNKLEKRMENLNKKVDD</u> <u>GFLDIWTYNAELLVLLNERTLDF</u> <u>HDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEI</u> <u>GNGCFEFYHKCDNECMESVRNGT</u> <u>YDYPKYSEESKLNREKVDGVKLE</u> <u>SMGIYQILAIYSTVASSLVLLVSLG</u> <u>AISFWMCNGLSLQCRICI(SEQIDN</u> <u>O:6)</u>	Virut có khung đọc của Protein NS1, được cắt đến 124 aa, được kéo dài bởi trình tự dịch mã của dưới đơn vị HA2 virut cúm A (in đậm), từ 65 đến 222 aa
NS124-HA2(A)- 23-185	MDPNTVSSFQVDCFLWHVRKRVAD QELGDAPFLDRLRRDQKSLRGRGST LGLDIETATRAGKQIVERILKEESDE ALKMTMASVPASRYLTDMTLEEMS REWSMLIPKQKVAGPLCIRMDQAIM -GG- GYHHQNEQSGYAADQKSTQNAI NGI TNKVNTVIEKMNIQFTAVGKEFN KLEKRMENLNKKVDDGFLDIWTY NAELLVLLNERTLDFHDSNVKNL YEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFY	Virut có khung đọc của Protein NS1, được cắt còn 124 aa, được kéo dài bởi trình tự dịch mã của dưới đơn vị HA2 virut cúm A (in đậm), từ 23 đến 185 aa

	HKCDNECMESVRNGTYDYPKYSE ESKLNREKVDGVKLESMGIYQ (SEQ ID NO:7)	
NS124-HA2(B)- 186	MDPNTVSSFQVDCFLWHVRKRVAD QELGDAPFLDRLRRDQKSLRGRGST LGLDIETATRAGKQIVERILKEESDE ALKMTMASVPASRYLTDMTLEEMS REWSMLIPKQKVAGPLCIRMDQAIM -GG- GFFGAIAGFLEGGWEGMIAGWH GYT SHGAHGVAVAADLKSTQEAINKIT KNLNSLSELEVKNLQRLSGAMNG LHDEILELDEKVDDLADTISSQIE LAVLLSNEGIINSEDEHLLALERKL KKMLGPSAVEIGNGCFETKHKCN QTCLDRIAAGTFNAGDFSLPTFD (SEQ ID NO:8)	Virut có khung đọc của protein NS1, được cắt còn 124 aa, được kéo dài bởi trình tự dịch mã dưới đơn vị HA2 của virus cúm B (in đậm), từ 1 đến 186 aa
NS124-Fus(A)- NP	MDPNTVSSFQVDCFLWHVRKRVAD QELGDAPFLDRLRRDQKSLRGRGST LGLDIETATRAGKQIVERILKEESDE ALKMTMASVPASRYLTDMTLEEMS REWSMLIPKQKVAGPLCIRMDQAIM -GG- GLFGAIAGFIEGGWTGMIDGW- GG-<u>RESRNP</u>GNA (SEQIDNO:9)	Virut có khung đọc của protein NS1, được cắt còn 124 aa, được kéo dài bởi trình tự dịch mã dưới đơn vị HA2 của virus cúm A (in đậm), từ 1 đến 186 aa, và có trình tự epitop tế bào B bảo toàn của virus protein NP cúm A. GG là đoạn cài glyxin tách biệt các thành phần của cấu trúc

NS124-Fus(B)- NP	MDPNTVSSFQVDCFLWHVRKRVAD QELGDAPFLDRLRRDQKSLRGRGST LGLDIETATRAGKQIVERILKEESDE ALKMTMASVPASRYLTDMTLEEMS REWSMLIPKQKVAGPLCIRMDQAIM -GG- GFFGAIAGFLEGGWEGMIAGW - GG-<u>RESRNP</u>GNA (SEQ ID NO:10)	Virut có khung đọc của protein NS1, được cắt còn 124 aa, được kéo dài bởi trình tự dịch mã của virut cúm B HA2 dưới đơn vị (in đậm), từ 1 đến 21 aa, và với trình tự của epitop tế bào B bảo toàn của NP protein virut cúm A. GG là đoạn glyxin cài vào tách biệt giữa các thành phần cấu trúc
NS124-Esat6	MDPNTVSSFQVDCFLWHVRKRVAD QELGDAPFLDRLRRDQKSLRGRGST LGLDIETATRAGKQIVERILKEESDE ALKMTMASVPASRYLTDMTLEEMS REWSMLIPKQKVAGPLCIRMDQAIM -GG- MTEQQWNFAGIEAAASAIQGNVT SIHSLLEDEGKQSLTKLAAAWGGS GSEAYQGVQQKWDATATELNNA LQNLARTISEAGQAMASTEAGVT GMFA (SEQIDNO:11)	Virut có khung đọc của Protein NS1, được cắt còn 124 aa, được kéo dài bởi trình tự dịch mã của protein Esat6 vi khuẩn lao (in đậm)
NS124-2A-Esat6	MDPNTVSSFQVDCFLWHVRKRVAD QELGDAPFLDRLRRDQKSLRGRGST LGLDIETATRAGKQIVERILKEESDE ALKMTMASVPASRYLTDMTLEEMS REWSMLIPKQKVAGPLCIRMDQAIM -GG- <u>NFDLLKLAGDVESNPGP-</u> MTEQQWNFAGIEAAASAIQGNVT	Virut có khung đọc của Protein NS1, được cắt còn 124 aa, được kéo dài bởi trình tự dịch mã của peptit 2A tự cắt (từ picorna virut) và bởi trình tự của protein vi

	SIHSLLEDEGKQSLTKLAAAWGGS GSEAYQGVQQKWDATATELNNA LQNLARTISEAGQAMASTEENVT GMFA (SEQ ID NO:12)	khuẩn lao Esat6
NS124-HSV-2ASY	MDPNTVSSFQVDCFLWHVRKRVAD QELGDAPFLDRLRRDQKSLRGRGST LGLDIETATRAGKQIVERILKEESDE ALKMTMASVPASRYLTDMTLEEMS REWSMLIPKQKVAGPLCIRMDQAIM -AAA-NLLTTPKFT-AAA- RMLGDVMAV-AAA-NLLTTPKFT- AAA-RMLGDVMAV(SEQ ID NO:13)	Virut có khung đọc của Protein NS1, được cắt còn 124 aa, được kéo dài bởi trình tự được dịch mã (in đậm) của epitop tế bào T của virut hecpet typ 1 và 2. Các đoạn cái epitop được thực hiện bằng cách lặp

Các virut tái tổ hợp được lắp ráp bằng cách chuyển nhiễm vào các tế bào VERO bảy plasmit mã hóa các đoạn không biến đổi di truyền hệ gen của virut cúm và một trong số các biến thể của đoạn gen NS khảm bằng phương pháp điện di AND (Cell Line Nucleofector® Kit V (Lonza)) theo hướng dẫn sử dụng. Sau khi chuyển nhiễm, các tế bào được nuôi cấy ở môi trường Optipro (Invitrogen) trong 96 giờ ở 34°C được bổ sung trypsin 1µg/ml để khẳng định việc cắt sau dịch mã của tiền chất hemagglutinin thành các dưới đơn vị HA1 và HA2. Dịch chứa virut thu được từ các tế bào Vero được sử dụng để gây nhiễm vào phôi gà 10 ngày tuổi (SPF). Các phôi được nuôi cấy trong 48 giờ ở 34°C, sau đó dịch túi niệu có chuẩn độ dương tính trong phản ứng haemagglutinin hóa được sử dụng để chuyển thứ cấp vào phôi gà. Dịch túi niệu cho lần gây nhiễm thứ hai được chia thành các phần bằng nhau và bảo quản ở -80°C. Nguyên liệu gây nhiễm thứ hai được sử dụng để kiểm soát cấu trúc gen của đoạn NS khảm và sự có mặt của gen chuyển bằng cách tạo ra sản phẩm RT-PCR và trình tự của nó. Ngoài ra, nguyên liệu chuyển nhiễm thứ hai được sử dụng để xác định các chất đánh dấu kiểu hình của các chủng virut tái tổ hợp và để xác định độ ổn định di truyền của gen chuyển trong 5 lần chuyển nhiễm ở phôi gà.

Ví dụ 2Xác định kiểu hình nhạy nhiệt và tính nhược độc của virus tái tổ hợp mang Nep di tương đồng

Tính nhạy nhiệt của virus được xác định bằng cách chuẩn độ so sánh hoạt tính gây nhiễm của virus ở tế bào Vero ở nhiệt độ tối ưu là 34°C và nhiệt độ nâng cao là 39°C, ở đĩa 96 lỗ. Các chuẩn độ virus được tính bằng phương pháp Reed-Muench sau khi nuôi cấy trong 96 giờ, chú ý đến sự tác động của tính độc tế bào trong các lỗ trên đĩa (Reed, LJ, Muench, H. (1938). "The A simple method of estimating fifty percent endpoints." The American Journal of Hygiene 27: 493-497.). FIG.4A thể hiện các chuẩn độ virus ở các nhiệt độ, thể hiện ở 50% mô có liều gây độc tế bào (Log TCD50/ml). Cả hai virus này mang Nep di tương đồng từ các chủng A/Singapore/1/57 (H2N2) hoặc A/Leningrad/134/47/57 (H2N2) thể hiện một cách bất ngờ mức độ giảm đáng kể trên 4 log ở chuẩn độ nhiễm virus ở 39°C, so với nhiệt độ tối ưu 34°C. Các chủng đối chứng – virus chủng đại A/PR/8/34 (H1N1), và virus tái tổ hợp NS124/Nep PR8 có Protein NS1 bị cắt và protein Nep tương đồng không có sự nhạy cảm với nhiệt, sao mã hiệu quả ở nhiệt độ cao. Do đó, sự thay thế Nep dẫn đến sự xuất hiện của kiểu hình ts ở virus.

Hơn nữa, việc gây nhiễm các virus này qua đường mũi ở chuột trong tình trạng gây mê với liều 6 log/chuột, virus-chất mang của gen di tương đồng Nep giảm khả năng nhân lên ở mô phổi ($p < 0,002$), so với virus chủng đại hoặc virus NS124/Nep PR8 có Nep tương đồng (FIG.4B). Chuẩn độ virus trong phổi được đánh giá vào thời điểm 2 ngày sau khi gây nhiễm các động vật bằng cách chuẩn độ các dịch đồng nhất phổi đã được phân loại trong các tế bào Vero. Chuẩn độ ở phổi được biểu hiện ở log TCD50/g mô phổi. Do đó, việc đưa đoạn gen NS khảm vào chủng cúm A/PR/8/34 (H1N1) sẽ làm nhược độc virus, thể hiện ở việc giảm mức độ nhân lên trong đường hô hấp dưới của động vật.

Ví dụ 3Xác định kiểu hình ts và mức độ nhược độc của các vector mang đoạn gen NS khảm và các đoạn cài khác nhau trong khung đọc của Protein NS1

Một tập hợp lớn các vector mã hóa các đoạn cài có bản chất khác nhau được tạo ra để xác định tác dụng của các đoạn cài có trình tự ngoại lai vào khung đọc của Protein NS1 đối với kiểu hình ts của virus chứa gen Nep khảm. Các virus có các đoạn cài được thể hiện trong FIG.3 được nghiên cứu. Kiểu hình ts được nghiên cứu bằng cách chuẩn độ

hoạt tính nhiễm virus ở nhiệt độ 34°C và 39°C trong phôi gà 10 ngày tuổi (ChE), bằng cách xác định hoạt tính vón cục của tế bào máu của dịch túi niệu được thu 48 giờ sau khi nuôi cấy. Chuẩn độ được tính bằng phương pháp Reed-Muench và biểu hiện ở log 50% liều nhiễm phôi (log EID₅₀/ml). Như thấy trên số liệu nêu trong bảng 2, tất cả các vectơ, ngược lại với virus chủng đại A/PR/8/34 (H1N1), giảm đáng kể khả năng nhân lên ở nhiệt độ cao và phù hợp với chất đánh dấu kiểu hình ts đối với các chủng khảm prototyp mà không có đoạn cài nhưng có Nep dị tương đồng.

Bảng 2

Virus/vector	Chế phẩm có đoạn NS*		Yieldin ChE (Log EID50/ml) at T:		Kiểu hình ts ***
	Chiều dài NS1 (aa)	Chủng gốc của Nep **	34°C	39°C	
A/PR/8/34	230	A/PR/8/34 (H1N1)	9,8	9.5	không
NS124/Nep- Len	124	Len	8,8	2.8	có
NS124/Nep- Sing	124	Sing	8,8	3.3	có
NS124- HA2(A)-185	124	Len	8,3	2.8	có
NS124- HA2(A)-65- 222	124	Len	8,5	3.0	có
NS124- HA2(A)-23- 185	124	Len	8,3	3,5	có
NS124- HA2(B)- 186	124	Len	8,8	3,5	có
NS124- Fus(A)-NP	124	Len	8,0	2,8	có
NS124-Fus(B)- NP	124	Len	8,5	2,5	có
NS124-Esat6	124	Len	9,5	3,8	có
NS124-2A- Esat6	124	Len	9,8	4,0	có
NS124-HSV- 2ASY	124	Len	8,0	2,5	có

Designation: *Chiều dài (gốc axit amin) của trình tự Protein NS1 trước khi cài;

Nguồn gốc của gen Nep từ một chủng: A/PR/8/34 (H1N1) hoặc A/Singapore/1/57(H2N2), hoặc A/Leningrad/134/47/57 (H2N2); *kiểu hình ts được coi là dương tính nếu sự khác biệt ở mức độ sinh trưởng của virus ở 34 và 39°C là trên 2 log

Để xác định tác dụng của đoạn cài đối với việc nhược độc (att) của các chủng vector đối với động vật, chuột được gây nhiễm qua đường mũi, có gây mê nhẹ, bằng dịch tụy chứa virus từ phôi gà được gây nhiễm virus hoặc vector nêu trong FIG.3. Dịch tụy được xác định sơ bộ bằng mức chuẩn độ virus gây nhiễm trong đó. Các mức chuẩn độ được biểu hiện ở log EID₅₀/ml. Chuột được gây nhiễm bằng 0,05 ml mỗi mẫu virus. Mỗi nhóm chuột gồm 8 động vật. Hoạt tính gây chết của virus được đánh giá trong 12 ngày. Đã thấy rằng, không giống như virus kiểu đại A/PR/8/34 (H1N1) gây ra 50% tác dụng gây chết bằng cách sử dụng nguyên liệu với mức chuẩn độ 3,2 log EID₅₀/ml, không có vector nào thể hiện 50% hoạt tính gây chết ở chuột ở liều gây nhiễm cao hơn 7,5 log. Do đó, tất cả các vector mang đoạn gen NS khảm, bất kể đoạn cài nào, đều giảm nhược độc mạnh đối với chuột (Bảng 3).

Bảng 3
Liều virus gây chết cho chuột

Virut/vector	Liều virus gây chết 50% (LD ₅₀ /ml)	Kiểu hình nhược độc*
A/PR/8/34	3,2	No
NS124/Nep-Len	>7,5	Yes
NS124/Nep-Sing	> 7,5	Yes
NS124-HA2(A)-185	> 7,5	Yes
NS124-HA2(A)-65-222	> 7,5	Yes
NS124-HA2(A)-23-185	> 7,5	Yes
NS124-HA2(B)-186	> 8,0	Yes
NS124-Fus(A)-NP	> 8,0	Yes
NS124-Fus(B)-NP	> 8,0	Yes
NS124-Esat6	> 7,5	Yes
NS124-2A-Esat6	> 7,5	Yes
NS124-HSV-2ASY	> 7,5	Yes

*kiểu hình nhược độc được xác định bằng việc không có tính gây chết với liều bảo vệ cao hơn 7,0 log EID₅₀/chuột.

Ví dụ 4

Đáp ứng bảo vệ đối với các chủng dị tương đồng của virus cúm A và Bỏ chuột gây nhiễm chất đối chứng

Hoạt tính bảo vệ đối với các kháng nguyên dị tương đồng của virus cúm được xác định bằng cách sử dụng các virus với kháng nguyên bề mặt từ virus A/PR/8/34 (H1N1) mang đoạn gen NS khảm với trình tự Nep thu được từ virus A/Leningrad/134/47/57 (H2N2). Các virus tái tổ hợp sau đây được sử dụng mã hóa vùng dưới đơn vị hemagglutinin HA2 trong khung đọc NS1: 1) vector NS124-HA2(A)-185 biểu hiện đoạn ectodomain có chiều dài đầy đủ 185 gốc axit amin của virus cúm A HA2 (FIG.3, SEQ ID NO: 5), 2) vector NS124-HA2(A)-185 biểu hiện ectodomain có chiều dài đầy đủ 186 gốc axit amin của virus cúm BHA2 (FIG.3, SEQ ID NO: 8) 3) vector NS124-Fus(A)-NP biểu hiện trình tự bao gồm 21 gốc axit amin đầu tận cùng N của HA2 (vùng dung hợp) kết hợp với trình tự epitop bảo toàn của tế bào B từ protein NP virus cúm A (FIG.3, SEQ ID NO: 9), và 4) virus NS124/Nep-Len có cat-xet mã kết thúc có mã kết thúc ở vị trí 399 của trình tự nucleotit của đoạn NS hệ gen, hạn chế dịch mã protein NS1 đến 124 gốc axit amin (FIG.3, SEQ ID NO: 4). Nhóm đối chứng bao gồm chuột được gây nhiễm bằng virus A/PR/8/34 (H1N1) chủng đại không được biến đổi di truyền hoặc chuột chỉ được tiêm dung dịch đệm photphat không chứa hoạt chất. Chuột được gây miễn dịch qua đường mũi bằng cách gây mê nhẹ, bằng liều virus đơn 6,5 log/chuột. Sau 28 ngày, các con chuột được gây nhiễm đối chứng bằng chủng cúm dị tương đồng gây bệnh cho chuột: A/Mississippi/85/1(H3N2) hoặc B/Lee/40 với các liều tương ứng lần lượt là 3-5 LD₅₀.

Như quan sát thấy trên FIG. 5A, việc gây nhiễm đối chứng chuột không được miễn dịch bằng virus (H3N2) dẫn đến gây tử vong 80% trường hợp. Trong khi đó, chuột được gây miễn dịch bằng các chế phẩm virus được bảo vệ hoàn toàn không tử vong do đã được gây miễn dịch bằng chủng virus cúm A dị tương đồng. Việc gây miễn dịch bằng virus chủng đại cũng dẫn đến mức độ bảo vệ đáng kể kháng lại các chủng dị tương đồng. Khi gây nhiễm đối chứng được thực hiện bằng cách sử dụng virus cúm B/Lee/40, việc gây miễn dịch chuột bằng virus chủng đại A/PR/8/34 (H1N1) cũng như chuột được gây

miễn dịch bằng dung dịch đậm photphat đều không bảo vệ động vật tránh khỏi tử vong (Fig.5B). Ngạc nhiên là, thấy rằng virus tái tổ hợp mang các đoạn cài trong khung đọc của Protein NS1 được bảo vệ kháng lại virus cúm B. Vec tơ NS124-Fus(A)-NP thể hiện mức bảo vệ tốt nhất. Do đó, khi gây miễn dịch liều đơn qua đường mũi cho chuột, các vectơ mang đoạn gen NS khả thể hiện khả năng của vaccin cúm phổ quát có hiệu quả kháng lại kháng nguyên dị tương đồng typ phụ của cả virus cúm A và virus cúm B.

Ví dụ 5

Sản xuất vectơ cúm có đoạn NS hệ gen được sửa đổi mã hóa trình các glycoprotein bề mặt của vùng HA2 virus cúm B và virus H1N1pdm

Virus tái tổ hợp được lắp ghép theo một số bước. Ở bước đầu tiên, các bản sao ADN bổ trợ (cDNA) gồm 5 đoạn hệ gen (PB2, PB1, PA, NP, M) của virus cúm A/PR/8/34 (H1N1) (PB2 (Số đăng ký trong ngân hàng gen: AB671295), PB1 (Số đăng ký trong ngân hàng gen: CY033583), PA (Số đăng ký trong ngân hàng gen: AF389117), NP (Số đăng ký trong ngân hàng gen: AF389119), M (Số đăng ký trong ngân hàng gen: AF389121)) và 2 đoạn hệ gen (HA, NA) của virus giống A/California/7/09 (HA (Số đăng ký trong ngân hàng gen: KM408964.1) và (NA Số đăng ký trong ngân hàng gen: KM408965.1)) được tạo ra và đoạn gen NS khả gồm các trình tự liên quan đến virus H1N1 (gen NS1), virus H2N2 (gen Nep) và các trình tự của hai peptit từ region HA2 virus cúm B và vùng NP virus cúm A được tổng hợp.

Ở bước thứ hai, các trình tự tổng hợp được tách dòng vào vectơ dựa trên plasmit hai đích pHW2000 (Hoffmann E, Neumann G, Kawaoka Y, Hobom G, Webster RG, A DNA from eight plasmids, Proc Natl Acad Sci USA. 2000; 97 (11):6108-13.). Vectơ plasmit này nhờ sự có mặt của các đoạn khởi đầu Pol I và Pol II, mang đến sự phiên mã nội bào đồng thời của virus và ARN thông tin tương ứng khi chuyển nhiễm vào tế bào động vật có vú. Fig.7 thể hiện sơ đồ gen của virus cúm. Fig.8 là trình tự nucleotit của tất cả tám đoạn hệ gen của vectơ vắc-xin.

Trình tự nucleotit của PB2 hệ gen

```
1 agcgaaagcagggtcaattatattcaatatggaaagaataaaagaactacgaaatctaagt
61 tcgcagtctcgacccgcgagatactcacaaaaaccaccgtggacatatggccataatc
121 aagaagtacacatcaggaagacaggagaagaaccagcacttaggatgaaatggatgatg
181 gcaatgaaatatccaattacagcagacaagaggataacggaaatgattcctgagagaaat
```

241 gagcaaggacaaactttatggagtaaaatgaatgatgccggatcagaccgagtgatggta
 301 tcacctctggctgtgacatggtggaataggaatggaccaataacaaatacagttcattat
 361 ccaaaaatctacaaaacttattttgaaagagtcgaaaggctaaagcatggaacctttggc
 421 cctgtccattttagaaaccaagtcaaaatacgtcggagagttgacataaatcttggtcat
 481 gcagatctcagtgccaaggaggcacaggatgtaatcatggaagttgtttccctaacgaa
 541 gtgggagccaggataactaacatcggaatcgcaactaacgataaccaaagagaagaaagaa
 601 gaactccaggattgcaaaatttctcctttgatggttgacatacatgttgagagagaactg
 661 gtccgcaaaacgagattcctcccagtggtggtggaacaagcagtggtacattgaagtg
 721 ttgcatttgactcaaggaacatgctgggaacagatgtatactccaggaggggaagtgagg
 781 aatgatgatgttgatcaaagcttgattattgctgctaggaacatagtgagaagagctgca
 841 gtatcagcagatccactagcatctttattggagatgtgccacagcacacagattggtgga
 901 attagatggtagacatccttaggcagaaccaacagaagagcaagccgtggatatatgc
 961 aaggctgcaatgggactgagaattagctcatccttcagttttggtggattcacatttaag
 1021 agaacaagcggatcatcagtcgaagagagaggaagaggtgcttacgggcaatcttcaaaca
 1081 ttgaagataagagtgcattgagggatatgaagagttcacaatggttgggagaagagcaaca
 1141 gccatactcagaaaagcaaccaggagattgattcagctgatagtgagtgggagagacgaa
 1201 cagtcgattgccgaagcaataattgtggccatggtattttcacaagaggattgtatgata
 1261 aaagcagtcagaggtgatctgaatttcgtcaatagggcgaaatcaacgattgaatcctatg
 1321 catcaacttttaagacattttcagaaggatgcgaaagtgccttttcaaaattggggagtt
 1381 gaacctatcgacaatgtgatgggaatgattgggatattgcccacatgactccaagcatc
 1441 gagatgtcaatgagaggagtgagaatcagcaaaatgggtgtagatgagtactccagcacg
 1501 gagagggtagtggtagcattgaccgtttttgagaatccgggaccaacgaggaaatgta
 1561 ctactgtctcccaggaggtcagtgaaacacagggaacagagaaactgacaataacttac
 1621 tcactgtcaatgatgtgggagattaatggtcctgaatcagtggttggtcaatacctatcaa
 1681 tggatcatcagaaactgggaaactgttaaaattcagtggtcccagaaccctacaatgcta
 1741 tacaataaaatggaattgaaccatttcagtccttttagtacctaaggccattagaggccaa
 1801 tacagtgggtttgtaagaactctgtccaacaaatgagggatgtgcttgggacatttgat
 1861 accgcacagataataaaacttcttcccttcgcagccgctccaccaaagcaaagtagaatg
 1921 cagttctctcatttactgtgaatgtgaggggatcaggaatgagaatacttgaaggggc
 1981 aattctcctgtattcaactataacaaggccacgaagagactcacagttctcgaaaggat
 2041 gctggcactttaactgaagaccagatgaaggcacagctggagtgagtgccgctgttctg

2101 aggggattcctcattctgggcaaagaagacaagagatatgggccagcactaagcatcaat
 2161 gaactgagcaaccttgcgaaaggagagaaggctaattgtgctaattgggcaaggagacgtg
 2221 gtgttgtaatgaaacggaaacgggactctagcatacttactgacagccagacagcgacc
 2281 aaaagaattcggtggccatcaattagtgtcgaatagtttaaaacgacctgtttctac
 2341 t (SEQ ID NO:14)

Trình tự nucleotit của PB1 hệ gen

1 atggatgtcaatccgaccttacttttcttaaaagtgccagcacaaaatgctataagcaca
 61 actttcccttatactggagaccctccttacagccatgggacaggaacaggatacaccatg
 121 gatactgtcaacaggacacatcagtactcagaaaagggaagatggacaacaaacaccgaa
 181 actggagcaccgcaactcaacccgattgatgggccactgccagaagacaatgaaccaagt
 241 ggttatgcccaaacagattgtgtattggaggcgatggctttccttgaggaatcccatcct
 301 ggtattttgaaaactcgtgtattgaaacgatggaggttgttcagcaaacacgagtagac
 361 aagctgacacaaggccgacagacctatgactggactctaaatagaaaccaacctgctgca
 421 acagcattggccaacacaatagaagtgttcagatcaaattggcctcacggccaatgagtct
 481 ggaaggctcatagacttccttaaggatgtaattggagtcaatgaacaaagaagaatgggg
 541 atcacaactcatttcagagaaagagacgggtgagagacaatatgactaagaaaatgata
 601 acacagagaacaatgggtaaaaagaagcagagattgaacaaaaggagtattctaattaga
 661 gcattgaccctgaacacaatgaccaaagatgctgagagaggggaagctaaaacgggagagca
 721 attgcaaccccagggatgcaataaggggtttgtatactttgttgagacactggcaagg
 781 agtatatgtgagaaactgaacaatcagggttgcagttggaggcaatgagaagaaagca
 841 aagttggcaaatgttgtaaggaagatgatgaccaattctcaggacaccgaactttcttc
 901 accatcactggagataacaccaaattggaacgaaaatcagaatcctcggtatgttttggcc
 961 atgatcacatatatgaccagaaatcagcccgaatggttcagaaatgttctaagtattgct
 1021 ccaataatgttctcaaacaaaatggcgagactgggaaaagggtatatgtttgagagcaag
 1081 agtatgaaacttagaactcaaatacctgcagaaatgctagcaagcatcgatttgaaatat
 1141 ttcaatgattcaacaagaaagaagattgaaaaaatccgaccgctcttaatagaggggact
 1201 gcatcattgagccctggaatgatgatggcatgttcaatatgttaagcactgtattaggc
 1261 gtctccatcctgaatcttgacaaaagagatacaccaagactacttactggtgggatggt
 1321 ctcaatcctctgacgattttgctctgattgtgaatgcaccaatcatgaagggtattcaa
 1381 gccggagtgcagaggttttatcgaacctgtaagctacttggaatcaatatgagcaagaaa
 1441 aagtcttacataaacagaacaggtacattgaattcacaagtttttctatcgttatggg

1501 ttgttgccaatttcagcatggagcttcccagttttggggtgtctgggatcaacgagtca
 1561 gcggacatgagtattggagttactgtcatcaaaaacaatatgataaacaatgatcttgg
 1621 ccagcaacagctcaaattggcccttcagttgttcatcaaagattacaggtacacgtaccga
 1681 tgccatagaggtgacacacaaatacaaaacccgaagatcatttgaaataaagaaactgtgg
 1741 gagcaaaccggttccaaagctggactgctggtctccgacggaggcccaaatttatacaac
 1801 attagaaatctccacattcctgaagtctgcctaaaatgggaattgatggatgaggattac
 1861 caggggctgttatgcaaccactgaaccatttgcagccataaagaaattgaatcaatg
 1921 aacaatgcagtgatgatgccagcacatggtccagccaaaaacatggagtatgatgctgtt
 1981 gcaacaacacactcctggatcccaaaaagaaatcgatccatcttgaatacaagtcaaaga
 2041 ggagtacttgaggatgaacaaatgtaccaaaaggtgctgcaatttattgaaaaattcttc
 2101 cccagcagttcatacagaagaccagtcgggatatccagtatggtggaggctatggtttcc
 2161 agagcccgaattgatgcacggattgatttgaatctggaaggataaagaaagaagagttc
 2221 actgagatcatgaagatctgttccaccattgaagagctcagacggcaaaaatagtgaatt
 2281 tagcttgt (SEQ ID NO:15)

Trình tự nucleotit của PA hệ gen

1 agcgaaagcaggtactgatccaaaatggaagattttgtgcgacaatgcttcaatccgatg
 61 attgtcgagcttgcggaaaaacaatgaaagagtatggggaggacctgaaaatcgaaaca
 121 aacaaatttgcagcaatatgcactcacttgggaagtatgcttcatgtattcagattttcac
 181 ttcatcaatgagcaaggcgagtcaataatcgtagaacttggtgatccaaatgcacttttg
 241 aagcacagatttgaaataatcgagggaagagatcgacaaatggcctggacagtagtaaac
 301 agtatttgcaacactacagggctgagaaacaaagtttctaccagatttgatgattac
 361 aaggagaatagattcatcgaaattggagtaacaaggagagaagttcacatatactatctg
 421 gaaaaggccaataaaattaaatctgagaaaacacacatccacattttctcgttactggg
 481 gaagaaatggccacaaaggcagactacactctcgatgaagaaagcagggttaggatcaaa
 541 accagactattcaccataagacaagaaatggccagcagaggcctctgggattcctttcgt
 601 cagtccgagagaggagaagagacaattgaagaaaggtttgaaatcacaggaacaatgcgc
 661 aagcttgccgaccaaagtctcccgccgaacttctccagccttgaaaattttagagcctat
 721 gtggatggattcgaaccgaacggctacattgagggcaagctgtctcaaatgtccaaagaa
 781 gtaaatgctagaattgaacctttttgaaaacaacaccacgaccacttagacttccgaat
 841 gggcctccctgttctcagcgggtccaaattcctgctgatggatgccttaaaattaagcatt
 901 gaggaccaagtcatgaaggagagggaataaccgctatatgatgcaatcaaatgcatgaga

961 acattctttggatggaaggaaccaatgttgtaaaccacacgaaaagggaataaatcca
 1021 aattatcttctgtcatggaagcaagtactggcagaactgcaggacattgagaatgaggag
 1081 aaaattccaaagactaaaaatgaagaaaacaagtcagctaaagtgggcacttggtgag
 1141 aacatggcaccagaaaaggtagactttgacgactgtaaagatgtaggtgattgaagcaa
 1201 tatgatagtgtgaaccagaattgaggtcgctagcaagttggattcagaatgagtttaac
 1261 aaggcatgcgaactgacagattcaagctggatagagctcgatgagattggagaagatgtg
 1321 gctccaattgaacacattgcaagcatgagaaggaattatttcacatcagagggtgtctcac
 1381 tgcagagccacagaatacataatgaaggggtgtacatcaatactgccttgcttaatgca
 1441 tcttgtgcagcaatggatgattccaattaattccaatgataagcaagtgtagaactaag
 1501 gagggaaggcgaaagaccaactgtatggtttcatcataaaaggaagatcccacttaagg
 1561 aatgacaccgacgtggtaaacctttgtgagcatggagttttctctactgaccaagactt
 1621 gaaccacataaatgggagaagtactgtgttcttgagataggagatatgcttataagaagt
 1681 gccataggccaggtttcaaggcccatgttcttgatgtgagaacaaatggaacctcaaaa
 1741 attaaaatgaaatggggaatggagatgaggcgttgcctcctccagtcacttcaacaaatt
 1801 gagagtatgattgaagctgagtcctctgtcaaagagaaagacatgaccaaagagttcttt
 1861 gagaacaaatcagaaacatggccattggagagtcccccaggagtgaggaaagttcc
 1921 attgggaaggtctgcaggactttattagcaaagtcggtattcaacagcttgatgcatct
 1981 ccacaactagaaggattttcagctgaatcaagaaaactgcttcttatcggtcaggctctt
 2041 agggacaacctgaacctgggacctttgatcttggggggctatatgaagcaattgaggag
 2101 tgcctgattaatgatccctgggttttgcttaatgcttcttggtcaactccttccttaca
 2161 catgcattgagttagttgtggcagtgctactattgctatccatactgtccaaaaaagta
 2221 ccttgtttct act (SEQ ID NO:16)

Trình tự nucleotit của NP hệ gen

1 agcgaaagca ggtagatatt gaaagatgag tcttctaacc gaggtcgaaa cgtacgtact
 61 ctctatcatc cegtcaggcc cctcaaagc cgagatcgca cagagacttg aagatgtctt
 121 tgcagggaag aacactgac ttgaggttct catggaatgg ctaaagacaa gaccaatcct
 181 gtcacctctg actaaggga ttttaggatt tgtgttcacg ctcaccgtgc ccagtgagcg
 241 aggactgcag cgtagacgct ttgtccaaaa tgcccttaat gggaacgggg atccaaataa
 301 catggacaaa gcagttaaac tgtataggaa gctcaagagg gagataacat tccatggggc
 361 caaagaaatc tactcagtt attctgctgg tgcactgcc agttgtatgg gcctcatata
 421 caacaggatg ggggctgtga ccactgaagt ggcatttggc ctggtatgtg caacctgtga

481 acagattgct gactcccagc atcggtctca taggcaaatg gtgacaacaa ccaatccact
 541 aatcagacat gagaacagaa tggttttagc cagcactaca gctaaggcta tggagcaaat
 601 ggctggatcg agtgagcaag cagcagaggc catggagggt gctagtcagg ctagacaaat
 661 ggtgcaagcg atgagaacca ttgggactca tcctagctcc agtgctggtc tgaanaatga
 721 tcttcttgaa aatttgcagg cctatcagaa acgaatgggg gtgcagatgc aacgggtcaa
 781 gtgatcctct cgctattgcc gcaaatatca ttgggatctt gcacttgaca ttgtggattc
 841 ttgatcgtct tttttcaaa tgcatttacc gtcgctttaa atacggactg aaaggagggc
 901 cttctacgga aggagtgcc aagtctatga gggaagaata tcgaaaggaa cagcagagt
 961 ctgtggatgc tgacgatggt cattttgtca gcatagagct ggagtaaaaa actaccttgt
 1021 ttctact (SEQ ID NO:17)

Trình tự nucleotit của M hệ gen

1 agcgaaagcaggtagatattgaaagatgagtccttaaccgaggtcgaaacgtactact
 61 ctctatcatcccgtagggccccctcaaagccgagatcgacacagagactgaagatgtctt
 121 tgcagggaagaacactgatcttgagggttctcatggaatggctaaagacaagaccaatcct
 181 gtcacctctgactaaggggattttaggatttgtgttcacgctcaccgtgccagtgagcg
 241 aggactgcagcgtagacgctttgtccaaaatgcccttaatgggaacggggatccaaataa
 301 catggacaaagcagttaaactgtataggaagctcaagaggagataacattccatggggc
 361 caaagaaatctcactcagttattctgctgggtgcacttgccagttgtatgggcctcatata
 421 caacaggatgggggctgtgaccactgaagtggcatttggcctggtatgtgcaacctgtga
 481 acagattgctgactcccagcatcggtctcataggcaaatggtgacaacaaccaatccact
 541 aatcagacatgagaacagaatggttttagccagcactacagctaaggctatggagcaaat
 601 ggctggatcgagtgagcaagcagcagaggccatggagggtgctagtcaggctagacaaat
 661 ggtgcaagcgatgagaaccattgggactcatcctagctccagtgtggtctgaaaaatga
 721 tcttcttgaaaatttgcaggcctatcagaaacgaatgggggtgcagatgcaacgggtcaa
 781 gtgatcctctcgctattgccgcaaatatcattgggatcttgcacttgacattgtggattc
 841 ttgatcgtcttttttcaaattgcatttaccgtcgctttaaatacggactgaaaggagggc
 901 cttctacggaaggagtgcgaagtctatgagggaagaatatcgaaaggaaacagcagagt
 961 ctgtggatgctgacgatggtcattttgtcagcatagagctggagtaaaaaactaccttgt
 1021 ttctact (SEQ ID NO:18)

Trình tự nucleotit của HA hệ gen

1 atgaaggcaatactagtagttctgctatatacatttgaaccgcaaatgcagacacatta

61 tgtatagggttatcatgcaaacaattcaacagacactgtagacacagtactagaaaagaat
 121 gtaacagtaacacactctgttaaccttctagaagacaagcataacgggaaactatgcaaa
 181 ctaagaggggtagccccattgcatttgggtaaatgtaacattgctggctggatcctggga
 241 aatccagagtgtgaatcactctccacagcaagttcatggctctacatttggaacatct
 301 agttcagacaatggaacgtgttaccaggagatttcatcaattatgaggagctaagagag
 361 caattgagctcagtgtcatcatttgaaagggttgagatattccccaaaacaagttcatgg
 421 cccaatcatgactcgaacaaagggtgaacggcagcatgtcctcacgctggagcaaaaagc
 481 ttctacaaaaatttaatatggctagttaaaaaaggaaattcatacccaaagctcagccaa
 541 tcctacattaatgataaagggaagaagtcctcgtgctgtggggcattcaccatccatct
 601 actactgctgaccaacaaagtctctatcagaatgcagatgcatatgtttttgtggggaca
 661 tcaagatacagcaagaagttcaagccggaaatagcaataagacccaaagtggggatcaa
 721 gaagggagaatgaactattactggacactagtagagccgggagacaaaataacattcgaa
 781 gcaactggaaatctagtggtagccagatatgcattcacaatggaaagaaatgctggatct
 841 ggtattatcatttcagatacaccagtccacgattgcaatacaactgtcagacacccgag
 901 ggtgctataaacaccagcctcccatttcagaatatacatccgatcacaattggaaaatgt
 961 ccaaagtatgtaaaaagcacaaaattgagactggccacaggattgaggaatgtcccgctc
 1021 attcaatctagaggcctattcggggccattgccggcttcattgaaggggggtggacaggg
 1081 atggtagatggatggtacggttatcccatcaaaatgagcaggggtcaggatatgcagcc
 1141 gacctgaagagcacacaaaatgccattgacaagattactaacaagtaaaactctgttatt
 1201 gaaaagatgaatacacagttcacagcagtggttaaagagttcaaccacctggaaaaaaga
 1261 atagagaatttaataaaaaagttgatgatggttctggacatttggaacttacaatgcc
 1321 gaactgttggttctattggaaaatgaaagaactttggactaccatgattcaaattgtgaag
 1381 aacttgatgaaaaggtaagaaaccagttaaaaacaatgccaaaggaaattggaaacggc
 1441 tgctttgaattttaccacaaatgcgataaacacgtgcatggaaagtgtcaaaaatgggact
 1501 tatgactacccaaaatactcagaggaagcaaaattaaacagagaaaaaatagatggggta
 1561 aagctggaatcaacaaggatttaccagattttggcgatctattcaactgtcgccagttca
 1621 ttggtgctggtagtctccctgggggcaatcagcttctggatgtgctctaattgggtctcta
 1681 cagtgtagaa tatgtattta a (SEQ ID NO: 19)

Trình tự nucleotit của NA hệ gen

1 atgaatccaa accaaaagat aataaccatt ggttcggctc gtatgacaat tggaatggct
 61 aacttaatat tacaaattgg aaacataatc tcaatatgga ttagccactc aattcaagtt

121 gggaatcaaa gtcagatcga aacatgcaat caaagcgtca ttacttatga aaacaacact
 181 tgggtaaatc agacatatgt taacatcagc aacaccaact ttgctgctgg gcagccagtg
 241 gtttccgtga aattagcggg caattcctct ctctgccctg ttagtggatg ggctatatac
 301 agtaaagaca acagtgtgaag agtcgggtcc aaggggggatg tgtttgtcat aagggaacca
 361 ttcatatcat gctccccctt ggaatgcaga accttctct tgactcaagg ggccttgcta
 421 aatgacaaac attccaatgg aaccattaaa gacaggagcc catatcgaac cttaatgagc
 481 tgtcctattg gtgaagtcc ctctccatac aactcaagat ttgagtcagt cgcttggtca
 541 gcaagtgcct gtcatgatgg catcaattgg ctaacaattg gaatttctgg cccagacagt
 601 ggggcagtgg ctgtgttaaa gtacaacggc ataataacag acactatcaa gagttggaga
 661 aacgatatat tgagaacaca agagtctgaa tgtgcatgtg taaatgggtc ttgctttacc
 721 ataatgaccg atggaccaag tgatggacag gcctcataca agatcttcag aatagaaaaa
 781 ggaaagatag tcaaatcagt cgaaatgaat gccctaatt atcactatga ggaatgctcc
 841 tgttatcctg attctagtga aatcacatgt gtgtgcaggg ataactggca tggctcgaat
 901 cgaccgtggg tgtctttcaa ccagaatctg gaatatacaga taggatacat atgcagtggg
 961 atttccggag acaatccacg ccctaattgat aagacaggca gttgtgggtcc agtatcgtct
 1021 aatggagcaa atggagtaaa aggattttca ttcaaatacg gcaatgggtg ttggataggg
 1081 agaactaaaa gcattagttc aagaaaagggt ttgagatga ttgggatcc aaatggatgg
 1141 actgggacag acaataactt ctcaataaag caagatatcg taggaataaa tgagtgggtca
 1201 ggatatagcg ggagttttgt tcagcatcca gaactaacag ggctggattg tataagacct
 1261 tgcttctggg ttgaactaat cagagggcga ccaaagaga acacaatctg gactagtggg
 1321 agcagcatat cctttgtgg tgtaaacagt gacactgtgg gttggtcttg gccagacggt
 1381 gctgagttgc cattacat tgacaagtaa (SEQ ID NO: 20)

trình tự nucleotit của đoạn gen NS khảm (đoạn cài được in đậm)

AGCAAAAGCAGGGTGACAAAGACATAATGGATCCAAACACTGTGTCA
 AGCTTTCAGGTAGATTGCTTTCTTTGGCATGTCCGCAAACGAGTTGCAGACCA
 AGAACTAGGTGATGCCCCATTCTTGATCGGCTTCGCCGAGATCAGAAATCC
 CTAAGAGGAAGGGGCAGCACTCTTGGTCTGGACATCGAGACAGCCACACGTG
 CTGGAAAGCAGATAGTGGAGCGGATTCTGAAAGAAGAATCCGATGAGGCAC
 TTAAAATGACCATGGCCTCTGTACCTGCGTCGCGTTACCTAACCGACATGACT
 CTTGAGGAAATGTCAAGGGAATGGTCCATGCTCATACCCAAGCAGAAAGTGG
 CAGGCCCTCTTTGTATCAGAATGGACCAGGCGATCATGGGAGGAGGTTTCT

TCGGAGCTATTGCTGGTTTCTTGGAAGGAGGATGGGAAGGAATGATTGC
 AGGTTGGGGAGGAAGAGAGAGCCGGAACCCAGGGAATGCTTGATAATA
 AGCGGCCCGCAGTGTGATTTTTGACCGGCTGGAGACTCTAATATTGCTAAGGG
 CTTTCACCGAAGAGGGAGCAATTGTTGGCGAAATTTACCATTCGCTTCTCTT
 CCAGGACATACTAATGAGGATGTCAAAAATGCAATTGGGGTCCTCATCGGAG
 GACTTGAATGGAATGATAACACAGTTCGAGTCTCTAAACTCTACAGAGATT
 CGCTTGGAGAAGCAGTAATGAGAATGGGAGACCTCCACTCACTCCAAAACAG
 AAACGGAAAATGGCGAGAACAATTAGGTCAAAAGTTCGAAGAAATAAGATG
 GCTGATTGAAGAAGTGAGACACAAATTGAAGATAACAGAGAATAGTTTTGA
 GCAAATAACATTTATACAAGCCTTACAGCTACTATTTGAAGTGGAACAAGAG
 ATAAGAACTTTCTCGTTTCAGCTTATTTAATAATAAAAAACACCCTTGTTTCT
 ACT(SEQ ID NO: 21)

Các virus tái tổ hợp được lắp ghép bằng cách chuyển nhiễm các tế bào VERO bằng tám các đoạn hệ gen không được biến đổi di truyền mã hóa plasmid của virus cúm, và đoạn gen NS khảm bằng phương pháp điện di ADN plasmid (Cell Line Nucleofector® Kit V (Lonza)) theo hướng dẫn sử dụng. Sau khi chuyển nhiễm, các tế bào được nuôi cấy trong môi trường Optipro (Invitrogen) trong 96 giờ ở 34°C bằng cách bổ sung trypsin 1 µg/ml để đảm bảo sự cắt sau dịch mã của tiền chất to hemagglutinin thành các dưới đơn vị HA1 và HA2. Dịch chứa virus thu được từ tế bào Vero được sử dụng để nhiễm vào phôi gà 10 ngày tuổi (SPF). Các phôi này được ủ trong 48 giờ ở 34°C, sau đó dịch túi niệu có chuẩn độ dương tính trong phản ứng haemagglutination được sử dụng cho việc nuôi cấy tiếp theo trong phôi gà. Dịch túi niệu của 7 lần cấy chuyển được tinh chế bằng hệ thống lọc tuần hoàn tiếp tuyến và đông cô để lưu trữ. Các động vật được gây miễn dịch sau khi hòa tan chất đông khô bằng nước cất với thể tích tương ứng.

Ví dụ 6

Đáp ứng bảo vệ với các chủng dị tương đồng của virus cúm A và B khi gây nhiễm đối chứng cho chuột

Khả năng bảo vệ đối với các thể biến dị kháng nguyên dị tương đồng của virus cúm được xác định bằng cách gây miễn dịch qua đường mũi bằng vector cúm ở 6,8 log EID₅₀/chuột với thể tích 50 µl trong khi gây mê nhẹ, một hoặc hai lần trong giai đoạn 3 tuần. Vào ngày hai một sau lần gây miễn dịch cuối cùng, các động vật được gây nhiễm

đối chứng bằng các chủng cúm dị tương đồng gây bệnh cho chuột: virus cúm tương đồng A/California/7/09 (H1N1pdm) hoặc dị tương đồng A/Aichi/2/68 (H3N2), A/Mississippi/85/1(H3N2) hoặc B/Lee/40 với liều tương ứng là 3-5 LD₅₀.

Như nhìn thấy trên FIG.9A, gây nhiễm đối chứng cho chuột không có miễn dịch bằng virus H1N1pdm dẫn đến gây tử vong 90% trường hợp. Tuy nhiên, chuột được gây miễn dịch một hoặc hai lần bằng chế phẩm virus đã được bảo vệ tránh khỏi tử vong.

Như nhìn thấy trên FIG. 3B9B, gây nhiễm đối chứng cho chuột không có miễn dịch bằng virus A/Aichi/2/68 (H3N2) dẫn đến gây tử vong 100% trường hợp. Tuy nhiên, chuột được gây miễn dịch một hoặc hai lần bằng chế phẩm virus đã được bảo vệ tránh khỏi tử vong.

Như nhìn thấy trên FIG.9C, gây nhiễm đối chứng cho chuột không có miễn dịch bằng virus A/Mississippi/85/1(H3N2) dẫn đến gây tử vong 100% trường hợp. Tuy nhiên, chuột được gây miễn dịch một hoặc hai lần bằng chế phẩm virus đã được bảo vệ 100% tránh khỏi tử vong.

Như nhìn thấy trên FIG. 9D, gây nhiễm đối chứng cho chuột không có miễn dịch bằng virus cúm B/Lee/40 dẫn đến gây tử vong 100% trường hợp. Tuy nhiên, chuột được gây miễn dịch hai lần bằng chế phẩm virus đã được bảo vệ 60% so với đối chứng.

Do đó, vectơ cúm mang đoạn gen NS khả thể hiện các đặc tính của vacxin cúm phổ quát có hiệu quả kháng lại typ phụ kháng nguyên dị tương đồng của cả virus cúm A và virus cúm B.

Ví dụ 7

Đáp ứng bảo vệ đối với chủng cúm A (H3N2) dị tương đồng khi gây nhiễm đối chứng cho chồn

Chồn được tổ chức Y tế thế giới khuyến nghị là động vật tối ưu để nghiên cứu hiệu quả của vacxin cúm và được chất. Khả năng bảo vệ kháng lại các biến thể của kháng nguyên dị tương đồng của virus cúm được xác định bằng cách gây miễn dịch cho chồn (9 con chồn trong một nhóm) bằng vectơ cúm được tạo ra trong Ví dụ 5 với liều 7,5 log EID₅₀/chồn, được sử dụng qua đường mũi với thể tích 500µl khi gây mê nhẹ, một hoặc hai lần trong thời gian 3 tuần. Vào thời điểm 21 ngày sau lần gây miễn dịch cuối cùng, các động vật được gây nhiễm bằng virus gây bệnh cho chồn A/St.Petersburg/224/2015 (H3N2). Như thể hiện trên FIG.10A, việc gây nhiễm đối chứng không được miễn dịch

gây ra tăng nhiệt độ cơ thể vào ngày thứ hai sau khi gây nhiễm trong khi các động vật đã được chủng vaccin không có đáp ứng nhiệt độ.

Tác dụng của việc chủng vaccin đối với việc nhân lên của virus đối chứng trong đường hô hấp của chồn được nghiên cứu bằng cách sử dụng nước rửa mũi lấy từ các động vật vào ngày thứ 2, 4 và 6 để xác định nồng độ của virus gây nhiễm bằng cách chuẩn độ liều gây độc tế bào 50% trong môi trường tế bào MDCK. Như nhìn thấy trên FIG.10B, gây nhiễm đối chứng cho các con chồn không được miễn dịch dẫn đến sự nhân lên chủ động của virus mà không làm giảm đáng kể các mức chuẩn độ cho đến ngày thứ 6. Khi gây miễn dịch một lần cho chồn, có sự giảm đáng kể mức chuẩn độ virus vào ngày 4 và 6 sau khi gây miễn dịch. Sau khi gây miễn dịch hai lần, có sự giảm lớn, hơn 100 lần mức chuẩn độ virus ngay vào ngày thứ hai sau khi gây nhiễm cho động vật.

Do đó, thậm chí ngay khi chủng vaccin một lần cho chồn bằng vector cúm đã mang đến sự bảo vệ tối ưu không có các biểu hiện lâm sàng như phản ứng với nhiệt độ và loại trừ nhanh các chủng đối chứng dị tương đồng khỏi đường hô hấp. Việc gây miễn dịch lặp lại thúc đẩy quá trình thải loại virus.

Ví dụ 8

Tác dụng chống ung thư của vector cúm mã hóa protein Esat6 của Mycobacteria

Khả năng chống ung thư của vector cúm giảm độc lực mang đoạn gen NS khả năng gen Nep dị tương đồng được xác định bằng cách điều trị bằng virus gây ra ung thư da ở chuột được tạo ra bằng cách đưa 10^6 tế bào B16 trong thể tích 30 μ l vào vị trí dưới da chân sau bên phải. Mỗi nhóm có 10 động vật. Liệu pháp này được thực hiện vào ngày thứ 5 sau khi sử dụng các tế bào ung thư, bằng cách tiêm 30 μ l chế phẩm virus hoặc dung dịch đệm photphat trực tiếp vào vùng u phát triển. Việc tiêm này được thực hiện 4 lần vào mỗi ngày thứ ba, sau đó mức độ tăng thể tích của chân được tiêm và tỉ lệ sống sót của động vật được đánh giá trong 85 ngày. Các động vật có u to tới kích thước 2000mm³ được gây chết nhẹ nhàng vì lý do đạo đức và được coi là đã chết.

Bệnh ung thư da được điều trị bằng vector biểu hiện kháng nguyên Mycobacteria Esat6 trong thiết kế cung cấp cho việc cắt sau dịch mã qua trung gian 2A của protein Esat-6 từ vùng đầu tận cùng C của Protein NS1 được cắt của virus cúm NS124-2A-Esat6 (FIG.3, SEQ ID NO:12). Chất điều trị đối chứng là virus NS124/Nep-Len không có các đoạn cài của protein Mycobacteria.

FIG. 6A thể hiện các kết quả đo thể tích bàn chân vào ngày 19 sau khi sử dụng các tế bào u. Ngạc nhiên phát hiện ra là thể tích bàn chân trung bình nhỏ nhất là ở con chuột nhận liệu pháp điều trị bằng vector biểu hiện protein Esat6. Kết quả này cho thấy sự tương ứng với khả năng sống sót của chuột trong một khoảng thời gian quan sát dài 85 ngày (FIG.6B). Ba trong số mười động vật thuộc nhóm NS124-2A-Esat6 được thấy là không có sự phát triển của khối u, trong khi đó các động vật thuộc các nhóm khác chết vào ngày 60. Do đó, các số liệu thu được thể hiện ưu điểm của vector trị ung thư mã hóa kháng nguyên vi khuẩn.

Ví dụ 10

Tạo ra vaccin dựa trên virus cúm để sử dụng qua đường mũi

Vaccin chứa vector cúm được tạo ra trong ví dụ 1 hoặc ví dụ 5 với lượng từ 6,5 đến 8,5 log 50% liều nhiễm vào phôi thai (EID50)/ml, và dung dịch đệm được làm ổn định chứa dung dịch clorua 0,9% theo trọng lượng, 0,5% theo trọng lượng L-carnosin, 2,5% theo trọng lượng sucroza, 1% theo trọng lượng albumin tái tổ hợp, 1% theo trọng lượng L-arginin và 3% theo trọng lượng tinh bột hydroxyetyl 130/0,4 (trọng lượng phân tử là 130 kDa, mức độ thay thế phân tử là 0,4).

Ví dụ 11

Tạo ra vaccin dựa trên virus cúm để gây miễn dịch qua đường mũi

Vaccin chứa vector cúm được tạo ra trong ví dụ 1 hoặc Ví dụ 5 với liều gây nhiễm phôi từ 6,5 đến 8,5 log 50% (EID50)/ml, và dung dịch đệm được làm ổn định chứa 0,9% theo trọng lượng dung dịch clorua, 0,1% theo trọng lượng L-carnosin, 2,5% theo trọng lượng sucroza, 1% theo trọng lượng albumin tái tổ hợp, 1% theo trọng lượng L-arginin và 3% theo trọng lượng tinh bột hydroxyetyl 130/0,4 (trọng lượng phân tử là 130 kDa, mức độ thay thế phân tử là 0,4).

Ví dụ 12

Tạo ra vaccin dựa trên virus cúm với mục đích điều trị ung thư

Vaccin chứa vector cúm được tạo ra trong ví dụ 1 hoặc Ví dụ 5 với liều nhiễm phôi là từ 6,5 đến 10,5 log 50% (EID50)/ml, và dung dịch đệm được làm ổn định chứa 1,35% theo trọng lượng dung dịch clorua, 0,5% theo trọng lượng L-carnosin, 1% theo trọng lượng albumin tái tổ hợp, 1% theo trọng lượng L-arginin và 3% theo trọng lượng tinh bột hydroxyetyl 130/0,4 (trọng lượng phân tử là 130 kDa, mức độ thay thế phân tử là 0,4).

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Virut cúm A nhược độc tạo ra đáp ứng bảo vệ chéo kháng lại virut cúm A và B, chứa đoạn NS khảm bao gồm khung đọc được cắt của protein NS1 và trình tự gen ngoại lai Nep, trong đó khung đọc được cắt của protein NS1 thu được từ typ phụ virut cúm H1N1 và trình tự gen ngoại lai Nep thu được từ typ phụ virut cúm H2N2 và khung đọc được cắt mã hóa protein NS1 chứa 124 gốc axit amin có trình tự SEQ ID NO:4.
2. Vector virut cúm nhược độc biểu hiện protein hoặc một đoạn của nó được chọn từ nhóm bao gồm các protein hoặc các đoạn của nó từ vi khuẩn, virut và động vật nguyên sinh, trong đó vector là virut cúm A nhược độc theo điểm 1, trong đó khung đọc được cắt của gen protein NS1 bằng đoạn cài có trình tự của ít nhất một gen chuyển mã hóa một protein hoặc một đoạn của nó từ vi khuẩn, virut, và động vật nguyên sinh có tính gây bệnh.
3. Vector virut cúm nhược độc theo điểm 2, protein hoặc một đoạn của nó được chọn từ nhóm bao gồm các protein từ virut cúm A, virut cúm B, vi khuẩn lao, virut herpes, virut hợp bào đường hô hấp, virut gây suy giảm miễn dịch ở người, virut viêm gan C, ký sinh trùng sốt rét, Trichomonas, Trypanosoma, Leishmania, Chlamydia, chất gây bệnh “sốt lùn sóng”, hoặc hỗn hợp các protein này.
4. Vector virut cúm nhược độc theo điểm 2, trong đó protein hoặc đoạn của nó bao gồm từ 10 đến 400 axit amin.
5. Vector virut cúm nhược độc theo điểm 2, trong đó đoạn cài mã hóa vùng protein HA thu được từ virut cúm.
6. Vector virut cúm nhược độc theo điểm 5, trong đó vùng protein HA là vùng dưới đơn vị HA2 được chọn từ nhóm bao gồm 1-185 axit amin thu được từ virut cúm A, 1-186 axit amin thu được từ virut cúm B, 23-185 axit amin thu được từ virut cúm A, hoặc 65-222 axit amin thu được từ virut cúm A.
7. Vector virut cúm nhược độc theo điểm 2, trong đó đoạn cài mã hóa trình tự của vùng dưới đơn vị HA2 của virut cúm A hoặc cúm B có từ 1 đến 21 axit amin và trình tự vùng protein NP của virut cúm A có từ 243 đến 251 axit amin.

8. Vector virus cúm nhược độc theo điểm 2, trong đó đoạn cài mã hóa protein ESAT-6, Ag85A, Ag85B, Mpt64, HspX, Mtb8.4, hoặc 10.4 của vi khuẩn lao, hoặc một đoạn của nó.
9. Vector virus cúm nhược độc theo điểm 8, trong đó trình tự hệ gen virus chứa thêm trình tự mã hóa peptit 2A tự cắt ở giữa khung đọc được cắt của gen protein NS1 và đoạn cài mã hóa protein ESAT6.
10. Vector virus cúm nhược độc biểu hiện protein virus cúm hoặc một đoạn của nó, trong đó vector này là virus cúm A nhược độc theo điểm 1, trong đó khung đọc được cắt của gen protein NS1 được kéo dài bằng đoạn cài có trình tự mã hóa axit amin 1-21 của protein HA2 virus cúm B và axit amin 243-251 của protein NP virus cúm A.
11. Vector virus cúm nhược độc có hoạt tính tiêu diệt tế bào ung thư, trong đó vector này là virus cúm A nhược độc theo điểm 1, trong đó khung đọc được cắt của gen protein NS1 được kéo dài bằng đoạn cài có trình tự mã hóa protein ESAT-6 của vi khuẩn lao hoặc một đoạn của nó.
12. Vector virus cúm nhược độc theo điểm 11, trong đó protein hoặc một đoạn của nó bao gồm từ 10 đến 400 axit amin.
13. Vector virus cúm nhược độc theo điểm 11, trong đó khung đọc được cắt của gen protein NS1 được kéo dài bằng đoạn cài có trình tự mã hóa peptit 2A tự cắt.
14. Vector virus cúm nhược độc tạo ra đáp ứng bảo vệ chéo kháng lại virus cúm A và B, bao gồm:
 - trình tự nucleotit của gen protein PB2 là SEQ ID NO: 14 hoặc trình tự nucleotit có ít nhất 95% độ tương đồng về trình tự với SEQ ID NO: 14;
 - trình tự nucleotit của gen protein PB1 là SEQ ID NO: 15 hoặc trình tự nucleotit có ít nhất 95% độ tương đồng về trình tự với SEQ ID NO: 15;
 - trình tự nucleotit của gen protein PA là SEQ ID NO: 16 hoặc trình tự nucleotit có ít nhất 95% độ tương đồng về trình tự với SEQ ID NO: 16;
 - trình tự nucleotit của gen protein NP là SEQ ID NO: 17 hoặc trình tự nucleotit có ít nhất 95% độ tương đồng về trình tự với SEQ ID NO: 17;
 - trình tự nucleotit của gen protein M là SEQ ID NO: 18 hoặc trình tự nucleotit có ít nhất 95% độ tương đồng về trình tự với SEQ ID NO: 18;

trình tự nucleotit của gen protein HA là SEQ ID NO: 19 hoặc trình tự nucleotit có ít nhất 95% độ tương đồng về trình tự với SEQ ID NO: 19;

trình tự nucleotit của gen protein NA là SEQ ID NO: 20 hoặc trình tự nucleotit có ít nhất 95% độ tương đồng về trình tự với SEQ ID NO: 20;

trình tự nucleotit của gen protein NS khảm là SEQ ID NO: 21 bao gồm:

khung đọc của protein NS1 thu được từ A/PR/8/34 (H1N1) cúm, trong đó khung đọc này được cắt và mã hóa protein NS1 bao gồm 124 gốc axit amin,

và trình tự gen Nep thu được từ virus cúm giống A/Singapore/1/57 (H2N2) hoặc

trình tự nucleotit có ít nhất 95% mức độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 21;

trong đó khung đọc được cắt của protein NS1 này được kéo dài bằng đoạn cài có trình tự nucleotit mã hóa peptit dung hợp của vùng dưới đơn vị HA2 virus cúm B và trình tự nucleotit mã hóa epitop tế bào B bảo toàn của nucleoprotein virus cúm A (NP).

15. Vector virus cúm nhược độc theo điểm 14, trong đó trình tự nucleotit của protein gen NS khảm được nêu trong SEQ ID NO: 21.

16. Chế phẩm miễn dịch gây đáp ứng miễn dịch kháng lại bệnh nhiễm khuẩn ở bệnh nhân, chứa một lượng có hiệu quả của vector virus cúm nhược độc theo điểm 2 và chất mang được dùng.

17. Dược phẩm để ngăn ngừa bệnh cúm, chứa một lượng có hiệu quả của vector virus cúm nhược độc theo điểm 14 và chất mang được dùng.

18. Chế phẩm miễn dịch hoặc dược phẩm theo điểm 16 hoặc 17, lần lượt chứa từ 6,5 đến 10,5 log EID₅₀/ml virus cúm A nhược độc và dung dịch đệm chứa từ 0 đến 1,5% theo trọng lượng muối đơn trị, từ 0 đến 5% theo trọng lượng hợp chất chứa imidazol, từ 0 đến 5% theo trọng lượng thành phần cacbohydrat, từ 0 đến 2% theo trọng lượng thành phần protein, từ 0 đến 2% theo trọng lượng thành phần axit amin, và từ 0 đến 10% theo trọng lượng tinh bột được hydroxyetyl hóa.

19. Chế phẩm miễn dịch theo điểm 16, trong đó dung dịch đệm chứa 0,5 đến 1,5% theo trọng lượng muối đơn trị, 0,01 đến 5% theo trọng lượng hợp chất chứa imidazol, từ 1 đến 5% theo trọng lượng thành phần cacbohydrat, từ 0,1 đến 2% theo trọng lượng thành phần protein, từ 0,01 đến 2% theo trọng lượng thành phần axit amin, và từ 1 đến 10% theo trọng lượng tinh bột được hydroxyetyl hóa.

20. Chế phẩm miễn dịch theo điểm 19, trong đó muối đơn trị là natri clorua, thành phần cacbohydrat là sucroza, trehaloza, hoặc lactoza, thành phần protein là albumin tái tổ hợp của người, casiton, lactalbumin hydrolysat hoặc gelatin, thành phần axit amin là arginin, glyxin hoặc natri glutamat, và hợp chất chứa imidazol là L-carnosin hoặc N,N'-bis[2-(1H-imidazol-5yl)ethyl]propandiamit.
21. Vacxin kháng lại bệnh cúm chứa một lượng có hiệu quả của vector virus cúm nhược độc theo điểm 1 và chất mang được dụng.
22. Vacxin kháng lại bệnh cúm của vector virus cúm nhược độc theo điểm 14 và chất mang được dụng.
23. Vacxin theo điểm 21 hoặc 22, chứa từ 6,5 đến 10,5 log EID₅₀/ml vector virus cúm nhược độc và dung dịch đệm chứa từ 0 đến 1,5% theo trọng lượng muối đơn trị, từ 0 đến 5% theo trọng lượng hợp chất chứa imidazol, từ 0 đến 5% theo trọng lượng thành phần cacbohydrat, từ 0 đến 2% theo trọng lượng thành phần protein, từ 0 đến 2% theo trọng lượng thành phần axit amin và từ 0 đến 10% theo trọng lượng tinh bột được hydroxyetylat hóa.
24. Vacxin theo điểm 23, trong đó dung dịch đệm chứa từ 0,5 đến 1,5% theo trọng lượng muối đơn trị, từ 0,01 đến 5% theo trọng lượng hợp chất chứa imidazol, từ 1 đến 5% theo trọng lượng thành phần cacbohydrat, từ 0,1 đến 2% theo trọng lượng thành phần protein, từ 0,01 đến 2% theo trọng lượng thành phần axit amin, và từ 1 đến 10% theo trọng lượng tinh bột được hydroxyetylat hóa.
25. Vacxin theo điểm 24, trong đó muối đơn trị là natri clorua, thành phần cacbohydrat là sucroza, trehaloza, hoặc lactoza, thành phần protein là albumin tái tổ hợp của người, casiton, lactalbumin hydrolysat hoặc gelatin, thành phần axit amin là arginin, glyxin hoặc natri glutamat và hợp chất chứa imidazol là L-carnosin hoặc N,N'-bis[2-(1H-imidazol-5yl)ethyl]propandiamit.
26. Dược phẩm để điều trị bệnh ung thư ở đối tượng, bao gồm vector virus cúm nhược độc theo điểm 11 với lượng hiệu quả và chất mang được dụng.
27. Dược phẩm theo điểm 26, bao gồm 8,5 đến 10,5 log EID₅₀/ml vector virus cúm nhược độc và dung dịch đệm chứa từ 0 đến 1,5% theo trọng lượng muối đơn trị, từ 0 đến 5% theo trọng lượng hợp chất chứa imidazol, từ 0 đến 5% theo trọng lượng thành phần cacbohydrat, từ 0 đến 2% theo trọng lượng thành phần protein, từ 0 đến 2% theo trọng

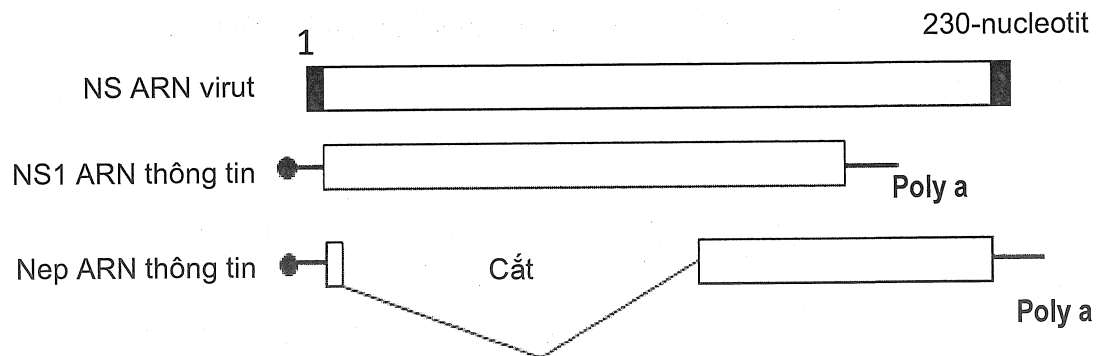
lượng thành phần axit amin, và từ 0 đến 10% theo trọng lượng tinh bột được hydroxyetyl hóa.

28. Dược phẩm theo điểm 27, trong đó dung dịch đậm chứa từ 0,5 đến 1,5% theo trọng lượng muối đơn trị, 0,01 đến 5% theo trọng lượng hợp chất chứa imidazol, từ 1 đến 5% theo trọng lượng thành phần cacbohydrat, từ 0,1 đến 2% theo trọng lượng thành phần protein, từ 0,01 đến 2% theo trọng lượng thành phần axit amin, và từ 1 đến 10% theo trọng lượng tinh bột được hydroxyetyl hóa.

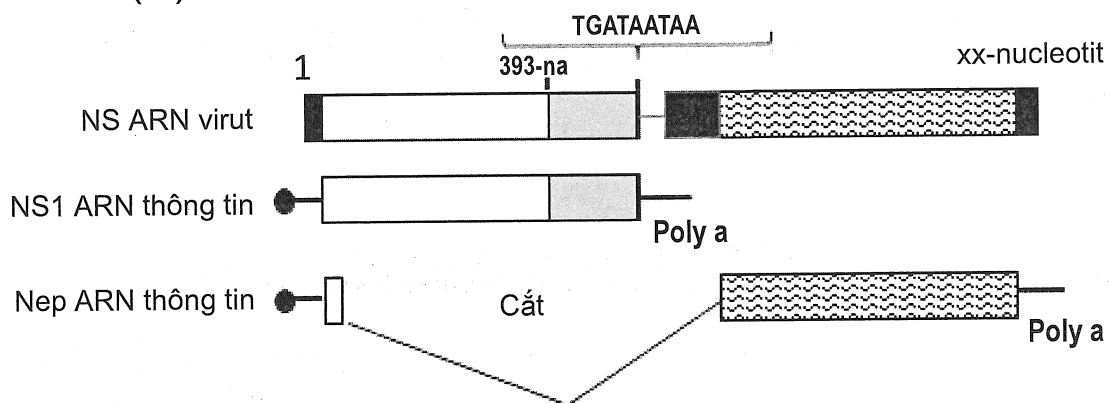
29. Dược phẩm theo điểm 28, trong đó muối đơn trị là natri clorua, thành phần cacbohydrat là tinh bột, thành phần protein là albumin người, thành phần axit amin là arginin, và hợp chất chứa imidazol là L-carnosine hoặc N,N'-bis[2-(1H-imidazol-5yl)etyl]propandiamit.

FIG. 1

(A)



(B)



- Cấu trúc vỏ của ARN thông tin
- Vùng không dịch mã
- Vùng biến đổi của đoạn cài
- ▨ Trình tự dị tương đồng Nep
- Poly a Vị trí polyadenyl hóa
- TGATAATAA Cat-xet mã bộ ba kết thúc

2/14

FIG. 2

(A)

AGCAAAAGCAGGGTGACAAAGACATAATGGATCCAAACACTGTGTCAAGCTTTCAGGTAGA
 TTGCTTTCTTTGGCATGTCCGCAAACGAGTTGCAGACCAAGAACTAGGTGATGCCCCATT
 CTTGATCGGCTTCGCCGAGATCAGAAATCCCTAAGAGGAAGGGGCAGCACTCTTGGTCTG
 GACATCGAGACAGCCACACGTGCTGGAAGCAGATAGTGGAGCGGATTCTGAAAGAAGAA
 TCCGATGAGGCACTTAAATGACCATGGCCTCTGTACCTGCGTCGCGTTACCTAACCGACA
 TGACTCTTGAGGAAATGTCAAGGGAATGGTCCATGCTCATACCCAAGCAGAAAGTGGCAG
 GCCCTCTTTGTATCAGAATGGACCAGGCGATCATGGATAAAAACATCATACTGAAAGCGA
ACTTCAGTGTGATTTTTGACCGGCTGGAGACTCTAATATTGCTAAGGGCTTTCACCGAAGA
 GGGAGCAATTGTTGGCGAAATTTACCATTTGCCTTCTCTTCCAGGACATACTGCTGAGGAT
 GTCAAAAATGCAGTTGGAGTCCCTCATCGGAGGACTTGAATGGAATGATAACACAGTTTCG
 AGTCTCTGAAACTCTACAGAGATTGCTTGGAGAAGCAGTAATGAGAATGGGAGACCTC
 CACTCACTCCAAAACAGAAACGAGAAATGGCGGGAACAATTAGGTCAGAAGTTTGAAGA
 AATAAGATGGTTGATTGAAGAAGTGAGACACAACTGAAGGTAACAGAGAATAGTTTTG
 AGCAAATAACATTTATGCAAGCCTTACATCTATTGCTTGAAGTGGAGCAAGAGATAAGAA
 CTTTCTCATTTCAGCTTATTTAATAATAAAAAACACCCTTGTTTCTACT (SEQ ID NO:1)

(B)

AGCAAAAGCAGGGTGACAAAGACATAATGGATCCAAACACTGTGTCAAGCTTTCAGGTAGA
 TTGCTTTCTTTGGCATGTCCGCAAACGAGTTGCAGACCAAGAACTAGGTGATGCCCCATT
 CTTGATCGGCTTCGCCGAGATCAGAAATCCCTAAGAGGAAGGGGCAGCACTCTTGGTCTG
 GACATCGAGACAGCCACACGTGCTGGAAGCAGATAGTGGAGCGGATTCTGAAAGAAGAA
 TCCGATGAGGCACTTAAATGACCATGGCCTCTGTACCTGCGTCGCGTTACCTAACCGACA
 TGACTCTTGAGGAAATGTCAAGGGAATGGTCCATGCTCATACCCAAGCAGAAAGTGGCAG
 GCCCTCTTTGTATCAGAATGGACCAGGCGATCATGTGATAATAAAGTGTGATTTTTGACCG
 GCTGGAGACTCTAATATTGCTAAGGGCTTTCACCGAAGAGGGAGCAATTGTTGGCGAAATT
 TCACCATTTGCCTTCTCTTCCAGGACATACTAATGAGGATGTCAAAAATGCAATTGGGGTC
 CTCATCGGAGGACTTGAATGGAATGATAACACAGTTTCGAGTCTCTAAACTCTACAGAGA
 TTCGCTTGGTGAAACAGTAATGAGAATGGGAGACCTCCACTCACTCCAAAACAGAAACG
 GAAAATGGCGAGAACAATTAGGTCAAAAGTTTGAAGAAATAAGATGGCTGATTGAAGAA
 GTGAGACACAAATTGAAGATAACAGAGAATAGTTTTGAGCAAATAACATTTATGCAAGCC
 TTACAGCTACTATTTGAAGTGGAAACAAGAGATAAGAACTTTCTCGTTTCAGCTTATTTAAT
 AATAAAAAACACCCTTGTTTCTACT (SEQ ID NO:2)

(C)

AGCAAAAGCAGGGTGACAAAGACATAATGGATCCAAACACTGTGTCAAGCTTTCAGGTAGA
 TTGCTTTCTTTGGCATGTCCGCAAACGAGTTGCAGACCAAGAACTAGGTGATGCCCCATT
 CTTGATCGGCTTCGCCGAGATCAGAAATCCCTAAGAGGAAGGGGCAGCACTCTTGGTCTG
 GACATCGAGACAGCCACACGTGCTGGAAGCAGATAGTGGAGCGGATTCTGAAAGAAGAA
 TCCGATGAGGCACTTAAATGACCATGGCCTCTGTACCTGCGTCGCGTTACCTAACCGACA
 TGACTCTTGAGGAAATGTCAAGGGAATGGTCCATGCTCATACCCAAGCAGAAAGTGGCAG
 GCCCTCTTTGTATCAGAATGGACCAGGCGATCATGTGATAATAAAGTGTGATTTTTGACCG
 GCTGGAGACTCTAATATTGCTAAGGGCTTTCACCGAAGAGGGAGCAATTGTTGGCGAAATT
 TCACCATTTGCCTTCTCTTCCAGGACATACTAATGAGGATGTCAAAAATGCAATTGGGGTC
 CTCATCGGAGGACTTGAATGGAATGATAACACAGTTTCGAGTCTCTAAACTCTACAGAGA
 TTCGCTTGGAGAAGCAGTAATGAGAATGGGAGACCTCCACTCACTCCAAAACAGAAACG
 GAAAATGGCGAGAACAATTAGGTCAAAAGTTTGAAGAAATAAGATGGCTGATTGAAGAA
 GTGAGACACAAATTGAAGATAACAGAGAATAGTTTTGAGCAAATAACATTTATACAAGCC
 TTACAGCTACTATTTGAAGTGGAAACAAGAGATAAGAACTTTCTCGTTTCAGCTTATTTAAT
 AATAAAAAACACCCTTGTTTCTACT (SEQ ID NO:3)

3/14

FIG. 3

NS124/Nep-Len

MDPNTVSSFQVDCFLWHVRKRVADQELGDAPFLDRLRRDQKSLRGRGSTLGLDIETATRAGKQIVERILKEESDEALKMTMASVPA
 SRYLDTMTLEEMSREWSMLIPKQKVAGPLCIRMDQAIM (SEQ ID NO:4)

NS124-HA2(A)-185

MDPNTVSSFQVDCFLWHVRKRVADQELGDAPFLDRLRRDQKSLRGRGSTLGLDIETATRAGKQIVERILKEESDEALKMTMASVPA
 SRYLDTMTLEEMSREWSMLIPKQKVAGPLCIRMDQAIM-GG-GLFGAIAGFIEGGWTGMIDGWYGYHH
QNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNTVIEKMNIQFTAVGKEFNKLEKRMENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDF
HDSNVKNLYEKVKSQKLNNAKEIGNGCFEFYHKCDNECMESVRNGTYDPKYSEESKLNREKVDG**VKLESMGIYQ** (SEQ ID
 NO:5)

NS124-HA2(A)-65-222

MDPNTVSSFQVDCFLWHVRKRVADQELGDAPFLDRLRRDQKSLRGRGSTLGLDIETATRAGKQIVERILKEESDEALKMTMASVPA
 SRYLDTMTLEEMSREWSMLIPKQKVAGPLCIRMDQAIM-GG-AVGKEFNKLEKRMENLNKKVDDGFLDI
WTYNAELLVLENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKLNNAKEIGNGCFEFYHKCDNECMESVRNGTYDPKYSEESKLNREKVDG
VKLESMGIYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI (SEQ ID NO:6)

NS124-HA2(A)-23-185

MDPNTVSSFQVDCFLWHVRKRVADQELGDAPFLDRLRRDQKSLRGRGSTLGLDIETATRAGKQIVERILKEESDEALKMTMASVPA
 SRYLDTMTLEEMSREWSMLIPKQKVAGPLCIRMDQAIM-GG-GYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGI
TNKVNTVIEKMNIQFTAVGKEFNKLEKRMENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKLNNAKEI
GNGCFEFYHKCDNECMESVRNGTYDPKYSEESKLNREKVDG**VKLESMGIYQ** (SEQ ID NO:7)

NS124-HA2(B)-186

MDPNTVSSFQVDCFLWHVRKRVADQELGDAPFLDRLRRDQKSLRGRGSTLGLDIETATRAGKQIVERILKEESDEALKMTMASVPA
 SRYLDTMTLEEMSREWSMLIPKQKVAGPLCIRMDQAIM-GG- GFFGAIAGFIEGGWEGMIAGWHGYT
SHGAHGVAADLKSTQEAINKITKNLSLELVKNLQRLSGAMNGLHDEILELDEKVDDLADTISSEIQLAVLLSNEGIINSEDE
HLLALERKLLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKCNQTCLDRIAAGTFNAGDFS**LPTFD** (SEQ ID NO:8)

NS124-Fus(A)-NP

MDPNTVSSFQVDCFLWHVRKRVADQELGDAPFLDRLRRDQKSLRGRGSTLGLDIETATRAGKQIVERILKEESDEALKMTMASVPA
 SRYLDTMTLEEMSREWSMLIPKQKVAGPLCIRMDQAIM-GG-GLFGAIAGFIEGGWTGMIDGW-GG-RESRNP**GNA** (SEQ ID
 NO:9)

NS124-Fus(B)-NP

MDPNTVSSFQVDCFLWHVRKRVADQELGDAPFLDRLRRDQKSLRGRGSTLGLDIETATRAGKQIVERILKEESDEALKMTMASVPA
 SRYLDTMTLEEMSREWSMLIPKQKVAGPLCIRMDQAIM-GG- GFFGAIAGFIEGGWEGMIAGW -GG-RESRNP**GNA** (SEQ ID
 NO:10)

NS124-Esat6

MDPNTVSSFQVDCFLWHVRKRVADQELGDAPFLDRLRRDQKSLRGRGSTLGLDIETATRAGKQIVERILKEESDEALKMTMASVPA
 SRYLDTMTLEEMSREWSMLIPKQKVAGPLCIRMDQAIM-GG-MTEQQWNFAGIEAAASAIQGNV
TSIHSLDEGKQSLTKLAAAWGGSGSEAYQGVQQKWDATATELNNALQNLARTISEAGQAMASTE**GNVTGMFA** (SEQ ID
 NO:11)

NS124-2A-Esat6

MDPNTVSSFQVDCFLWHVRKRVADQELGDAPFLDRLRRDQKSLRGRGSTLGLDIETATRAGKQIVERILKEESDEALKMTMASVPA
 SRYLDTMTLEEMSREWSMLIPKQKVAGPLCIRMDQAIM-GG-NFDLLKLAGDVESNPGP-
MTEQQWNFAGIEAAASAIQGNVTSIHSLDEGKQSLTKLAAAWGGSGSEAYQGVQQKWDATATELNNALQNLARTISEAGQA
MASTE**GNVTGMFA** (SEQ ID NO:12)

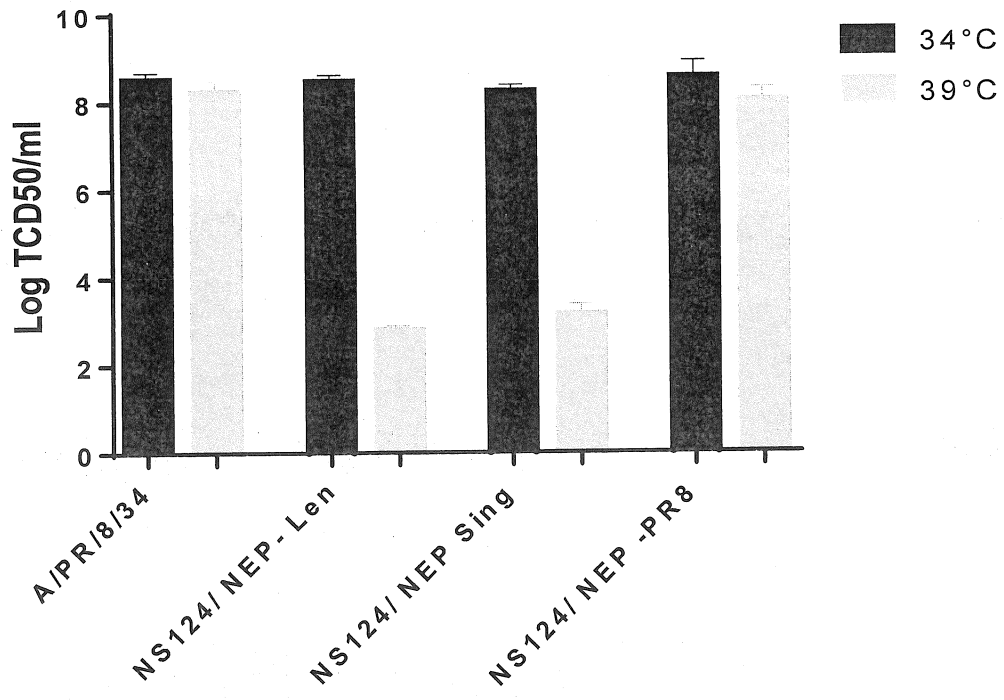
NS124-HSV-2ASY

MDPNTVSSFQVDCFLWHVRKRVADQELGDAPFLDRLRRDQKSLRGRGSTLGLDIETATRAGKQIVERILKEESDEALKMTMASVPA
 SRYLDTMTLEEMSREWSMLIPKQKVAGPLCIRMDQAIM-AAA-NLLTPPKFT-AAA-RMLGDVMAV-AAA-NLLTPPKFT-AAA-
RMLGDVMAV (SEQ ID NO:13)

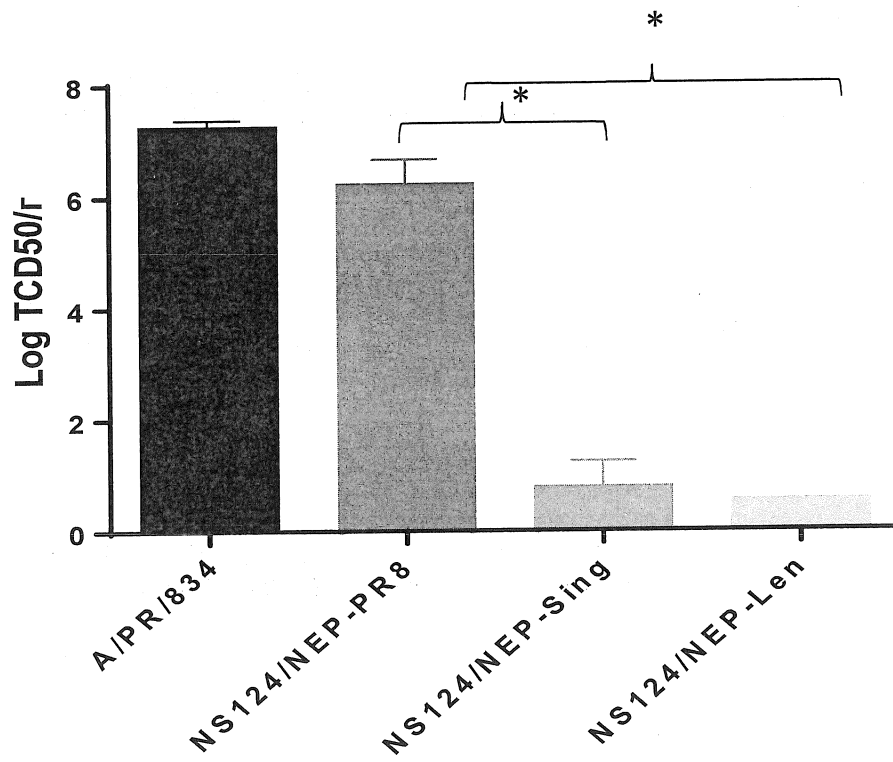
4/14

FIG. 4

(A)



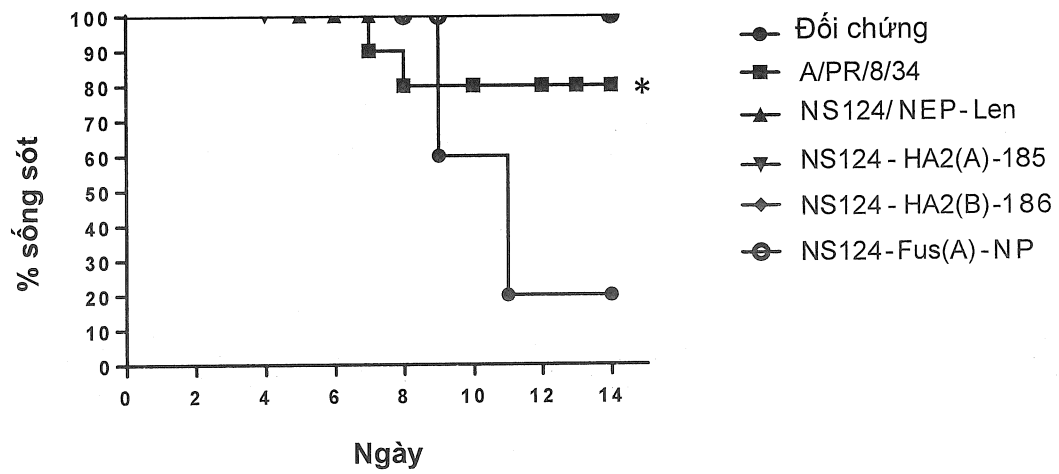
(B)



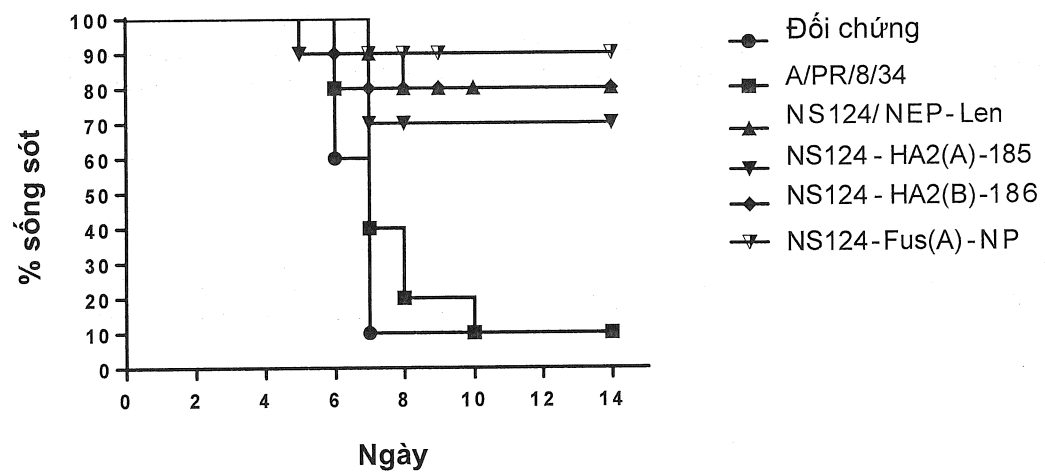
5/14

FIG. 5

(A)



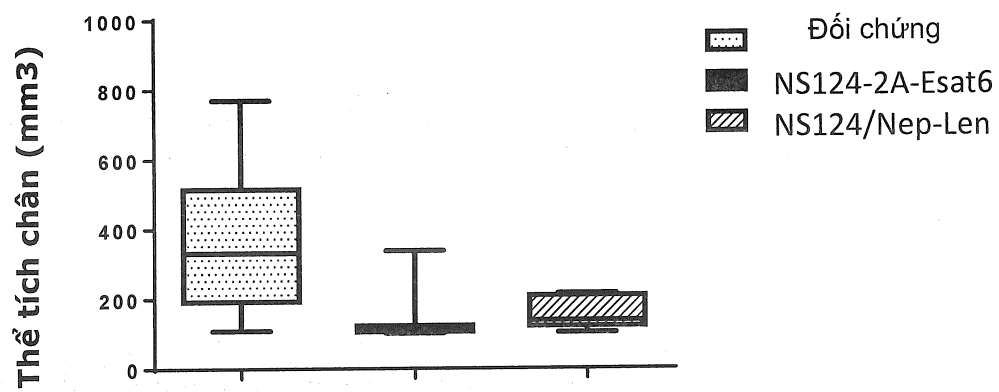
(B)



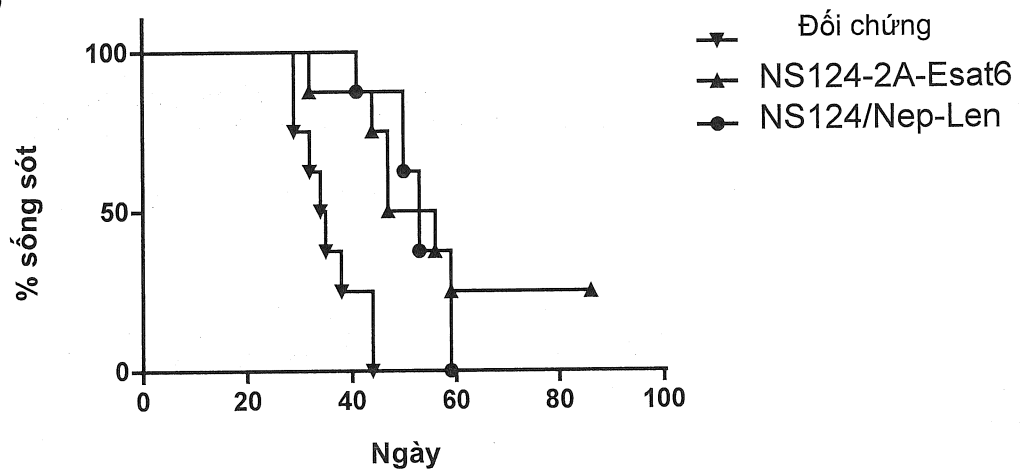
6/14

FIG. 6

(A)



(B)



8/14

FIG. 8

PB2

agcgaaagcagggtcaattatattcaatatggaaagaataaaagaactacgaaatctaattgtcgcagctcgcacccgcgagatact
 caaaaaacaccggtggaccatatggccataatcaagaagtacacatcagggaagacaggagaagaaccagcacttaggatga
 aatgggatgatggcaatgaaatattcaattacagcagacaagaggataacggaatgattcctgagagaatgagcaaggacaaa
 ctttatggagtataaatgaatgatccggatcagaccgagtgatggatcacctctggctgtgacatgggtgaataggaatggacca
 ataacaatacagttcattatccaaaaactacaaaaactatttgaagagtcgaaaggctaaagcatggaacctttggccctgtc
 cattttagaaaccaagtcacaaatcgtcggagagttgacataaatcctggatcagatctcagtgccaaggaggcagcaggtgt
 aatcatggaagtgtttccctaacgaagtgaggagccaggatactaacatcggaatcgcaactaacgataaccaagagaagaaa
 gaagaactccaggattgcaaaatttctcttggatgggtgcatacatgttgagagagaactgggtccgaaaaagagattcctcca
 gtggctgggtggaacaagcagtggtgacattgaagtgtgacatttgactcaaggaaacatgctgggaacagatgtatactcaggagg
 ggaagtgaggaaatgatgttgatcaaagctgattattgctgtaggaacatagtgaagagctgcagatcagcagatccact
 agcatctttatggagatgtgccacagcacagattgggtgaataggatggttagacatccttaggcagaaccaacagaagagc
 aagccgtggatatatgcaaggctgcaatgggactgagaattagctcatccttcagtttgggtgattcatttaagagaacaagcg
 gatcatcagtcgaagagaggaagaggtgcttacgggcaatctcaaacattgaagataagagtgcatgagggatgaagagtt
 cacaatgggtgggagaaggaacagccatactcagaaaagcaaccaggagattgattcagctgatatgtagtgaggagagacga
 acagtcgattgccgaagcaataatttgccatgggtattttcacaaggaggtgatgataaaagcagtcagagggtgatctgaatttc
 gtcaataggcgcaatcaacgattgaatcctatgcatcaactttaagacatttcagaaggatgcgaaagtgttttcaaaattggg
 gaggtaaacctatcgacaatgtgatgggaatgattgggatattgccgacatgactccaagcatcgagatgtcaatgagaggagtg
 agaatcagcaaaatgggttagatgagtactccagcacggagagggtagtggtagcattgaccgtttttgagaatccgggacca
 acgaggaaatgtactactgtctccgaggaggtcagtgaaacacaggggaacagagaaactgacaataacttactcatgtcaatg
 atgtgggagattaatggctcgtgaatcagttgttggtcaatcctcaatggatcatcagaaactgggaaactgttaaaatcagttgtt
 ccgagaacctacaatgctatacaataaaatggaattgaacatttcagttcttagtacctaaggccattagaggccaatacagtg
 ggtttgtaagaactgttccaacaaatgagggatgtgcttgggacatttgataccgcagataataaaacttcttccctcgcagc
 cgctccaccaaagcaaaagtagaatgagttctctcattactgtgaatgtgaggggacaggaaatgagaataactgtgaagggca
 attctcgttattcaactataacaagccacgaagagactcacagttctcggaaaaggatgctggcactttaactgaagaccagatg
 aaggcacagctggagtgaggctccgtgttctgaggggattcctcattctgggcaagaagacaagagatatgggccagcactaag
 catcaatgaactgagcaaccttgcaaggagagaaggctaattgtgtaattgggcaaggagacgtgtgttgtaataaagcg
 aaacgggactctagcatactactgacagccagacagcgaccaaagaattcgatggccatcaattagttcgaatagttaaaa
 acgacctgtttctact

SEQ ID NO: 14

PB1

agcgaaagcaggcaaacatttgaatggatgtcaatccgaccttctttcttaaaagtccagcacaaaatgctataagcacaaacttcccttatact
 ggagaccctccttacgcatgggacaggaaacaggatacaccatggatactgtcaacaggacacatcagtagtcagaaaagggaatggacaac
 aaacaccgaaactggagcaccgcaactcaaccgattgatggccactgccaagaagaatgaaccaagtgttatgccaaaacagattgtgtatt
 ggaggcgatggcttcttgaggaaatccatctgttattttgaaaactcgtgtattgaaacgtaggaggtgttcagcaaaacagtagacaagct
 gacacaaggccgacagacctatgactggactctaaatagaaccaactgtctgcaacagcattggcccaacacataagaagtgttcagatcaaatgg
 cctcacggccaatgagctcggaaaggctcatagacttcttaaggatgtaattggagtcaatgaacaaagaagaatggggatcacaactcatttcag
 agaaagagacgggtgagagacaatgatgactaagaaaatgataacacagagaacaatgggtaaaaaagaagcagagattgaacaaaagggttat
 ctaattagagcattgacctgaacacaatgaccaagatgctgagagaggggaagctaaaacggagagcaattgcaacccaggagtgcaataa
 gggggtttgtatactttgttgagacactggcaaggagtatatgttgagaaacttgaacaatcagggttgccagttggaggcaatgagaagaagcaaa
 gttggcaaatgttgtaaggaaatgatgaccaatttcaggacacccgaacttttccaccatcactggagataacccaatggaacgaaaatcag
 aatcctcgatgttttggccatgatcacatatgaccagaaatcagcccgaatgggtcagaatgttctaagtattgctccaataatgttctcaaaa
 aaatggcgagactgggaaaagggtatatgtttgagagcaagagtatgaaacttagaactcaaatcctgcagaaatgttagcaagcatcgattga
 aatatttcaatgattcaacaagaagaagattgaaaaaatccgaccgtcttaatagaggggactgcatcattgagccctggaatgatgtggcgt
 gttcaatgttaagcactgtattaggcgtctccatctgaatcttggacaaaagagatacaccaagactactggtgggtgtgtctcaatcctct
 gacgattttgctgtattgtgaatgacccaatcatgaagggttaacccggagtcgacaggttttatcgaaactgtaagctacttggatcaaatg
 agcaagaaaaagcttatacaaaacagaggtacatttgaattcacaagttttctatcgttatgggtttgttccaatttcagcatggagcttcca
 gttttgggtgtctgggatcaacgagtcagcggacatgagattggagtactgtcatcaaaaacaatgataacaatgatcttggccagcaaca
 gctcaaatggccctcagttgttcatcaaaagattacaggtacacgtaccgatgcatataggtgacacacaaatacaaacccgaagatcatttgaat
 aaagaactgtgggagcaaacccgttcaaaagctggactgtgtctccgacggaggccaaatttatacaaacattagaaatctccaacttctgaa
 gtctgcctaaaatgggaattgatggatgaggattaccggggcggttatgtcaacccactgaacccatttgcagccataaagaatgtaatcaatgaa
 caatgcagtgatgagccagcacatgggtcagccaaaaacatggagtatgatgctgttgcaacaacacactcctggatcccaaaagaaatcgatc
 catcttgaatacaagtcaaaggagtagcttggagatgaacaaatgtaccaaagggtgctgcaattatttgaaaaattcttccccagcagttcataca
 gaagaccagtcgggatattcagatgtgtggaggctatgtttccagagccgaattgatgcagcaggttatttgaatcgtggaaggataaagaaga
 agagttcactgagatcatgaatctgttccacattgaagagctcagacggcaaaaatagtgaaattagctgtccttcagaaaaatgccttgttt
 ctact

SEQ ID NO: 15

9/14

FIG. 8 (tiếp)

PA

agcgaagcagggtactgatccaaatggaagattttgtgcgaatgcttcaatccgatgattgtcgagcttgcggaaaaacaatgaaagagtat
 ggggaggacctgaaatcgaaacaaacaaatttgcagcaatatgcactcacttggaagtatgcttcatgtattcagattttcacttcatcaatgagc
 aaggcgagtcataatcgtagaacttggtgatccaaatgcattttgaagcacagatttgaataatcgagggaagagatcgcaaatggcctgga
 cagtagtaaacagtatttgcacactacagggctgagaaccaaagtttctaccagattttagattacaggagaatagattcatcgaaattgg
 agtaacaaggagagaagttcacatatactctggaaggccaataaaatgaaatctgagaaacacacatccattttctctgcttactgggga
 agaaatggccacaaaggcagactacactctcgatgaagaaagcagggttaggatcaaaaccagactattcaccataagacaagaaatggccag
 cagaggcctctgggattccttctgctcagtcagagaggagaagagacaattgaagaaagtttgaatcacaggaaatgcgaagcttgccg
 accaaagtctcccgccgaacttctcagccttgaaatttttagagcctatgttgatggattcgaaccgaacggctacattgagggaagctgtctca
 aatgtccaaagaagtaattgtagaattgaacctttttgaaaaaacaccacgaccacttagacttccgaatgggctcctgttctcagcggtcc
 aaattcctgctgatggatgccttaaaatgaagcattgaggaccgaatgtagaaggagagggaataaccgctatatgtgcaatcaatgcatgaga
 acattctttggatggaggaacccaatgttgttaaacacacgaaaagggaataatcaaattatcttctgcatggaagcaagtactggcagaa
 ctgcaggacattgagaatgaggagaaaattccaaagactaaaatagagaaaacaagtcagtaaagtgggcaacttggtgagaacatggcac
 cagaaaaggtagactttgacgactgtaagatgtaggtgatttgaagcaatatgtagtgatgaaccagaattgaggtcgtagcaagtggattc
 agaatgagtttaacaaggcatgcgaactgacagattcaagctggatagagctcgatgagattggagaagatgggtcccaattgaacacattgcaa
 gcatgagaaggaattatttcatcatcagaggtgtctcactgcagaccagagaatacataatgaagggggtgtacatcaactgccttgcttaatgc
 atcttgtgcaatggatgatttccaatattccaatgataagcaagtgtagaactaaggagggaaggcgaagaccaacttgatgtttcatc
 ataaaaggagatcccacttaaggatgacaccgacgtgtgtaactttgtgagcatggagtttctcactgaccaagactggaaccacataaat
 gggagaagtactgttcttgagataggagatatgcttataagagtgccataggccaggttcaaggccatgttctgtatgtgagaacaatgg
 aacctcaaaaattaaaatgaaatggggaatggagatgaggcgttgctcctccagtcacttcaacaattgagagtagattgaagctgagctct
 gtcaaaagagaaaagacatgaccaagaggtcttggagaacaatcagaacatggccatggagagtcacccaaaggagtgaggaaagtcca
 ttgggaaggtctgcaggacttttagcaaaagtcgttattcaacagctttagatgcatctccacaactagaaggattttcagctgaatcaagaaaatg
 ctcttatctgtcaggctcttagggacaaacctggaacctgggacctttagatcttgggggctatatgaagcaattgaggagtcctgattaatgatccc
 tgggtttgtctaattgcttctgttcaactcctcttacacatgcatgtagttagttggcagtgctactatttgcatactatgtccaaaaagta
 cctgttttctact

SEQ ID NO: 16

NP

agcaaaagcagggtagataatcactcactgagtgacatcaaaatcatggcgtcccaaggcaccacaaaggtcttacgaacagatggagactgatg
 gagaacgccagaatgccactgaaatcagagcatccgtcgaaaaatgattgtggaattggacgatttcatcctcaaatgtgcaccgaactcaaa
 ctcagtgattatgaggacggttgatccaaaacagcttaacaatagagagaatgggtcctctgcttttgacgaaggagaaataaatacctggaa
 gaacatcccagtcggggaaagatcctaagaaaactggaggaccttatatacaggagagtaaacgggaagtggtgagagaactcatcctttatg
 acaagaagaaataaggcgaatctggcgccaagctaataatggtagcagtgcaacggctggtctgactcacatgatgatctggcattccaatttga
 atgatgcaacttatcagaggacaagagcttctgtcgcacgggaatggatccaggatgtgctctctgatgcaaggttcaactctccttaggaggtct
 ggagccgcagggtgctgagtcgaaggagttggaacaatggatggaattggatcaggatgatcaaacgtgggatcaatgatcggaacttctggag
 gggtgagaatggacaaaaacaagaattgcttatgaaagaatgtgcaacattctcaagggaatttcaaaactgctgcacaaaaagcaatgatg
 gatcaagtgaagagagcggaacccagggaatgctgagttcgaagatctcatttttagcacggtctgactcatattgagagggtcggtgtctc
 acaagtcctgctgctgctgtgtatggacctgccgtagccagtggtgacgacttgaagagaggggatactcttagtcggaatagacctttc
 agactgcttcaaaacagccaagtgtacagcctaatacagacaaatgagaatccagcacacaagagtcgaactggtgtggatggcatgccattctgc
 cgcatttgaagatctaagagtattaaagcttcatcaagggaacgaaggtgctcccaaggagggaagcttccactagaggagtcaaatgtcttcaat
 gaaaatattggagactatggaatcaagtacactggaactgagaagcaggtactgggccaataaggaccagaagtggaggaaacaccaatcaacag
 agggcatctgctgggccaatcagcatacaacctacgttctcagtacagagaatctcccttttgacagaaacacattatggcagcattcaatggg
 aatacagagggaagaacatctgacatgaggaccgaatcataaggtatgagaaagtgaagaccagaagatgtgtcttccaggggcgggga
 gtcttcagctctcgacgaaaaagcagcgagccgatcgtccttcttgcacatgagtaaatgaaggatcttatttctcgagacaatgcagagg
 agtacgacaattaaagaaaaataccctgttttact

SEQ ID NO: 17

10/14

FIG. 8 (tiếp)

M

agcgaaagcaggtagatattgaaagatgagcttctaaccgaggtcgaaacgtacgtactctctatcatcccgtcagggccctcaaagccgagat
 cgcacagagacttgaagatgtctttgcagggagaacactgatcttgaggttctcatggaatggctaaagacaagaccaatcctgtcaccttgact
 aaggggattttaggatttgtgtcacgctcacgtgccagtgagcgaggactgcagcgtagacgctttgtccaaatgcccttaatgggaacgggg
 atccaaataacatggacaaagcagttaaactgtataggaagctcaagaggagataacattccatggggccaaagaaatctcactcagtattctg
 ctggtgcacttgcagttgtatgggctcatatacaacaggatggggctgtgacctgaagtggcatttggcctgtatgtgcaacctgtgaaca
 gattgctgactcccagcatcggtctcataggaatgggtgacaacaaccaatccactaatcagacatgagaacagaatggttttagccagcactac
 agctaaggctatggagcaaatggctggatcgagtgaagcagcagaggccatggaggttgctagtgcaggctagacaaatggtgcaagcagtg
 agaaccattgggactcatcctagctcagtgctggtctgaaaaatgatcttctgaaaaattgcaggcctatcagaacgaatgggggtgcagatgc
 aacggttcaagtgtatctctgctattgctgcaaatatcattgggatcttgacttgatattgtgattcttgatcgtctttttcaaatgcattaccgt
 cgctttaaatacggactgaaaggagggccttctacggaaggagtgcaaaagtctatgagggagaataatcgaaaggaacagcagagtgctgtgg
 atgtctgacgatggtcattttgtagcatagagctggagtaaaaaactcctgtttctact

SEQ ID NO: 18

HA

AGCAAAAGCAGGGGAAAATAAAACAACCAAAatgaaggcaatactagtagttctgctatatacatttgaacccg
 caaatgcagacacattatgtataggttatcatgcaaaattcaacagacactgtagacacagtactagaaaaaatgtaacagt
 aacacactctgttaaccttctagaagacaagcataacgggaaactatgcaaaactaagaggggtagccccattgcatttgggttaa
 atgtaacattctggtctggatcctgggaaatccagagtgtaaatcactctccacagcaagttcatggtcctcattgtggaacat
 ctagtgcagacaatggaaacgtgttaccagagagattcatcaattatgaggagctaagagagcaattgagctcagtgctcatcattg
 aaagggttgagatattccccaaaacagttcatggcccaatcatgactcgaacaaagggtgtaacggcagcatgtcctcacgtgg
 agcaaaaagcttctacaaaaatataataggctagttaaaaaaggaaattcataccaaagctcagccaatcctacattaatgat
 aaagggaagaagtcctgtgctgtggggcattcacatccatctactactgctgaccaacaaagtctctatcagaatgcagatg
 catatgttttttggggacatcaagatacagcaagaattcaagccggaaatagcaataagcccaaatgagggatcaagaag
 ggagaatgaactattactggacactagtagagccgggagacaaaataacattcgaagcaactggaaatctagtggtaccgagat
 atgcattcacaatggaaagaatgctggatctgtgtattatcattcagatacaccagtcacagattgcaatacaactgtcagaca
 cccgaggggtctataaacaccagcctccatttcagaatatacatccgatcacaattggaaaatgtccaaagtatgtaaaaagca
 caaaattgagactggccacaggattgaggaatgtccgtctattcaatctagagccctattcggggccattgccggttcattgaa
 ggggggtggacaggatggttagatggatggtacggttatccatcaaaatgagcaggggtcaggatatgcagccgacctgaa
 gagcacacaaaatgccattgacaagattactaacaagtaaaactctgttattgaaaagatgaatacacagttcacagcagtggt
 aaagagttcaaccactggaaaaaagaatagagaatttaataaaaaaagttgatgatggtttcctggacatttggacttacaatg
 ccgaactgttgggttctattggaaaatgaaagaactttggactaccatgattcaaatgtgaagaacttgatgaaaaggtaagaaa
 ccagttaaaaaacaatgccaggaaatggaaacggctgcttgaattttaccacaaatgcgataacacgtgcagtaagagtgct
 aaaaaatgggacttatgactcccaaaatactcagaggaagcaaaatgaacagagaaaaatagatggggtaagctggaat
 caacaaggatttaccagatttggcgtatcttaactgtcgccagttcattggtgctgtagtctcctgggggcaatcagctctcg
 gatgtgctctaattgggtctacagtgtagaatatgtatttaaGATTAGAATTCAGAGATATGAGGAAAAACACCC
 TTGTTTCTACT

SEQ ID NO: 19

11/14

FIG. 8 (tiếp)

NA

AGCAAAAGCAGGGGAAAATAAAAAACAACCAAAAtgaaggcaatactagtagttctgctatatacatttgcacccgcaaa
 tgcagacacattatgtataggttatcatgcaacaattcaacagacactgtagacacagtactagaaaagaatgtaacagtaacacact
 ctgttaaccttctagaagacaagcataacgggaaactatgcaactaagaggggtagccccattgcatttgggtaaattgaacattgctg
 gctggatcctgggaaatccagagtgtgaatcactctccacagcaagttcatggctctacattgtggaacatctagttcagacaatggaa
 cgtgttaccaggagatttcatcaattatgaggagctaagagagcaattgagctcagtgctcatcttgaagggttgagatattcccaa
 aacaagttcatggccaatcatgactcgaacaaagggttaacggcagcatgtcctcacgctggagcaaaaagcttctacaaaaatttaa
 tatggctagttaaaaaaggaaattcatacccaaagctcagccaatcctacattaatgataaagggaagaagcctcctgctgtggggc
 attcaccatccatctactactgctgaccaacaaagtctctatcagaatgcagatgcataatgttttggggacatcaagatacagcaaga
 agttcaagccggaatagcaataagaccaaaagtgggagatcaagaagggaagaatgaactattactggacactagtagagccgggag
 acaaaataacattcgaagcaactggaaatctagtggtaccgagatgcattcacaatggaaagaatgctggatctgtattatcatt
 cagatacaccagtcacgattgcaatacaactgtcagacacccgagggtgctataaacaccagcctccatttcagaatatacatccga
 tcacaattggaaaatgtccaaagtatgtaaaaagcacaataatgagactggccacaggattgaggaaatgccgtctattcaatctaga
 ggctattcggggcattgccggtcattgaaggggggtggacaggatggttagatggatggtaacggttatcaccatcaaaatgagca
 ggggtcaggatgcagccgacctgaagagcacacaaaaatgccattgacaagattactaacaagaactctgttattgaaaagatg
 aatacacagttcacagcagtggtgtaagagttcaaccacctggaaaaaagaatagagaatttaataaaaaagttgatggtttcct
 ggacatttggacttacaatgccgaactgttggttctattggaaaaatgaaagaactttggactaccatgattcaaatgtgaagaactgtat
 gaaaaggtaagaaccagttaaaaacaatgccaaaggaaattggaaacggctgcttgaattttaccacaaatgcgataacacgtgca
 tggaaagtgtcaaaaatgggacttatgactacccaaaatactcagaggaagcaaaatgaacagagaaaaatagatggggtaaaagc
 tggatcaacaaggattaccagatttggcgatctattcaactgtcgcagttcattggtgctgtagtctcctgggggcaatcagcttc
 tggatgtctctaattgggtctctacagtgtagaatatgtatttaaGATTAGAATTCAGAGATATGAGGAAAAACACCCCTT
 GTTCTACT

SEQ ID NO: 20

NS

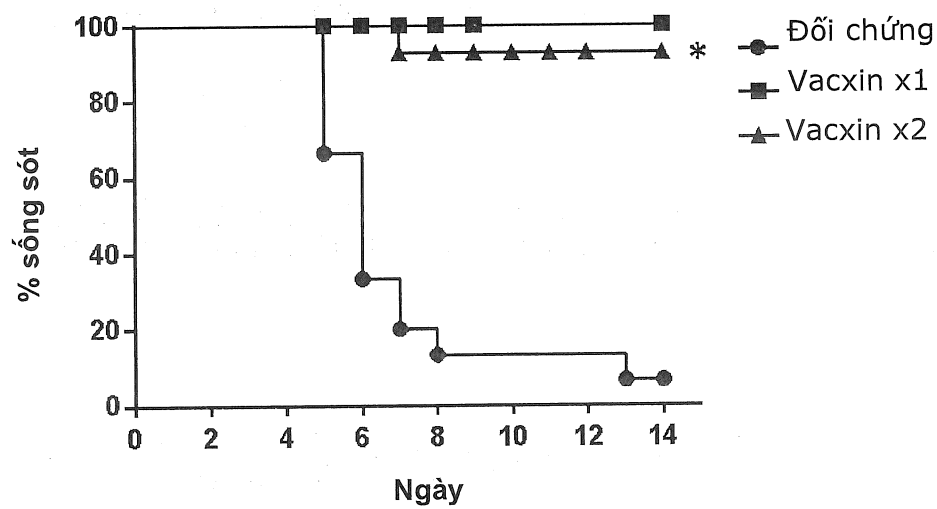
AGCAAAAGCAGGGTGACAAAGACATAATGGATCCAAACACTGTGTCAAGCTTTCAGGTAGATTGCTTCTTTGG
 CATGTCCGCAAAACGAGTTGCAGACCAAGAAGTAGGTGATGCCCCATTCTTGATCGGCTTCGCCGAGATCAGAA
 ATCCCTAAGAGGAAGGGGCAGCACTCTTGGTCTGGACATCGAGACAGCCACACGTGCTGGAAGCAGATAGTG
 GAGCGGATTCTGAAAGAAGAAATCCGATGAGGCATTAATGACCATGGCCTCTGTACCTGCGTCGCGTTACCTA
 ACCGACATGACTCTTGAGGAAATGTCAAGGGAATGGTCCATGCTCATACCAAGCAGAAAAGTGCCAGGCCCTCT
 TTGTATCAGAAATGGACAGGCGATCATGggaggaggttcttcggagctattgctggtttcttgaaggaggatgggaaggaaatgatt
 gcaggttggggagggaagagagagccggaaccagggaatgcttgataataagcggccgcAGTGTGATTTTGACCGGCTGGAGAC
 TCTAATATTGCTAAGGGCTTTACCGGAAGAGGGAGCAATTGTTGGCGAAATTTACCATTTGCCTTCTCTTCCAGG
 ACATACTGCTGAGGATGTCAAAAATGCAGTTGGAGTCTCATCGGAGGACTTGAATGGAATGATAACACAGTTTC
 GAGTCTCTGAACTCTACAGAGATTGCTTGGAGAAGCAGTAATGAGAATGGGAGACCTCCACTCACTCCAAAA
 CAGAAACGAGAAATGGCGGGAACAATTAGGTCAGAAGTTTGAAGAAATAAGATGGTTGATTGAAGAAGTGAG
 ACACAACTGAAGGTAACAGAGAATAGTTTTGAGCAATAACATTTATGCAAGCCTTACATCTATTGCTTGAAGT
 GGAGCAAGAGATAAGAACTTTCTCATTTTCAGCTTATTTAATAATAAAAAACACCCCTTGTCTTCTACT

SEQ ID NO: 21

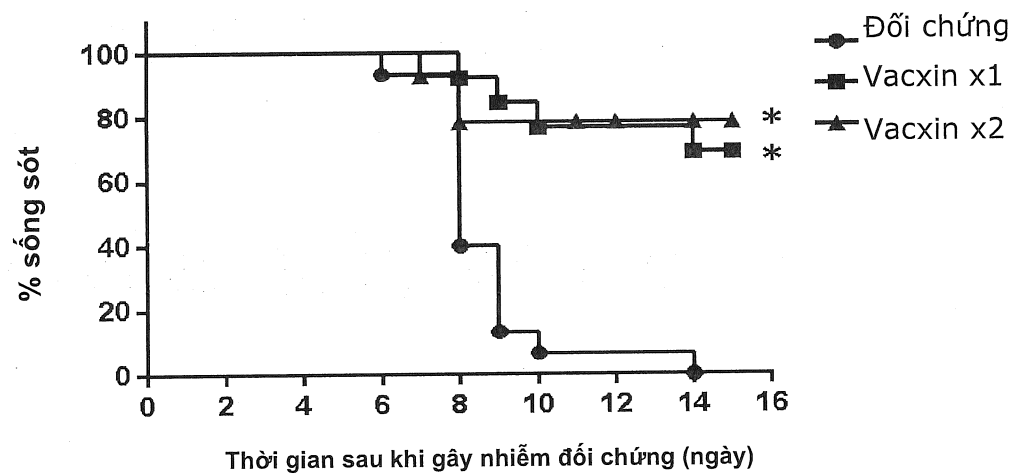
12/14

FIG. 9

(A) A/California/07/09pdm



(B) A/Aichi/2/68 (H3N2)

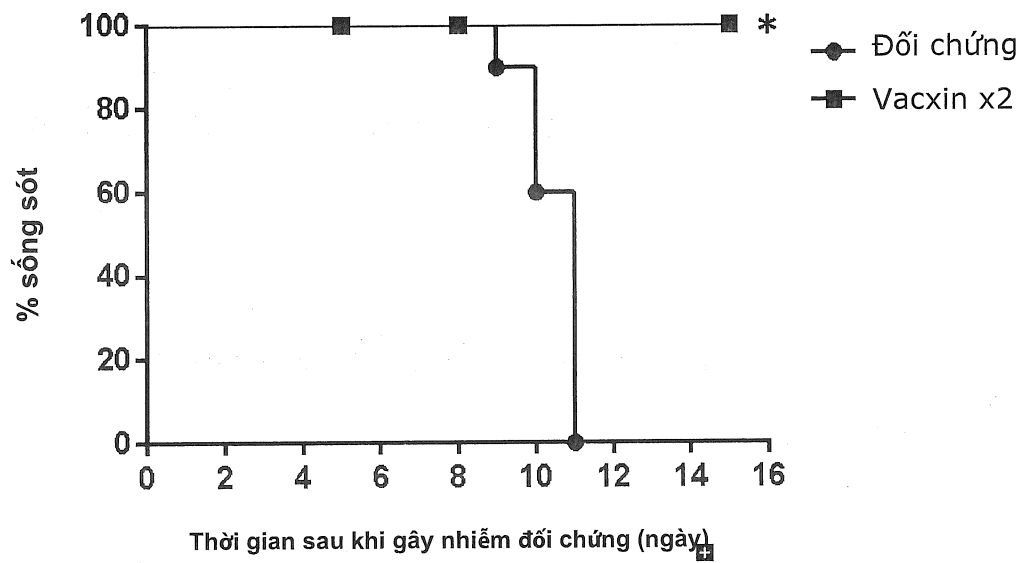


13/14

FIG. 9 (tiếp)

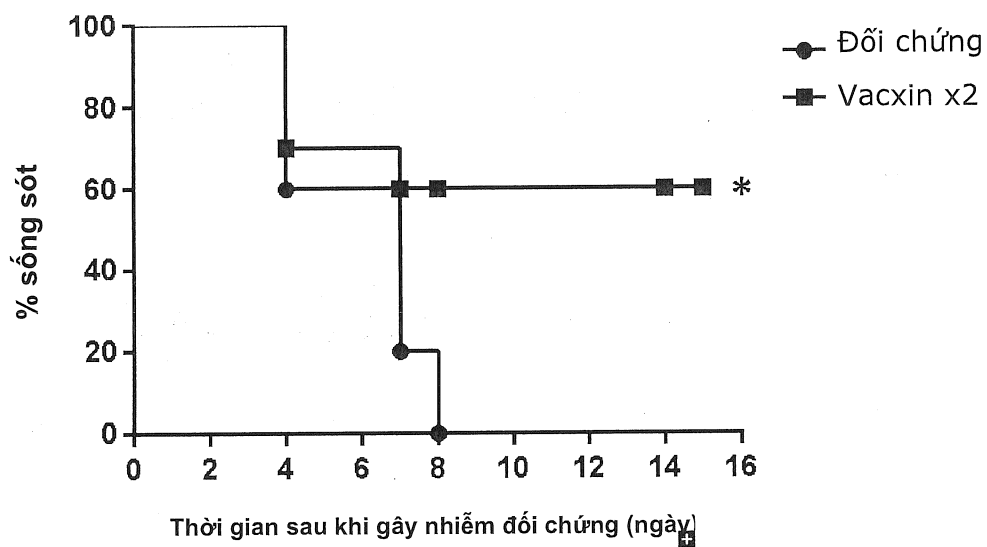
(C)

A/Mississippi/85/1 (H3N2)



(D)

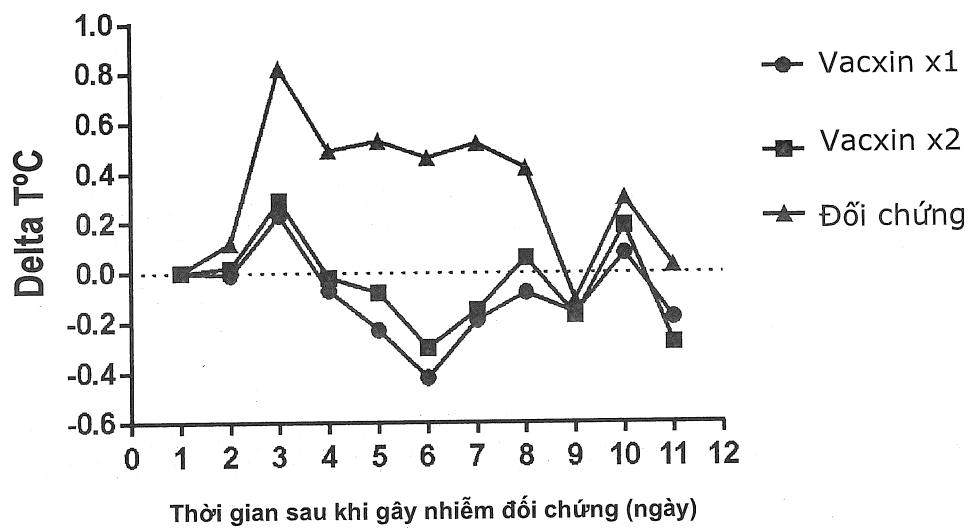
B/Lee/40



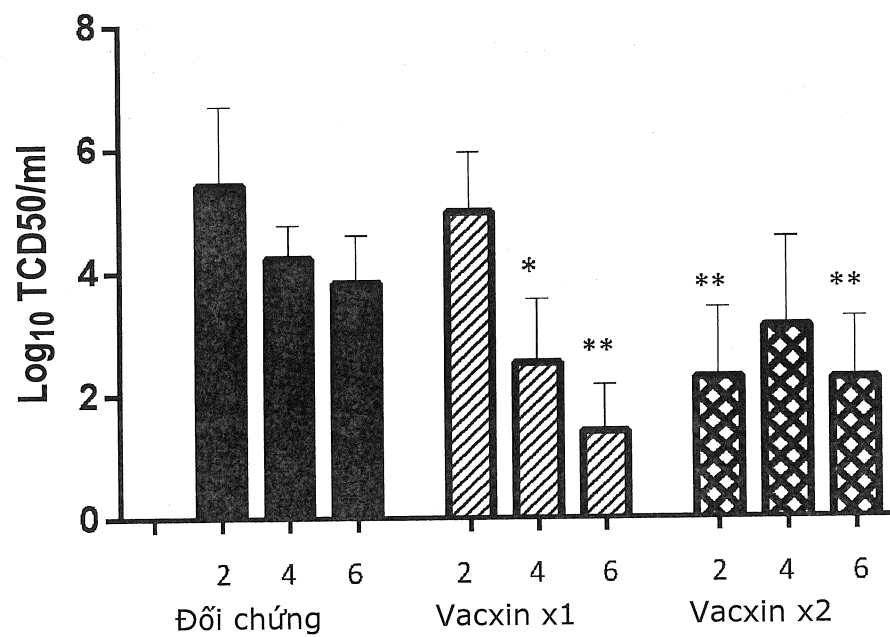
14/14

FIG. 10

(A)



(B)



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> OBSHESTVO S OGRANICHENNOI OTVETSTVENNOSTIYU «PHARMENTERPRISES»

<120> VIRUT CÚM A NHUỘC ĐỘC, VECTO VIRUT CÚM NHUỘC ĐỘC VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA VECTO NÀY

<130> 2420-301559RU/061

<140>

<141>

<150> 2015147703

<151> 06.11.2015

<150> 2016111907

<151> 30.03.2016

<160> 21

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 890

<212> ADN

<213> Virut cúm A

<220>

<223> Đoạn NS của virut cúm A/PR/8/34 (H1N1)

<400> 1

agcaaaagca	gggtgacaaa	gacataatgg	atccaaacac	tgtgtcaagc	tttcaggtag	60
attgctttct	ttggcatgtc	cgcaaacgag	ttgcagacca	agaactaggt	gatgccccat	120
tccttgatcg	gcttcgccga	gatcagaaat	ccctaagagg	aaggggcagc	actcttggtc	180
tggacatcga	gacagccaca	cgtgctggaa	agcagatagt	ggagcggatt	ctgaaagaag	240
aatccgatga	ggcacttaaa	atgaccatgg	cctctgtacc	tgcgtcgcgt	tacctaaccg	300
acatgactct	tgaggaaatg	tcaagggaat	ggtccatgct	catacccaag	cagaaagtgg	360
caggccctct	ttgtatcaga	atggaccagg	cgatcatgga	taaaaacatc	atactgaaag	420
cgaacttcag	tgtgatTTTT	gaccggctgg	agactctaata	attgctaagg	gctttcaccg	480
aagaggggagc	aattgttggc	gaaatttcac	cattgccttc	tcttccagga	catactgctg	540
aggatgtcaa	aaatgcagtt	ggagtcctca	tccggaggact	tgaatggaat	gataacacag	600
ttcgagtctc	tgaaactcta	cagagattcg	cttggagaag	cagtaatgag	aatgggagac	660
ctccactcac	tccaaaacag	aaacgagaaa	tggcgggaac	aattaggtca	gaagtttgaa	720
gaaataagat	ggttgattga	agaagtgaga	cacaaactga	aggtaacaga	gaatagtttt	780
gagcaaataa	catttatgca	agccttacat	ctattgcttg	aagtggagca	agagataaga	840
actttctcat	ttcagcttat	ttaataataa	aaaacaccct	tgtttctact		890

<210> 2

<211> 869

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn NS tái tổ hợp của Virut cúm A có khung đọc mở được cắt của protein NS1 và trình tự Nep thu được từ virut A/Singapore/1/57 (H2N2)

<400> 2

agcaaaagca	gggtgacaaa	gacataatgg	atccaaacac	tgtgtcaagc	tttcaggtag	60
attgctttct	ttggcatgtc	cgcaaacgag	ttgcagacca	agaactaggt	gatgccccat	120
tccttgatcg	gcttcgccga	gatcagaaat	ccctaagagg	aaggggcagc	actcttggtc	180
tggacatcga	gacagccaca	cgtgctggaa	agcagatagt	ggagcggatt	ctgaaagaag	240

```

aatccgatga ggcacttaaa atgaccatgg cctctgtacc tgcgtcgcgt tacctaaccg 300
acatgactct tgaggaaatg tcaagggaat ggtccatgct catacccaag cagaaagtgg 360
caggccctct ttgtatcaga atggaccagg cgatcatgtg ataataaagt gtgatttttg 420
accggctgga gactctaata ttgctaaggg ctttcaccga agagggagca attgttggcg 480
aaatttcacc attgccttct cttccaggac atactaatga ggatgtcaaa aatgcaattg 540
gggtcctcat cggaggactt gaatggaatg ataacacagt tgcagtctct aaaactctac 600
agagattcgc ttggtgaaac agtaatgaga atgggagacc tccactcact ccaaaacaga 660
aacggaaaat ggcgagaaca attaggtcaa aagttcgaag aaataagatg gctgattgaa 720
gaagtgagac acaaattgaa gataacagag aatagttttg agcaaataac atttatgcaa 780
gccttacagc tactatttga agtggaacaa gagataagaa ctttctcgtt tcagcttatt 840
taataataaa aaacaccctt gtttctact 869

```

<210> 3
 <211> 869
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn NS tái tổ hợp của Virut cúm A có khung đọc mở được cắt của protein NS1 và trình tự Nep thu được từ virut A/Leningrad/134/47/57 (H2N2)

```

<400> 3
agcaaaaagca gggtgacaaa gacataatgg atccaaacac tgtgtcaagc tttcaggtag 60
attgcttttct ttggcatgtc cgcaaacgag ttgcagacca agaactaggt gatgccccat 120
tccttgatcg gcttcgccga gatcagaaat ccctaagagg aaggggcagc actcttggtc 180
tgacatcgga gacagccaca cgtgctggaa agcagatagt ggagcggatt ctgaaagaag 240
aatccgatga ggcacttaaa atgaccatgg cctctgtacc tgcgtcgcgt tacctaaccg 300
acatgactct tgaggaaatg tcaagggaat ggtccatgct catacccaag cagaaagtgg 360
caggccctct ttgtatcaga atggaccagg cgatcatgtg ataataaagt gtgatttttg 420
accggctgga gactctaata ttgctaaggg ctttcaccga agagggagca attgttggcg 480
aaatttcacc attgccttct cttccaggac atactaatga ggatgtcaaa aatgcaattg 540
gggtcctcat cggaggactt gaatggaatg ataacacagt tgcagtctct aaaactctac 600
agagattcgc ttggagaagc agtaatgaga atgggagacc tccactcact ccaaaacaga 660
aacggaaaat ggcgagaaca attaggtcaa aagttcgaag aaataagatg gctgattgaa 720
gaagtgagac acaaattgaa gataacagag aatagttttg agcaaataac atttatacaa 780
gccttacagc tactatttga agtggaacaa gagataagaa ctttctcgtt tcagcttatt 840
taataataaa aaacaccctt gtttctact 869

```

<210> 4
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Protein NS1 được cắt có đoạn cài ngoại lai

```

<400> 4
Met Asp Pro Asn Thr Val Ser Ser Phe Gln Val Asp Cys Phe Leu
1          5          10          15
Trp His Val Arg Lys Arg Val Ala Asp Gln Glu Leu Gly Asp Ala
20         25         30
Pro Phe Leu Asp Arg Leu Arg Arg Asp Gln Lys Ser Leu Arg Gly
35         40         45
Arg Gly Ser Thr Leu Gly Leu Asp Ile Glu Thr Ala Thr Arg Ala
50         55         60
Gly Lys Gln Ile Val Glu Arg Ile Leu Lys Glu Glu Ser Asp Glu
65         70         75
Ala Leu Lys Met Thr Met Ala Ser Val Pro Ala Ser Arg Tyr Leu
80         85         90
Thr Asp Met Thr Leu Glu Glu Met Ser Arg Glu Trp Ser Met Leu
95        100       105

```

Ile Pro Lys Gln Lys Val Ala Gly Pro Leu Cys Ile Arg Met Asp
 110 115 120
 Gln Ala Ile Met

<210> 5
 <211> 311
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Protein NS1 được cắt được kéo dài bởi trình tự đoạn dưới đơn vị của
 virut cúm A HA2

<400> 5
 Met Asp Pro Asn Thr Val Ser Ser Phe Gln Val Asp Cys Phe Leu
 1 5 10 15
 Trp His Val Arg Lys Arg Val Ala Asp Gln Glu Leu Gly Asp Ala
 20 25 30
 Pro Phe Leu Asp Arg Leu Arg Arg Asp Gln Lys Ser Leu Arg Gly
 35 40 45
 Arg Gly Ser Thr Leu Gly Leu Asp Ile Glu Thr Ala Thr Arg Ala
 50 55 60
 Gly Lys Gln Ile Val Glu Arg Ile Leu Lys Glu Glu Ser Asp Glu
 65 70 75
 Ala Leu Lys Met Thr Met Ala Ser Val Pro Ala Ser Arg Tyr Leu
 80 85 90
 Thr Asp Met Thr Leu Glu Glu Met Ser Arg Glu Trp Ser Met Leu
 95 100 105
 Ile Pro Lys Gln Lys Val Ala Gly Pro Leu Cys Ile Arg Met Asp
 110 115 120
 Gln Ala Ile Met Gly Gly Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe
 125 130 135
 Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr
 140 145 150
 His His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Gln Lys
 155 160 165
 Ser Thr Gln Asn Ala Ile Asn Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Thr
 170 175 180
 Val Ile Glu Lys Met Asn Ile Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu
 185 190 195
 Phe Asn Lys Leu Glu Lys Arg Met Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val
 200 205 210
 Asp Asp Gly Phe Leu Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu
 215 220 225
 Val Leu Leu Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn
 230 235 240
 Val Lys Asn Leu Tyr Glu Lys Val Lys Ser Gln Leu Lys Asn Asn
 245 250 255
 Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys
 260 265 270
 Asp Asn Glu Cys Met Glu Ser Val Arg Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr
 275 280 285
 Pro Lys Tyr Ser Glu Glu Ser Lys Leu Asn Arg Glu Lys Val Asp
 290 295 300
 Gly Val Lys Leu Glu Ser Met Gly Ile Tyr Gln
 305 310

<210> 6
 <211> 284

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Protein NS1 được cắt được kéo dài bởi trình tự đoạn dưới đơn vị của virus cúm A HA2

<400> 6

```

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

```

<210> 7

<211> 289

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Protein NS1 được cắt được kéo dài bởi trình tự đoạn dưới đơn vị của virus cúm A HA2

<400> 7

```

Met Asp Pro Asn Thr Val Ser Ser Phe Gln Val Asp Cys Phe Leu
 1          5          10          15
Trp His Val Arg Lys Arg Val Ala Asp Gln Glu Leu Gly Asp Ala
          20          25          30

```

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

Gly Ile Tyr Gln

<210> 8

<211> 294

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Protein NS1 được cắt được kéo dài bởi trình tự đoạn dưới đơn vị của virus cúm B HA2

<400> 8

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

Ile	Pro	Lys	Gln	Lys	Val	Ala	Gly	Pro	Leu	Cys	Ile	Arg	Met	Asp
				110					115					120
Gln	Ala	Ile	Met	Gly	Gly	Gly	Phe	Phe	Gly	Ala	Ile	Ala	Gly	Phe
				125					130					135
Leu	Glu	Gly	Gly	Trp	Glu	Gly	Met	Ile	Ala	Gly	Trp	His	Gly	Tyr
				140					145					150
Thr	Ser	His	Gly	Ala	His	Gly	Val	Ala	Val	Ala	Ala	Asp	Leu	Lys
				155					160					165
Ser	Thr	Gln	Glu	Ala	Ile	Asn	Lys	Ile	Thr	Lys	Asn	Leu	Asn	Ser
				170					175					180
Leu	Ser	Glu	Leu	Glu	Val	Lys	Asn	Leu	Gln	Arg	Leu	Ser	Gly	Ala
				185					190					195
Met	Asn	Gly	Leu	His	Asp	Glu	Ile	Leu	Glu	Leu	Asp	Glu	Lys	Val
				200					205					210
Asp	Asp	Leu	Arg	Ala	Asp	Thr	Ile	Ser	Ser	Gln	Ile	Glu	Leu	Ala
				215					220					225
Val	Leu	Leu	Ser	Asn	Glu	Gly	Ile	Ile	Asn	Ser	Glu	Asp	Glu	His
				230					235					240
Leu	Leu	Ala	Leu	Glu	Arg	Lys	Leu	Lys	Lys	Met	Leu	Gly	Pro	Ser
				245					250					255
Ala	Val	Glu	Ile	Gly	Asn	Gly	Cys	Phe	Glu	Thr	Lys	His	Lys	Cys
				260					265					270
Asn	Gln	Thr	Cys	Leu	Asp	Arg	Ile	Ala	Ala	Gly	Thr	Phe	Asn	Ala
				275					280					285
Gly	Asp	Phe	Ser	Leu	Pro	Thr	Phe	Asp						
				290										

<210> 9

<211> 158

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Protein NS1 được cắt được kéo dài bởi trình tự đoạn dưới đơn vị của virut cúm A HA2 và trình tự NP protein của epitop tế bào B của Virut cúm A

<400> 9

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

<210> 10

<211> 158
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Protein NS1 được cắt được kéo dài bởi trình tự đoạn dưới đơn vị của virut cúm A HA2 and trình tự NP protein của epitop tế bào B của Virut cúm A

<400> 10

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

<210> 11
 <211> 221
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Protein NS1 được cắt được kéo dài bởi trình tự protein Esat6 của mycobacterium tuberculosis

<400> 11

Met	Asp	Pro	Asn	Thr	Val	Ser	Ser	Phe	Gln	Val	Asp	Cys	Phe	Leu
1				5					10					15
Trp	His	Val	Arg	Lys	Arg	Val	Ala	Asp	Gln	Glu	Leu	Gly	Asp	Ala
				20					25					30
Pro	Phe	Leu	Asp	Arg	Leu	Arg	Arg	Asp	Gln	Lys	Ser	Leu	Arg	Gly
				35					40					45
Arg	Gly	Ser	Thr	Leu	Gly	Leu	Asp	Ile	Glu	Thr	Ala	Thr	Arg	Ala
				50					55					60
Gly	Lys	Gln	Ile	Val	Glu	Arg	Ile	Leu	Lys	Glu	Glu	Ser	Asp	Glu
				65					70					75
Ala	Leu	Lys	Met	Thr	Met	Ala	Ser	Val	Pro	Ala	Ser	Arg	Tyr	Leu
				80					85					90
Thr	Asp	Met	Thr	Leu	Glu	Glu	Met	Ser	Arg	Glu	Trp	Ser	Met	Leu
				95					100					105
Ile	Pro	Lys	Gln	Lys	Val	Ala	Gly	Pro	Leu	Cys	Ile	Arg	Met	Asp
				110					115					120
Gln	Ala	Ile	Met	Gly	Gly	Met	Thr	Glu	Gln	Gln	Trp	Asn	Phe	Ala
				125					130					135

Gly	Ile	Glu	Ala	Ala	Ala	Ser	Ala	Ile	Gln	Gly	Asn	Val	Thr	Ser
				140					145					150
Ile	His	Ser	Leu	Leu	Asp	Glu	Gly	Lys	Gln	Ser	Leu	Thr	Lys	Leu
				155					160					165
Ala	Ala	Ala	Trp	Gly	Gly	Ser	Gly	Ser	Glu	Ala	Tyr	Gln	Gly	Val
				170					175					180
Gln	Gln	Lys	Trp	Asp	Ala	Thr	Ala	Thr	Glu	Leu	Asn	Asn	Ala	Leu
				185					190					195
Gln	Asn	Leu	Ala	Arg	Thr	Ile	Ser	Glu	Ala	Gly	Gln	Ala	Met	Ala
				200					205					210
Ser	Thr	Glu	Gly	Asn	Val	Thr	Gly	Met	Phe	Ala				
				215					220					

<210> 12

<211> 238

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Protein NS1 được cắt được kéo dài bởi trình tự peptit tự cắt 2A và trình tự protein ESAT-6 của mycobacterium tuberculosis

<400> 12

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

<210> 13

<211> 172

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Protein NS1 được cắt được kéo dài bởi trình tự của Epitop tế bào T của virus hecpet (HSV) tuyp I và II

<400> 13

```

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

```

<210> 14

<211> 2341

<212> ADN

<213> Virus cúm A/PR/8/34 (H1N1)

<220>

<223> Trình tự nucleotit của đoạn PB2 hệ gen

<400> 14

```

agcgaaagca ggtcaattat attcaatatg gaaagaataa aagaactacg aaatctaattg      60
tcgcagtctc gcacccgcga gatactcaca aaaaccaccg tggaccatat ggccataatc      120
aagaagtaca catcaggaag acaggagaag aaccacgac ttaggatgaa atggatgatg      180
gcaatgaaat atccaattac agcagacaag aggataacgg aaatgattcc tgagagaaat      240
gagcaaggac aaacttttatg gagtaaaatg aatgatgccg gatcagaccg agtcatggtg      300
tcacctctgg ctgtgacatg gtggaatagg aatggacca taacaaatac agttcattat      360
ccaaaaatct acaaaaactta ttttgaaaga gtcgaaaggc taaagcatgg aacctttggc      420
cctgtccatt ttagaaacca agtcaaaata cgtcggagag ttgacataaa tcctgggtcat      480
gcagatctca gtgccaaagga ggcacaggat gtaatcatgg aagttgtttt ccctaacgaa      540
gtgggagcca ggatactaac atcggaatcg caactaacga taaccaaaga gaagaaagaa      600
gaactccagg attgcaaaat ttctcctttg atggttgcat acatgttgga gagagaactg      660
gtccgcaaaa cgagattcct cccagtggct ggtggaacaa gcagtgtgta cattgaagtg      720
ttgcatttga ctcaaggaac atgctgggaa cagatgtata ctccaggagg ggaagtgagg      780
aatgatgatg ttgatcaaa cttgattatt gctgctagga acatagtgag aagagctgca      840
gtatcagcag atccactagc atctttattg gagatgtgcc acagcacaca gattggtgga      900
attagatgg tagacatcct taggcagaac ccaacagaag agcaagccgt ggatatatgc      960
aaggctgcaa tgggactgag aattagctca tccttcagtt ttggtggatt cacattttaag      1020
agaacaagcg gatcatcagt caagagagag gaagagggtg ttacgggcaa tcttcaaaca      1080
ttgaagataa gaggatgata gggatatgaa gagttcacaa tgggtgggag aagagcaaca      1140
gccatactca gaaaagcaac caggagattg attcagctga tagtgagtgg gagagacgaa      1200

```

cagtcgattg	ccgaagcaat	aattgtggcc	atgggtat	cacaagagga	ttgtatgata	1260
aaagcagtca	gaggtgatct	gaatttcgtc	aatagggcga	atcaacgatt	gaatcctatg	1320
catcaacttt	taagacat	tcagaaggat	gcgaaagtgc	tttttcaaaa	ttggggagtt	1380
gaacctatcg	acaatgtgat	gggaatgatt	gggatattgc	ccgacatgac	tccaagcatc	1440
gagatgtcaa	tgagaggagt	gagaatcagc	aaaatgggtg	tagatgagta	ctccagcacg	1500
gagagggtag	tggtgagcat	tgaccgtttt	ttgagaatcc	gggaccaacg	aggaaatgta	1560
ctactgtctc	ccgaggaggt	cagtgaaaca	cagggaacag	agaaactgac	aataaacttac	1620
tcctcgtcaa	tgatgtggga	gattaatggt	cctgaatcag	tgttgggtcaa	tacctatcaa	1680
tggtatcatca	gaaactggga	aactgttaaa	attcagtggt	cccagaaccc	tacaatgcta	1740
tacaataaaa	tggaatttga	accatttcag	tcttttagtac	ctaaggccat	tagaggccaa	1800
tacagtgggt	ttgtaagaac	tctgttccaa	caaatgaggg	atgtgcttgg	gacatttgat	1860
accgcacaga	taataaaaact	tcttcccttc	gcagccgctc	caccaaagca	aagtagaatg	1920
cagttctcct	catttactgt	gaatgtgagg	ggatcaggaa	tgagaatact	tgtaaggggc	1980
aattctcctg	tattcaacta	taacaaggcc	acgaagagac	tcacagttct	cggaagggat	2040
gctggcactt	taactgaaga	cccagatgaa	ggcacagctg	gagtggagtc	cgctgttctg	2100
aggggattcc	tcattctggg	caaagaagac	aagagatatg	ggccagcact	aagcatcaat	2160
gaactgagca	accttgcgaa	aggagagaag	gctaattgtc	taattgggca	aggagacgtg	2220
gtgttggtaa	tgaaacggaa	acgggactct	agcatactta	ctgacagcca	gacagcgacc	2280
aaaagaattc	ggatggccat	caattagtgt	cgaatagttt	aaaaacgacc	ttgtttctac	2340
t						2341

<210> 15

<211> 2288

<212> ADN

<213> Virut cúm A/PR/8/34 (H1N1)

<220>

<223> Trình tự nucleotit của đoạn PB1 hệ gen

<400> 15

atggatgtca	atccgacctt	actttttctta	aaagtgccag	cacaaaatgc	tataagcaca	60
actttccctt	atactggaga	ccctccttac	agccatggga	caggaacagg	atacaccatg	120
gatactgtca	acaggacaca	tcagtactca	gaaaagggaa	gatggacaac	aaacaccgaa	180
actggagcac	cgcaactcaa	cccgattgat	gggccactgc	cagaagacaa	tgaaccaagt	240
ggttatgccc	aaacagattg	tgtattggag	gcgatggctt	tccttgagga	atcccacctc	300
ggtatttttg	aaaactcgtg	tattgaaacg	atggagggtt	ttcagcaaac	acgagtagac	360
aagctgacac	aaggccgaca	gacctatgac	tggactctaa	atagaaacca	acctgctgca	420
acagcattgg	ccaacacaat	agaagtgttc	agatcaaagt	gcctcacggc	caatgagtct	480
ggaaggctca	tagacttcct	taaggatgta	atggagtcaa	tgaacaaaga	agaaatgggg	540
atcacaaactc	attttcagag	aaagagacgg	gtgagagaca	atatgactaa	gaaaatgata	600
acacagagaa	caatgggtaa	aaagaagcag	agattgaaca	aaaggagtta	tctaattaga	660
gcattgaccc	tgaacacaat	gaccaaagat	gctgagagag	ggaagctaaa	acggagagca	720
attgcaaccc	cagggatgca	aataaggggg	tttgtatact	ttgttgagac	actggcaagg	780
agtatatgtg	agaaacttga	acaatcaggg	ttgccagttg	gaggcaatga	gaagaaagca	840
aagttggcaa	atggttgaag	gaagatgatg	accaattctc	aggacaccga	actttctttc	900
accatcactg	gagataaacac	caaatggaac	gaaaatcaga	atcctcggat	gtttttggcc	960
atgatcacat	atatgaccag	aaatcagccc	gaatgggttc	gaaatgttct	aagtattgct	1020
ccaataatgt	tctcaaacaa	aatggcgaga	ctgggaaaag	ggtatatgtt	tgagagcaag	1080
agtatgaaac	ttagaactca	aatacctgca	gaaatgctag	caagcatcga	tttgaaatat	1140
ttcaatgatt	caacaagaaa	gaagattgaa	aaaatccgac	cgctcttaat	agaggggact	1200
gcatcattga	gccctggaat	gatgatgggc	atgttcaata	tgtaagcac	tgtattaggc	1260
gtctccatcc	tgaatcttgg	acaaaagaga	tacaccaaga	ctacttactg	gtgggatggg	1320
cttcaatcct	ctgacgattt	tgctctgatt	gtgaatgcac	ccaatcatga	agggattcaa	1380
gccggagtcg	acaggtttta	togaacctgt	aagctacttg	gaatcaatat	gagcaagaaa	1440
aagtcttaca	taaacagaac	aggtacattt	gaattcacaa	gttttttcta	tcgttatggg	1500
tttgttgcca	atttcagcat	ggagcttccc	agttttgggg	tgtctgggat	caacgagtca	1560
gcggacatga	gtattggagt	tactgtcatc	aaaaacaaa	tgataaacia	tgatcttggt	1620
ccagcaacag	ctcaaattggc	ccttcagttg	ttcatcaaag	attacaggta	cacgtaccga	1680
tgccatagag	gtgacacaca	aatacaaac	cgaagatcat	ttgaaataaa	gaaactgtgg	1740
gagcaaaccc	gttccaaagc	tggactgctg	gtctccgacg	gaggcccaaa	tttatacaac	1800

attagaaatc	tccacattcc	tgaagtctgc	ctaaaatggg	aattgatgga	tgaggattac	1860
caggggcgtt	tatgcaaccc	actgaacca	tttgtcagcc	ataaagaaat	tgaatcaatg	1920
aacaatgcag	tgatgatgcc	agcacatggt	ccagccaaaa	acatggagta	tgatgctggt	1980
gcaacaacac	actcctggat	ccccaaaaga	aatcgatcca	tcttgaatac	aagtcaaaga	2040
ggagtacttg	aggatgaaca	aatgtaccaa	agggtgctgca	atattattga	aaaattcttc	2100
cccagcagtt	catacagaag	accagtcggg	atatccagta	tggtggaggc	tatggtttcc	2160
agagcccgaa	ttgatgcacg	gattgatttc	gaatctggaa	ggataaaaga	agaagagttc	2220
actgagatca	tgaagatctg	ttccaccatt	gaagagctca	gacggcaaaa	atagtgaatt	2280
tagcttgt						2288

<210> 16

<211> 2233

<212> ADN

<213> Virut cúm A/PR/8/34 (H1N1)

<220>

<223> Trình tự nucleotit của đoạn PA hệ gen

<400> 16

agcgaaagca	ggtactgac	caaaatggaa	gattttgtgc	gacaatgctt	caatccgatg	60
attgtcgagc	ttgcggaaaa	aacaatgaaa	gagtatggg	aggacctgaa	aatcgaaaca	120
aacaaatttg	cagcaatatg	cactcacttg	gaagtatgct	tcatgtattc	agattttcac	180
ttcatcaatg	agcaaggcga	gtcaataatc	gtagaacttg	gtgatccaaa	tgacttttg	240
aagcacagat	ttgaaataat	cgagggaaga	gatcgacaaa	tgccctggac	agtagtaaac	300
agtatttgca	acactacagg	ggctgagaaa	ccaaagtttc	taccagattt	gtatgattac	360
aaggagaata	gattcatcga	aattggagta	acaaggagag	aagttcacat	atactatctg	420
gaaaaggcca	ataaaattaa	atctgagaaa	acacacatcc	acattttctc	gttcaactgg	480
gaagaaatgg	ccacaaaggc	agactacact	ctcgatgaag	aaagcagggc	taggatcaaa	540
accagactat	tcaccataag	acaagaaaatg	gccagcagag	gcctctggga	ttcctttcgt	600
cagtccgaga	gaggagaaga	gacaattgaa	gaaaggtttg	aaatcacagg	aacaatgcgc	660
aagcttgccg	accaaagtct	cccgccgaac	ttctccagcc	ttgaaaattt	tagagcctat	720
gtggatggat	tcgaaccgaa	cggctacatt	gagggcaagc	tgtctcaaat	gtccaaagaa	780
gtaaatgcta	gaattgaacc	ttttttgaaa	acaacaccac	gaccacttag	acttccgaat	840
gggcctccct	gttctcagcg	gtccaaattc	ctgctgatgg	atgccttaaa	attaagcatt	900
gaggacccaa	gtcatgaagg	agagggaata	ccgctatatg	atgcaatcaa	atgcatgaga	960
acattctttg	gatggaagga	acccaatggt	gttaaaccac	acgaaaagg	aataaatcca	1020
aattatcttc	tgtcatggaa	gcaagtactg	gcagaactgc	aggacattga	gaatgaggag	1080
aaaattccaa	agactaaaaa	tatgaagaaa	acaagtcagc	taaagtgggc	acttggtgag	1140
aacatggcac	cagaaaagg	agactttgac	gactgtaaa	atgtaggtga	tttgaagcaa	1200
tatgatagt	atgaaccaga	attgaggtcg	ctagcaagtt	ggattcagaa	tgagtttaac	1260
aaggcatg	aactgacaga	ttcaagctgg	atagagctcg	atgagattgg	agaagatgtg	1320
gctccaattg	aacacattgc	aagcatgaga	aggaattatt	tcacatcaga	ggtgtctcac	1380
tgacagacca	cagaatacat	aatgaagggg	gtgtacatca	atactgcctt	gcttaatgca	1440
tcttgtgcag	caatggatga	tttccaatta	attccaatga	taagcaagtg	tagaactaag	1500
gagggaaagg	gaaagaccaa	cttgtatgg	ttcatcataa	aaggaagatc	ccacttaagg	1560
aatgacaccg	acgtggtaaa	ctttgtgagc	atggagtttt	ctctcactga	cccaagactt	1620
gaaccacata	aatgggagaa	gtactgtggt	cttgagatag	gagatatgct	tataagaagt	1680
gccataggcc	aggtttcaag	gcccattgtt	ttgtatgtga	gaacaaatgg	aacctcaaaa	1740
attaaaatga	aatggggaat	ggagatgagg	cgttgcctcc	tccagtcact	tcaacaaatt	1800
gagagtatga	ttgaagctga	gtcctctgtc	aaagagaaa	acatgaccaa	agagttcttt	1860
gagaacaaat	cagaaacatg	gcccattgga	gagccccca	aaggagtggg	ggaaagtccc	1920
attgggaagg	tctgcaggac	tttattagca	aagtcgggtat	tcaacagctt	gtatgcattc	1980
ccacaactag	aaggattttc	agctgaatca	agaaaactgc	ttcttatcgt	tcaggctctt	2040
agggacaacc	ttgaacctgg	gacctttgat	cttggggggc	tatatgaagc	aattgaggag	2100
tgccctgatta	atgatccctg	ggttttgctt	aatgcttctt	ggttcaactc	cttccttaca	2160
catgcattga	gttagttgtg	gcagtgtctac	tatttgctat	ccatactgtc	caaaaaagta	2220
ccttgtttct	act					2233

<210> 17

<211> 1027

<212> ADN

<213> Virut cúm A/PR/8/34 (H1N1)

<220>

<223> Trình tự nucleotit của đoạn NP hệ gen

<400> 17

```

agcgaaagca ggtagatatt gaaagatgag tcttctaacc gaggtcgaaa cgtacgtact      60
ctctatcatc ccgtcaggcc ccctcaaagc cgagatcgca cagagacttg aagatgtctt      120
tgcagggaag aacactgacg ttgagggttct catggaatgg ctaaagacaa gaccaatcct      180
gtcacctctg actaagggga ttttaggatt tgtgttcacg ctcaccgtgc ccagtgcgagc      240
aggactgcag cgtagacgct ttgtccaaaa tgcccttaat gggaacgggg atccaaataa      300
catggacaaa gcagttaaac tgtataggaa gctcaagagg gagataacat tccatggggc      360
caaagaaatc tactcagtt attctgctgg tgcacttgcc agttgtatgg gcctcatata      420
caacaggatg ggggctgtga ccactgaagt ggcatttgcc ctggtatgtg caacctgtga      480
acagattgct gactcccagc atcgggtctca taggcaaatg gtgacaacaa ccaatccact      540
aatcagacat gagaacagaa tgggttttagc cagcactaca gctaaggcta tggagcaaat      600
ggctggatcg agtgagcaag cagcagaggc catggagggt gctagtcagg ctagacaaat      660
ggtgcaagcg atgagaacca ttgggactca tcctagctcc agtgctgggtc tgaaaaatga      720
tcttcttgaa aatttgcagg cctatcagaa acgaatgggg gtgcagatgc aacggttcaa      780
gtgacacctc cgctattgcc gcaaatatca ttgggatctt gcacttgaca ttgtggattc      840
ttgatcgctc ttttttcaaa tgcatttacc gtcgctttaa atacggactg aaaggagggc      900
cttctacgga aggagtgcc aagtctatga gggaagaata tcgaaaggaa cagcagagtg      960
ctgtggatgc tgacgatggt cattttgtca gcatagagct ggagtaaaaa actaccttgt      1020
ttctact                                     1027

```

<210> 18

<211> 1027

<212> ADN

<213> Virut cúm A/PR/8/34 (H1N1)

<220>

<223> Trình tự nucleotit của đoạn M hệ gen

<400> 18

```

agcgaaagca ggtagatatt gaaagatgag tcttctaacc gaggtcgaaa cgtacgtact      60
ctctatcatc ccgtcaggcc ccctcaaagc cgagatcgca cagagacttg aagatgtctt      120
tgcagggaag aacactgacg ttgagggttct catggaatgg ctaaagacaa gaccaatcct      180
gtcacctctg actaagggga ttttaggatt tgtgttcacg ctcaccgtgc ccagtgcgagc      240
aggactgcag cgtagacgct ttgtccaaaa tgcccttaat gggaacgggg atccaaataa      300
catggacaaa gcagttaaac tgtataggaa gctcaagagg gagataacat tccatggggc      360
caaagaaatc tactcagtt attctgctgg tgcacttgcc agttgtatgg gcctcatata      420
caacaggatg ggggctgtga ccactgaagt ggcatttgcc ctggtatgtg caacctgtga      480
acagattgct gactcccagc atcgggtctca taggcaaatg gtgacaacaa ccaatccact      540
aatcagacat gagaacagaa tgggttttagc cagcactaca gctaaggcta tggagcaaat      600
ggctggatcg agtgagcaag cagcagaggc catggagggt gctagtcagg ctagacaaat      660
ggtgcaagcg atgagaacca ttgggactca tcctagctcc agtgctgggtc tgaaaaatga      720
tcttcttgaa aatttgcagg cctatcagaa acgaatgggg gtgcagatgc aacggttcaa      780
gtgacacctc cgctattgcc gcaaatatca ttgggatctt gcacttgaca ttgtggattc      840
ttgatcgctc ttttttcaaa tgcatttacc gtcgctttaa atacggactg aaaggagggc      900
cttctacgga aggagtgcc aagtctatga gggaagaata tcgaaaggaa cagcagagtg      960
ctgtggatgc tgacgatggt cattttgtca gcatagagct ggagtaaaaa actaccttgt      1020
ttctact                                     1027

```

<210> 19

<211> 1701

<212> ADN

<213> Virut cúm giống A/California/09 (H1N1pdm)

<220>

<223> Trình tự nucleotit của HA hệ gen

<400> 19

atgaaggcaa	tactagtagt	tctgctatat	acatttgcaa	ccgcaaatgc	agacacatta	60
tgtataggtt	atcatgcaaa	caattcaaca	gacactgtag	acacagtact	agaaaagaat	120
gtaacagtaa	cacactctgt	taaccttcta	gaagacaagc	ataacgggaa	actatgcaaa	180
ctaagagggg	tagccccatt	gcatttgggg	aaatgtaaca	ttgctggctg	gatcctggga	240
aatccagagt	gtgaatcact	ctccacagca	agttcatggt	cctacattgt	ggaaacatct	300
agttcagaca	atggaacgtg	ttacccagga	gatttcatca	attatgagga	gctaagagag	360
caattgagct	cagtgtcatc	atttgaaagg	tttgagatat	tccccaaaac	aagttcatgg	420
cccaatcatg	actcgaacaa	aggtgtaacg	gcagcatgtc	ctcacgctgg	agcaaaaagc	480
ttctacaaaa	atttaatatg	gctagttaaa	aaaggaaatt	catacccaaa	gctcagccaa	540
tcctacatta	atgataaagg	gaaagaagtc	ctcgtgctgt	ggggcattca	ccatccatct	600
actactgctg	accaacaaag	tctctatcag	aatgcagatg	catatgtttt	tgtggggaca	660
tcaagataca	gcaagaagtt	caagccggaa	atagcaataa	gacccaaaag	gagggatcaa	720
gaagggagaa	tgaactatta	ctggacacta	gtagagccgg	gagacaaaat	aacattcgaa	780
gcaactggaa	atctagtggg	accgagatat	gcattcacaa	tggaaagaaa	tgctggatct	840
ggtattatca	tttcagatac	accagtccac	gattgcaata	caacttgtca	gacacccgag	900
ggtgctataa	acaccagcct	cccatttcag	aatatacatc	cgatcacaa	tggaaaatgt	960
ccaaagtatg	taaaaagcac	aaaattgaga	ctggccacag	gattgaggaa	tgtcccgtct	1020
attcaatcta	gaggcctatt	cggggccatt	gccggcttca	ttgaaggggg	gtggacaggg	1080
atggtagatg	gatggtacgg	ttatcaccat	caaaatgagc	aggggtcagg	atatgcagcc	1140
gacctgaaga	gcacacaaaa	tgccattgac	aagattacta	acaaagtaaa	ctctgttatt	1200
gaaaagatga	atacacagtt	cacagcagtg	ggtaaagagt	tcaaccacct	ggaaaaaaga	1260
atagagaatt	taaataaaaa	agttgatgat	ggtttcctgg	acatttggac	ttacaatgcc	1320
gaactgttgg	ttctatttga	aaatgaaaga	actttggact	accatgattc	aaatgtgaag	1380
aacttgtatg	aaaaggtaag	aaaccagtta	aaaaacaatg	ccaaggaaat	tggaaacggc	1440
tgctttgaat	tttaccacaa	atgcgataac	acgtgcatgg	aaagtgtcaa	aaatgggact	1500
tatgactacc	caaaatactc	agaggaagca	aaattaaaca	gagaaaaaat	agatggggta	1560
aagctggaat	caacaaggat	ttaccagatt	ttggcgatct	attcaactgt	cgccagttca	1620
ttggtgctgg	tagtctccct	gggggcaatc	agcttctgga	tgtgctctaa	tgggtctcta	1680
cagtgtagaa	tatgtattta	a				1701

<210> 20

<211> 1410

<212> ADN

<213> Virut cúm giống A/California/09 (H1N1pdm)

<220>

<223> Trình tự nucleotit của đoạn NA hệ gen

<400> 20

atgaatccaa	accaaaagat	aataaccatt	ggttcgggtct	gtatgacaat	tggaatggct	60
aacttaatat	tacaaattgg	aaacataatc	tcaatatgga	ttagccactc	aattcaagtt	120
gggaatcaaa	gtcagatcga	aacatgcaat	caaagcgtca	ttacttatga	aaacaacact	180
tgggtaaatc	agacatatgt	taacatcagc	aacaccaact	ttgctgctgg	gcagccagtg	240
gtttccgtga	aattagcggg	caattcctct	ctctgcctcg	ttagtggatg	ggctatatac	300
agtaaagaca	acagtgtaag	agtcggttcc	aagggggatg	tgtttgtcat	aagggaaacca	360
ttcatatcat	gtccccctt	ggaatgcaga	accttcttct	tgactcaagg	ggccttgcta	420
aatgacaaac	attccaatgg	aaccattaaa	gacaggagcc	catatcgaac	cttaatgagc	480
tgtcctattg	gtgaagttcc	ctctccatac	aactcaagat	ttgagtcagt	cgcttgggtca	540
gcaagtgcct	gtcatgatgg	catcaattgg	ctaacaattg	gaatttctgg	cccagacagt	600
ggggcagtg	ctgtgtttaa	gtacaacggc	ataataacag	acactatcaa	gagttggaga	660
aacgatatat	tgagaacaca	agagtctgaa	tgtgcatgtg	taaatgggtc	ttgctttacc	720
ataatgaccg	atggaccaag	tgatggacag	gcctcataca	agatcttcag	aatagaaaag	780
ggaaagatag	tcaaatcagt	cgaaatgaat	gcccctaatt	atcactatga	ggaatgctcc	840
tgttatcctg	attctagtga	aatcacatgt	gtgtgcaggg	ataactggca	tggctcgaat	900
cgaccgtggg	tgtctttcaa	ccagaatctg	gaatatcaga	taggatacat	atgcagtg	960
atthttcgag	acaatccacg	ccctaattgat	aagacaggca	gttgtgggtc	agtatcgctc	1020
aatggagcaa	atggagtaaa	aggattttca	ttcaaatacg	gcaatgggtg	ttggatagg	1080
agaactaaaa	gcattagttc	aagaaaaggt	tttgagatga	tttgggatcc	aaatggatgg	1140

actgggacag	acaataactt	ctcaataaag	caagatatcg	taggaataaa	tgagtgggtca	1200
ggatatagcg	ggagttttgt	tcagcatcca	gaactaacag	ggctggattg	tataagacct	1260
tgcttctggg	ttgaactaat	cagagggcga	cccaaagaga	acacaatctg	gactagtggg	1320
agcagcatat	ccttttgtgg	tgtaaacagt	gacactgtgg	gttggtcttg	gccagacggt	1380
gctgagttgc	catttaccat	tgacaagtaa				1410

<210> 21

<211> 979

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nucleotit của đoạn NS hệ gen

<400> 21

agcaaaagca	gggtgacaaa	gacataatgg	atccaaacac	tgtgtcaagc	tttcaggtag	60
attgctttct	ttggcatgtc	cgcaaacgag	ttgcagacca	agaactaggt	gatgccccat	120
tccttgatcg	gcttcgccga	gatcagaaat	ccctaagagg	aaggggcagc	actccttggtc	180
tggacatcga	gacagccaca	cgtgctggaa	agcagatagt	ggagcggatt	ctgaaagaag	240
aatccgatga	ggcacttaaa	atgaccatgg	cctctgtacc	tgcgtcgcgt	tacctaaccg	300
acatgactct	tgaggaaatg	tcaagggaat	ggtccatgct	catacccaag	cagaaagtgg	360
caggccctct	ttgtatcaga	atggaccagg	cgatcatggg	aggaggtttc	ttcggagcta	420
ttgctgggtt	cttggaagga	ggatgggaag	gaatgattgc	aggttgggga	ggaagagaga	480
gccggaaccc	agggaatgct	tgataataag	cggccgcagt	gtgatttttg	accggctgga	540
gactctaata	ttgctaaggg	ctttcaccga	agagggagca	attgttggcg	aaatttcacc	600
attgccttct	cttccaggac	atactaataga	ggatgtcaaa	aatgcaattg	gggtcctcat	660
cggaggactt	gaatggaatg	ataacacagt	tcgagtctct	aaaactctac	agagattcgc	720
ttggagaagc	agtaatgaga	atgggagacc	tccactcact	ccaaaacaga	aacggaaaat	780
ggcgagaaca	attaggtcaa	aagttcgaag	aaataagatg	gctgattgaa	gaagtgaac	840
acaaattgaa	gataacagag	aatagttttg	agcaaataac	atztatataca	gccttacagc	900
tactattttga	agtggaacaa	gagataagaa	ctttctcggt	tcagcttatt	taataataaa	960
aaacaccctt	gtttctact					979