



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

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

(11)



1-0036269

(51)⁷ C12N 15/863; A61K 39/00; A61K
39/275

(13) B

(21) 1-2017-02500

(22) 18/12/2015

(86) PCT/EP2015/080468 18/12/2015

(87) WO 2016/097281 23/06/2016

(30) EP14307110.8 19/12/2014 EP

(45) 25/07/2023 424

(43) 25/10/2017 355A

(73) Ceva Sante Animale (FR)

10 avenue de la Ballastière, 33500 Libourne, France

(72) SATO, Takanori (JP).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) VIRUT GÂY BỆNH ĐẬU LỢN TÁI TỔ HỢP VÀ CHẾ PHẨM VACXIN CHỨA
VIRUT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến virat gây bệnh đậu lợn tái tổ hợp và ứng dụng của chúng trong các chế phẩm vacxin. Virut gây bệnh đậu lợn tái tổ hợp theo sáng chế được tạo ra bằng cách chèn một hoặc nhiều gen ngoại lai vào gen protein liên kết IL-18 (IL18bp) của virut gây bệnh đậu lợn. Sáng chế đặc biệt phù hợp để tạo ra vacxin cho lợn, đặc biệt là dùng để chủng ngừa cho lợn kháng lại bệnh lây nhiễm PCV2.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến virus gây bệnh đậu lợn tái tổ hợp và ứng dụng của chúng trong các chế phẩm vaccin. Virus gây bệnh đậu lợn tái tổ hợp theo sáng chế được tạo ra bằng cách chèn một hoặc nhiều gen ngoại lai vào gen protein liên kết IL-18 (IL18bp) của virus gây bệnh đậu lợn. Sáng chế đặc biệt phù hợp để sản xuất vaccin cho lợn, đặc biệt là dùng để chủng ngừa cho lợn kháng lại bệnh lây nhiễm PCV2.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các loại virus khác nhau được đề xuất trong lĩnh vực kỹ thuật này với vai trò là các vector dùng để phân phối gen hoặc biểu hiện peptit *in vivo*. Cụ thể, vaccin thú y được bào chế mà biểu hiện ít nhất một kháng nguyên có liên quan bằng cách sử dụng các virus tái tổ hợp như poxvirus (Ogawa R. et al., Vaccine, 8:486-490 (1990)), adenovirus (HSU, K. H. et al., Vaccine, 12; 607-612 (1994)), baculovirus, cũng như virus herpes (Shin, M. -F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81:5867-5870 (1984)). Ví dụ về các vector virus đặc hiệu cho phép biểu hiện gen đối với kháng nguyên ngoại lai bao gồm virus gây bệnh Aujeszky (virus gây bệnh giả dại; PRV) (Van Zijl M. et al., J. Virol., 65:2761-2765 (1991)), virus herpes ở gà tây (HVT) (Morgan R. W. et al., Avian Dis. 36:858-870 (1992)), và virus gây bệnh Marek (MDV). Các vector tái tổ hợp dựa trên chi virus herpes đang được nghiên cứu thêm.

Tuy nhiên, trong lĩnh vực kỹ thuật này, cần có các sản phẩm vector từ virus mới mà có thể được sử dụng để biểu hiện peptit hoặc protein tái tổ hợp *in vivo*. Về khía cạnh này, poxvirus được thiết kế để mã hóa các polypeptit khác nhau. Poxvirus, ngay khi được giải phóng vào trong máu từ các tế bào bị lây nhiễm, có thể lây nhiễm sang các tế bào khác và do đó có khả năng làm cho mức biểu hiện tăng. Poxvirus tái tổ hợp được tạo ra từ các loại poxvirus khác nhau, bao gồm virus gây bệnh đậu mùa, virus gây bệnh đậu bò, và virus gây bệnh đậu lợn (swinepox virus - SPV). Tuy nhiên, cho đến nay, dạng tái tổ hợp của SPV được tạo ra chủ yếu bằng cách nhân dòng vô tính các trình tự gen ngoại lai trong

vùng di truyền, vùng này được xem là không cần thiết đối với sự sống của SPV, vùng TK (Richard W. Moyer, Eladio Vinuela, E. P. J. Gibbs, US 5,651,972 (1997)).

Hiện nay, các tác giả sáng chế đã phát hiện và công nhận vùng chèn gen mới của SPV tại đó nhiều trình tự gen ngoại lai có thể được chèn vào. Virut SPV tái tổ hợp tạo thành cho phép biểu hiện hiệu quả và ổn định trình tự gen được nhân dòng vô tính, và có khả năng nhân dòng lớn. Ngoài ra, các virut này cải thiện tính sinh miễn dịch *in vivo* và có thể được sử dụng để tạo ra các chất trị liệu hoặc vacxin dùng để điều trị cho động vật có vú bất kỳ, đặc biệt là lợn.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến virut gây bệnh đậu lợn tái tổ hợp mới và ứng dụng của chúng để phân phối và biểu hiện gen *in vivo*, cụ thể là trong chế phẩm vacxin. Các virut gây bệnh đậu lợn tái tổ hợp theo sáng chế chứa một hoặc nhiều trình tự gen ngoại lai mà được chèn vào gen protein liên kết IL-18 (IL18bp) của virut gây bệnh đậu lợn. Sáng chế đặc biệt phù hợp để sản xuất vacxin cho lợn, đặc biệt là dùng để chủng ngừa cho lợn kháng lại bệnh lây nhiễm PCV2.

Do đó, mục đích thứ nhất của sáng chế là đề cập đến virut gây bệnh đậu lợn tái tổ hợp (rSPV) chứa ít nhất một trình tự gen ngoại lai thứ nhất trong hệ gen của nó, trong đó trình tự gen ngoại lai thứ nhất này được chèn vào gen IL18bp trong hệ gen của rSPV. Theo một phương án cụ thể, trình tự gen ngoại lai này được chèn vào thay thế cho tất cả hoặc một phần trình tự gen IL18bp của virut. Theo một phương án cụ thể hơn, rSPV theo sáng chế còn chứa ít nhất một trình tự gen ngoại lai thứ hai được chèn vào vùng khác biệt trong hệ gen của rSPV, ví dụ vào gen Thymidin kinaza (TK) của virut hoặc gen protein lặp Ankyrin.

Mục đích khác của sáng chế là đề cập đến phân tử axit nucleic bao gồm hệ gen của rSPV như được mô tả ở trên.

Mục đích khác của sáng chế là đề cập đến tế bào chủ chứa rSPV hoặc phân tử axit nucleic theo sáng chế.

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp tạo ra rSPV, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho lây nhiễm hoặc đưa phân tử axit nucleic vào tế bào khả biến như được mô tả ở trên và thu rSPV.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp nhân giống rSPV, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho lây nhiễm rSPV vào tế bào khả biến như được mô tả ở trên và thu rSPV được tạo ra bởi các tế bào này.

Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm, tốt hơn là chế phẩm thú y, chứa rSPV như được mô tả ở trên, hoặc tế bào như được mô tả ở trên, hoặc phân tử axit nucleic như được mô tả ở trên, và tá dược.

Mục đích khác của sáng chế là đề cập đến chế phẩm vaccin chứa rSPV như được định rõ ở trên, hoặc tế bào như được mô tả ở trên, hoặc phân tử axit nucleic như được mô tả ở trên, tá dược thích hợp và, tùy ý, chất phụ trợ.

Sáng chế cũng đề cập đến rSPV hoặc tế bào hoặc phân tử axit nucleic như được mô tả ở trên dùng để phân phối peptit hoặc protein có tác dụng điều trị hoặc chủng ngừa cho lợn.

Sáng chế cũng đề cập đến rSPV hoặc tế bào hoặc phân tử axit nucleic như được mô tả ở trên dùng để gây miễn dịch hoặc chủng ngừa cho lợn kháng lại nguồn bệnh.

Sáng chế cũng đề cập đến bộ kit chủng ngừa để gây miễn dịch cho lợn bao gồm các thành phần sau đây:

- a. rSPV ở lượng cho hiệu quả hoặc vaccin như được mô tả ở trên, và
- b. dụng cụ để phân phối rSPV hoặc vaccin nêu trên vào lợn.

Mục đích khác của sáng chế là đề cập đến plasmit hoặc vector con thoi chứa gen chuyển được chặn bởi hai trình tự axit nucleic tương đồng với trình tự gen IL18bp, các trình tự chặn này cho phép sự tái tổ hợp tương đồng giữa plasmit con thoi và hệ gen của SPV.

Sáng chế có thể được sử dụng để phân phối và biểu hiện trình tự gen ngoại lai bất kỳ vào động vật có vú, đặc biệt là lợn. Việc này đặc biệt phù hợp đối với việc biểu hiện

kháng nguyên ngoại lai để gây miễn dịch hoặc chủng ngừa cho lợn (ví dụ, lợn, lợn con, lợn nái).

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1. Thể hiện cấu trúc của plasmid tương đồng pSP92-Ess_ORF2.

Fig.2. Thể hiện cấu trúc của plasmid tương đồng pSP911-Ess_ORF2.

Fig.3. Minh họa cấu trúc hệ gen của SPV gốc và SPV tái tổ hợp.

Fig.4. Thể hiện kết quả phân tích thấm tách Western (Western blotting) của SVR12 và SVR13 đã được tinh chế.

Các tế bào ESK-4 được cho lây nhiễm với SPV (p) gốc, dòng vô tính 1H2C9D4G5 (G5) của SVR12 hoặc dòng vô tính 2F5D5E5 (E5) của SVR12, hoặc dòng vô tính G2C2D4 (D4) của SVR13, hoặc dòng vô tính D10E5A5 (A5) của SVR13. Sáu ngày sau đó, dịch tan tế bào được nạp vào SDS-PAGE 15% và tiến hành phân tích thấm tách Western bằng cách sử dụng kháng thể thứ cấp kháng IgG của chuột thường ở dê được tiếp hợp biotin (1:1000), kháng ORF2 ở chuột thường (1:500), và ABC-ALP (Vecterstain). M: chỉ thị trọng lượng phân tử.

Fig. 5. Thể hiện kết quả kiểm tra sự cấy chuyển rSPV *in vitro* bằng kỹ thuật PCR.

(A) Kết quả PCR: kỹ thuật PCR được tiến hành bằng cách sử dụng bộ môi gồm SP7450F và SP8552R. Mỗi khuôn mẫu là ADN của virus trong một lần cấy chuyển *in vitro* +0 hoặc +15p của dòng vô tính 1H2C7F3E5 (E5), dòng vô tính 2F5D5E5G5 (G5) của SVR12, và dòng vô tính G2C2D4 (D4), hoặc dòng vô tính D10E5A5 (A5) của SVR13. Mỗi plasmid chuyển khi chuyển nhiễm để tạo ra SVR12 hoặc SVR13, và pCR4-SPV6030/9574, được sử dụng làm khuôn mẫu của đối chứng dương (PC) hoặc đối chứng âm (NC), một cách tương ứng. Chỉ thị trọng lượng phân tử là 10kb (M1) và pHY. (B) Các vùng chặn IL-18bp của SPV gốc và rSPV. Đoạn màu vàng là gen IL-18bp.

Fig.6. Thể hiện sự phát triển tương đối của rSPV trong các tế bào Vero.

Các tế bào Vero trong đĩa có 6 lỗ được cho lây nhiễm với mỗi loại trong số ba loại SPV tái tổ hợp, SVR3, SVR7 hoặc SVR12, ở MOI cao (khoảng 0,01) hoặc thấp (khoảng 0,001). Vào các ngày 0, 4, 7, 11 và 14 sau khi lây nhiễm (DPI), mỗi tế bào bị lây nhiễm

và dịch nổi bề mặt được thu bằng que gạt tế bào, và được kết đông và làm tan rã. Đối với việc chuẩn độ virus, dịch tan tế bào này sau khi ly tâm được pha loãng nhiều lần, và được lây nhiễm vào các tế bào ESK-4 và được ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 1 tuần để tạo ra các mảng. Tỷ lệ sinh trưởng tương đối được tính toán trên cơ sở mỗi độ chuẩn là 0 DPI.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến virus gây bệnh đậu lợn tái tổ hợp mới và ứng dụng của chúng. Virus gây bệnh đậu lợn tái tổ hợp theo sáng chế chứa một hoặc nhiều trình tự gen ngoại lai mà được chèn vào gen protein liên kết IL-18 (IL18bp) của virus gây bệnh đậu lợn. Như được thể hiện trong phần thử nghiệm, vector SPV mới này cho phép biểu hiện gen hiệu quả và bền vững. Ngoài ra, rSPV theo sáng chế là ổn định và có thể tạo ra đáp ứng miễn dịch được cải thiện *in vivo*. Hơn nữa, đáng ngạc nhiên là các vector SPV theo sáng chế an toàn hơn so với các SPV trước đây do chúng không phát triển trong các tế bào động vật có vú như các tế bào Vero. Đây là báo cáo đầu tiên về virus SPV chứa gen IL18-bp được làm khuyết, và bước đầu chứng minh được rằng các trình tự gen ngoại lai có thể được nhân dòng vô tính ở vị trí này tạo ra vector SPV tái tổ hợp ổn định, sinh miễn dịch, và có thể sản xuất ở quy mô lớn. rSPV theo sáng chế còn có thể chứa nhiều hơn một trình tự gen ngoại lai, được chèn vào cùng một vị trí hoặc các vị trí khác biệt. Chúng có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp với các virus tái tổ hợp khác hoặc các kháng nguyên để tạo ra vắc xin cải tiến. Sáng chế đặc biệt phù hợp để tạo ra vắc xin cho lợn, đặc biệt là dùng để chủng ngừa cho lợn kháng lại bệnh lây nhiễm PCV2.

rSPV

Theo sáng chế, virus gây bệnh đậu lợn tái tổ hợp thường dùng để chỉ virus gây bệnh đậu lợn có hệ gen được thiết kế nhân tạo (ví dụ, tái tổ hợp). Đặc biệt, rSPV bao gồm virus gây bệnh đậu lợn chứa vật liệu hoặc trình tự di truyền ngoại lai trong hệ gen của chúng. rSPV thường bao gồm hệ gen của SPV chứa trình tự di truyền ngoại lai, được bao gói trong capsit hoặc vỏ của SPV, có thể cũng chứa protein hoặc peptit ngoại lai.

rSPV theo sáng chế có thể được tạo ra bắt đầu từ SPV bất kỳ, như các SPV bất kỳ có trong tự nhiên hoặc SPV bất kỳ có sẵn trong bộ sưu tập như ATCC, CNCM, v.v.. Tốt hơn là, rSPV theo sáng chế được tạo ra từ chủng SPV kasza (VR-363), chủng phân lập

17077-99 (Số nộp lưu ngân hàng gen: AF410153.1), hoặc chủng VTCC/AVA/121 (Số nộp lưu ngân hàng gen: KJ725378.1). Các SPV này có sẵn trong các bộ sưu tập hoặc thư viện, hoặc có thể được nhân dòng vô tính từ trình tự hệ gen có sẵn được công bố. Các chủng phân lập SPV khác cũng có thể được phân lập từ động vật bị nhiễm bệnh và được sử dụng để tạo ra rSPV theo sáng chế.

SPV hoặc rSPV có thể được nuôi cấy hoặc duy trì hoặc nhân giống trong tế bào thích hợp bất kỳ. Ví dụ, SPV có thể được nuôi cấy, duy trì hoặc nhân giống trong các tế bào thận phôi lợn, như các tế bào ESK-4 (CL-184), thường được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong CO₂ 5% trong môi trường F-12K của Ham (Gibco, Cat. No.: 21127-022) được bổ sung streptomycin-penicillin 1% (Gibco, Cat. No.: 15140-122) và FBS 5% (Gibco, Cat. No.: 10437-028).

Để tạo cấu trúc virus tái tổ hợp theo sáng chế, ban đầu, virus SPV có thể được nhân giống trong tế bào chủ thích hợp và sau đó thu ADN của hệ gen. Sau đó, vùng IL18bp trong ADN của hệ gen được nhận biết, tùy ý được làm khuyết, tất cả hoặc một phần, và trình tự gen ngoại lai (hoặc vị trí nhân dòng vô tính cho phép chèn trình tự gen ngoại lai) được chèn vào vùng này, tùy ý thay thế tất cả hoặc một phần trình tự gen IL18bp nội sinh. Do đó, hệ gen của SPV tái tổ hợp thu được có thể được sử dụng để tạo ra rSPV bằng cách biến nạp các tế bào khả biến thích hợp theo các kỹ thuật thông thường. Theo cách khác, vector con thoi có thể được tạo ra chứa trình tự gen ngoại lai (hoặc vị trí nhân dòng vô tính) được chặn bởi các trình tự tương đồng với vùng gen IL18bp. Nhờ việc đưa vào tế bào khả biến với sự có mặt của virus hoặc hệ gen của SPV, mà sự tái tổ hợp tương đồng giữa vector con thoi và hệ gen tạo ra rSPV. Tất nhiên, ngay khi rSPV được thiết kế như được mô tả ở trên, nó có thể dễ dàng được sao chép và nhân giống bằng môi trường nuôi cấy đơn giản trên các tế bào khả biến bất kỳ.

SPV có thể được nuôi cấy, duy trì hoặc nhân giống trong các tế bào thận phôi lợn, như các tế bào ESK-4 (CL-184), thường được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong CO₂ 5% trong môi trường F-12K của Ham (Gibco, Cat. No.: 21127-022) được bổ sung streptomycin-penicillin 1% (Gibco, Cat. No.: 15140-122) và FBS 5% (Gibco, Cat. No.: 10437-028). ADN có thể được chiết từ các tế bào nhiễm virus theo phương pháp thông thường bất kỳ. Ví dụ, các tế bào được phát triển trên các lớp đơn có thể được gạt và sau

đó được quay để thu dịch nổi bề mặt. Sau khi protein được làm biến tính trong đệm phân giải và được loại bỏ, ADN có thể được chiết bằng phenol và/hoặc etanol.

Gen IL18bp trên ADN của virus SPV chứa khoảng 402 cặp bazơ nitơ, và thường được định vị ở các gốc nucleotit từ 7745 đến 8146 trong hệ gen của SVP. Gen IL18bp được định vị ở nucleotit từ 7745 đến 8146 là một ví dụ cụ thể ở chủng SPV kasza (VR-363).

Theo một phương án cụ thể, rSPV theo sáng chế chứa trình tự gen ngoại lai được chèn ở vị trí giữa nucleotit 7750 và nucleotit 8140 trong hệ gen của SPV. Việc chèn trình tự gen ngoại lai này gây ra quãng ngắt trong trình tự gen IL18bp tự nhiên, thường ngăn chặn sự biểu hiện của IL18bp chức năng. Theo phương án được ưu tiên, trình tự gen ngoại lai được chèn thay thế cho trình tự gen IL18bp. Về mặt này, rSPV được ưu tiên theo sáng chế chứa đoạn khuyết gồm ít nhất từ 10 đến khoảng 400 nucleotit trong trình tự gen IL18bp của hệ gen, và trình tự gen ngoại lai được định vị thay cho trình tự được làm khuyết.

rSPV được ưu tiên theo sáng chế bao gồm trình tự gen ngoại lai được chứa trong gen IL18bp, trong đó gen IL18bp nội sinh thiếu ít nhất là 50 nucleotit, tốt hơn là ít nhất 100 nucleotit, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 150 nucleotit, ít nhất là 200 nucleotit, ít nhất là 250 nucleotit, ít nhất là 300 nucleotit, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 320 nucleotit đến 380 nucleotit.

rSPV đặc hiệu và được ưu tiên theo sáng chế chứa đoạn khuyết gồm ít nhất là từ 100 đến 200 nucleotit trên gen IL18bp, thậm chí tốt hơn nữa là gồm ít nhất từ 50 đến 300 nucleotit trên gen IL18bp, như từ 19 đến 369 nucleotit trên gen IL18bp.

Việc tạo cấu trúc rSPV theo sáng chế có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật, theo hướng dẫn và thông tin được mô tả trong sáng chế. Cụ thể, người có hiểu biết trung bình có thể chèn trình tự gen ngoại lai vào trình tự IL18bp, thay thế cho tất cả hoặc một phần của trình tự nội sinh, bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết như phương pháp phát sinh đột biến, PCR, tái tổ hợp tương đồng, v.v..

Theo phương án cụ thể, vector con thoi được tạo ra bằng kỹ thuật ADN tái tổ hợp, trong đó trình tự gen ngoại lai đã nhân dòng vô tính được chặn bởi hai vùng tương đồng IL18bp. Các vùng tương đồng này thường chứa từ 50 đến 1000 nucleotit của trình tự gen IL18bp, cho phép sự tái tổ hợp tương đồng đặc hiệu. Vector con thoi này có thể được tạo ra từ plasmid, cosmit, thể thực khuẩn bất kỳ thông thường hoặc đã biết và các dạng tương tự, như plasmid pBS, pBR322, pUC18, pUC19 và pHc79. Plasmid con thoi này sau đó có thể được đưa vào tế bào nhiễm SPV bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết như kỹ thuật xung điện, phương pháp dựa trên lipofectin, canxi phosphat hoặc các kỹ thuật tương tự. Virut SPV tái tổ hợp được gắn trình tự gen ngoại lai sau đó được chọn lọc. Trình tự của chúng có thể được kiểm tra. rSPV này sau đó có thể được duy trì trong tế bào khả biến thích hợp bất kỳ. Virut này có thể được duy trì trong môi trường nuôi cấy, hoặc được tinh chế và kết đông hoặc đông khô.

Trình tự gen ngoại lai

Trình tự gen ngoại lai có thể là trình tự hoặc phân tử axit nucleic bất kỳ mà không có trong tự nhiên trong hệ gen của SPV, hoặc không có tự nhiên ở vị trí như vậy trong hệ gen của SPV. Trình tự gen ngoại lai thường chứa trình tự axit nucleic mã hóa mRNA, peptit hoặc polypeptit (hoặc protein). Trình tự gen ngoại lai này có thể, ví dụ, mã hóa các loại phân tử có hoạt tính khác nhau, như kháng nguyên, chất phù trợ, xytokin, lymphokin, yếu tố sinh trưởng, enzym, chất đánh dấu, v.v.

Theo phương án được ưu tiên, trình tự gen ngoại lai mã hóa kháng nguyên (peptit, polypeptit hoặc kháng nguyên protein) có nguồn gốc từ nguồn gây bệnh lây nhiễm ở lợn, và tốt nhất là kháng nguyên có nguồn gốc từ virut, vi khuẩn, nấm, hoặc động vật nguyên sinh. Theo sáng chế, peptit thường dùng để chỉ phân tử chứa từ 4 đến 30 axit amin. Polypeptit là polyme axit amin bất kỳ chứa nhiều hơn 30 axit amin. Thuật ngữ polypeptit bao gồm protein có chiều dài đầy đủ.

Trình tự gen ngoại lai tốt hơn là mã hóa peptit hoặc polypeptit (ví dụ, glycoprotein, protein capsit, hoặc mảnh của nó) của virut hoặc nguồn bệnh được chọn từ circovirut ở lợn (PCV1, PCV2, PCV2A, PCV2B), *Actinobacillus pleuropneumonia*; Adenovirut; Alphavirut như virut gây bệnh viêm não tủy ở ngựa miền Đông; *Balantidium coli*;

Bordetella bronchiseptica; *Brachyspira* spp., tốt hơn là *B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli*, *B. innocens*, *Brucella suis*, tốt hơn là biovars 1, 2 và 3; virus gây sốt lợn cổ điển, virus gây sốt lợn châu Phi; *Chlamydia* và *Chlamydophila* sp. và tốt hơn là *C. pecorum* và *C. abortus*; *Clostridium* spp., tốt hơn là *Cl. difficile*, *Cl. perfringens* typ A, B và C, *Cl. novyi*, *Cl. septicum*, *Cl. tetani*; Coronavirus gây bệnh đường tiêu hóa và hô hấp; *Cryptosporidium parvum*; *Eimeria* spp; *Eperythrozoonis suis* hiện nay được gọi là *Mycoplasma haemosuis*; *Erysipelothrix rhusiopathiae*; *Escherichia coli*; *Haemophilus parasuis*, tốt hơn là các typ phụ 1, 7 và 14; virus gây bệnh viêm não tủy ngưng kết hồng cầu; *Isospora suis*; virus gây bệnh viêm não Nhật Bản; *Lawsonia intracellularis*; *Leptospira* spp., tốt hơn là *Leptospira australis*, *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira interrogans*, *Leptospira Pomona* và *Leptospira tarassovi*; *Mannheimia haemolytica*; *Mycobacterium* spp. tốt hơn là, *M. avium*, *M. intracellular* và *M. bovis*; *Mycoplasma hypopneumoniae*; virus gây bệnh parvo; *Pasteurella multocida*; virus cự bào ở lợn; virus gây bệnh parvo ở lợn, virus gây hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn: virus gây bệnh giả dại; rotavirus; sagiyama virus; *Salmonella* spp. tốt hơn là, *S. typhimurium* và *S. choleraesuis*; *Staphylococcus* spp. tốt hơn là, *S. hyicus*; *Streptococcus* spp., tốt hơn là *Strep. suis*; virus cự bào ở lợn; virus herpes ở lợn; virus gây bệnh cúm lợn; virus gây bệnh đậu lợn; *Toxoplasma gondii*; virus gây bệnh mụn nước hoặc virus gây bệnh ngoại ban ở lợn.

Theo một phương án được ưu tiên đặc biệt, trình tự gen ngoại lai mã hóa kháng nguyên PCV2, cụ thể là protein hoặc peptit PCV2, đặc biệt hơn nữa là protein hoặc peptit capsit của PCV2 (ví dụ, ORF2).

Trình tự gen ngoại lai có thể chứa gen khởi đầu phiên mã cho phép hoặc làm tăng sự biểu hiện của mRNA hoặc polypeptit được mã hóa. Gen khởi đầu được sử dụng có thể là gen khởi đầu tự nhiên hoặc tổng hợp, bao gồm gen khởi đầu của SPV, gen khởi đầu của poxvirus, hoặc gen khởi đầu có nguồn gốc từ virus hoặc các tế bào khác nhau như gen khởi đầu có nguồn gốc từ sinh vật có nhân điển hình hoặc sinh vật chưa có nhân điển hình. Các ví dụ cụ thể về các gen khởi đầu bao gồm gen khởi đầu của virus gây bệnh đậu bò có kích thước 7,5-kD (P7,5k) (Davison A. J. et al., J. Mol. Biol., 210(4):749-69 (1989)), gen khởi đầu có kích thước 11-kD (P11k) (Bertholet et al., Proc. Nat. Acad.

Sci., 82:2096-2100 (1985)) hoặc gen khởi đầu có kích thước 28-kD (P28k) (Weir J. P. & Moss B., J. Virol. 61:75-80 (1987)), hoặc gen khởi đầu của poxvirus tổng hợp nhân tạo (Ps), gen khởi đầu thymidin kinaza của virus herpes (Ross L. J., Gen. Virol. 74:371-377 (1993)), gen khởi đầu protein gB (nêu trên) của HVT hoặc MDV, gen khởi đầu IE của virus cự bào ở người (HCMV) (Alting-Mess M. A., Nucleic Acids Res., 17:9494 (1989)), gen khởi đầu SV40 (Gunning P., Proc. Natl. Acad. Sci., 84:4931-4835 (1987)), gen khởi đầu [beta] actin (nêu trên, và Kost A. T., Nucleic Acids Res., 11:8287-8301 (1983)), gen khởi đầu [beta]-globin (Spitzner J. R., Nucleic Acids Res., 18:1-11 (1990)), gen khởi đầu LTR của virus sâcôm Rous (Fick A. et al., Nucleic Acids Res., 20:1785 (1992)), và các gen khởi đầu tương tự. Ngoài ra, gen khởi đầu của protein cấu trúc hoặc các gen thiết yếu của SPV cũng có thể được sử dụng.

rSPV theo sáng chế có thể chứa một số trình tự gen ngoại lai, được định vị trong cùng vùng nhân dòng vô tính (nghĩa là, IL18bp) và/hoặc trong các vị trí nhân dòng vô tính khác biệt (một trong số chúng là IL18bp). Theo một phương án cụ thể, rSPV theo sáng chế bao gồm ít nhất 2 trình tự gen ngoại lai mã hóa hai kháng nguyên khác biệt (từ cùng nguồn bệnh hoặc từ các nguồn bệnh khác biệt). Theo một phương án cụ thể khác, rSPV theo sáng chế bao gồm ít nhất một trình tự gen ngoại lai mã hóa kháng nguyên PCV2 và một trình tự gen ngoại lai mã hóa kháng nguyên khác biệt. Theo một phương án cụ thể khác, rSPV theo sáng chế bao gồm trình tự gen ngoại lai mã hóa kháng nguyên và trình tự gen ngoại lai mã hóa chất phù trợ hoặc xytokin. Trong rSPV đa giá theo sáng chế, ít nhất hai trình tự gen ngoại lai có thể chịu sự kiểm soát của cùng gen khởi đầu hoặc các gen khởi đầu khác biệt, và theo cùng chiều hoặc theo chiều ngược lại.

Các phân tử axit nucleic

Sáng chế cũng đề cập đến các phân tử axit nucleic bao gồm hệ gen của rSPV theo sáng chế. Các phân tử axit nucleic theo sáng chế có thể là ADN hoặc ARN, sợi kép hoặc sợi đơn. ADN hoặc ARN sợi đơn có thể là sợi mã hóa, cũng được biết dưới dạng sợi có nghĩa, hoặc có thể là sợi không mã hóa, cũng được đề cập đến dưới dạng sợi đối nghĩa. Sáng chế cũng đề cập đến các biến thể hoặc các dạng tương tự của các phân tử axit nucleic như vậy, ví dụ, các phân tử có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc nhiều hơn.

Mức độ tương đồng giữa hai trình tự axit nucleic có thể được xác định bằng các chương trình máy tính đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này như chương trình GAP được cung cấp trong bộ chương trình GCG (Program Manual for the Wisconsin Package, Version 8, August 1996, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 5371 1) (Needleman, S. B. và Wunsch, CD., (1970), Journal of Molecular Biology, 48, 443-453). So sánh trình tự ADN bằng cách sử dụng chương trình GAP với các cài đặt sau đây: điểm tạo GAP là 5,0 và điểm mở rộng GAP là 0,3. Các phân tử axit nucleic có thể được sắp hàng với nhau bằng cách sử dụng phần mềm sắp hàng Pileup, có sẵn dưới dạng một phần của bộ chương trình GCG, bằng cách sử dụng, ví dụ, các cài đặt mặc định của điểm trừ tạo thành khoảng trống là 5 và điểm trừ độ rộng khoảng trống là 0,3.

Các điều kiện thử nghiệm thích hợp dùng để xác định xem liệu phân tử axit nucleic đã cho có lai với axit nucleic đã được xác định hay không có thể liên quan đến việc ngâm trước bộ lọc chứa mẫu axit nucleic có liên quan được kiểm tra trong dung dịch 5 x SSC trong thời gian 10 phút, và việc lai trước bộ lọc trong dung dịch 5 x SSC, dung dịch 5 x Denhardt, SDS 0,5% và 100 [mu]g/ml ADN tinh trùng cá hồi đã biến tính được hòa tan bằng sóng siêu âm, sau đó lai trong cùng dung dịch chứa đoạn dò được đánh dấu bằng P-dCTP có nồng độ là 10ng/ml trong thời gian 12 giờ ở nhiệt độ khoảng 45°C, phù hợp với các phương pháp lai như được mô tả trong tài liệu Sambrook et al. (1989; Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd edition, Cold Spring Harbour, New York). Bộ lọc này sau đó được rửa hai lần trong thời gian 30 phút trong 2 x SSC, SDS 0,5% ở nhiệt độ ít nhất là 55°C (mức độ nghiêm ngặt thấp), ở nhiệt độ ít nhất là 60°C (mức độ nghiêm ngặt trung bình), ở nhiệt độ ít nhất là 65°C (mức độ nghiêm ngặt trung bình/cao), ở nhiệt độ ít nhất là 70°C (mức độ nghiêm ngặt cao), hoặc ở nhiệt độ ít nhất là 75°C (mức độ nghiêm ngặt rất cao). Việc lai có thể được phát hiện bằng sự tiếp xúc màng tia X trong bộ lọc.

Các phân tử axit nucleic theo sáng chế có thể được cung cấp dưới dạng các phân tử axit nucleic về bản chất như các phân tử axit nucleic trần; vector; virut hoặc tế bào chủ, v.v.. Các vector bao gồm các vector biểu hiện chứa phân tử axit nucleic theo sáng chế.

Các tế bào chủ

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất tế bào chủ được biến nạp axit nucleic hoặc rSPV theo sáng chế. Các tế bào như vậy có thể tạo ra rSPV theo sáng chế. Các ví dụ thích hợp về các tế bào chủ đã biết đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này hoặc có thể được lựa chọn dễ dàng bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này. Các tế bào chủ tốt hơn là các tế bào có nhân điển hình như các tế bào của động vật có vú (ví dụ, lợn), nấm (ví dụ, *Saccharomyces cerevisiae*, *pichia*, *aspergillus*, *fusarium*), côn trùng và thực vật. Các ví dụ cụ thể về tế bào chủ là các tế bào thận của lợn, như các tế bào ESK-4 (CL-184).

Chế phẩm vacxin và phương pháp

Thuật ngữ "vacxin" như được sử dụng trong bản mô tả bao gồm chế phẩm bất kỳ có thể được sử dụng để gây ra, kích thích hoặc tăng cường đáp ứng miễn dịch ở động vật (ví dụ, lợn) kháng lại nguồn bệnh. Các ví dụ cụ thể về vacxin theo sáng chế là chế phẩm có thể gây ra hoặc kích thích hoặc tăng cường sự miễn dịch kháng lại virus PCV2. Trong vacxin theo sáng chế, ít nhất một trình tự gen ngoại lai sẽ mã hóa kháng nguyên hoặc chất phù trợ.

Thuật ngữ "quy trình gây miễn dịch" bao gồm quy trình phân phối chất sinh miễn dịch vào đối tượng. Quy trình gây miễn dịch, ví dụ, có khả năng tạo ra mức kháng thể và/hoặc đáp ứng tế bào cao liên tục, trong đó lympho bào T có thể tiêu diệt hoặc ức chế nguồn bệnh ở động vật không phải người đã được gây miễn dịch, như lợn, được định hướng kháng lại nguồn bệnh hoặc kháng nguyên mà động vật này đã tiếp xúc từ trước đó.

Vacxin theo sáng chế chứa lượng cho hiệu quả miễn dịch của rSPV hoặc axit nucleic hoặc tế bào như được mô tả ở trên trong chất dẫn thuốc được dùng.

Trên thực tế, lượng chính xác được yêu cầu đối với liều cho hiệu quả miễn dịch có thể thay đổi tùy theo từng đối tượng tùy thuộc vào các yếu tố như độ tuổi và tình trạng bệnh lý chung của từng đối tượng, bản chất của chế phẩm và chế độ sử dụng. "Lượng cho hiệu quả" thích hợp có thể được xác định bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này chỉ bằng cách sử dụng thử nghiệm thông thường. Ví dụ, các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này dùng để xác định hoặc chuẩn độ các liều lượng thích hợp của vacxin để tìm ra liều cho hiệu quả tối thiểu dựa trên trọng lượng của đối tượng

động vật không phải người, nồng độ của vacxin và các yếu tố điển hình khác. Theo một phương án điển hình, vacxin chứa liều đơn nhất của rSPV theo sáng chế nằm trong khoảng từ 10 đến 10.000.000 TCID₅₀, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 100 đến 1.000.000 TCID₅₀, thậm chí tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 1000 đến 100.000 TCID₅₀. TCID₅₀ dùng để chỉ liều lây nhiễm mô nuôi cấy trung bình, nghĩa là, lượng virus mà tạo ra sự thay đổi bệnh lý ở 50% mô nuôi cấy được cấy.

Liều vacxin, nồng độ của các thành phần trong vacxin và tính toán thời gian dùng vacxin mà tạo ra đáp ứng miễn dịch thích hợp, có thể được xác định bằng các phương pháp như chuẩn độ kháng thể trong huyết thanh, ví dụ, bằng kỹ thuật ELISA và/hoặc kỹ thuật phân tích bằng xét nghiệm trung hòa huyết thanh và/hoặc bằng kỹ thuật đánh giá thách thức chủng ngừa.

Các vacxin có thể chứa các thành phần khác, về bản chất đã biết bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này, như chất mang được dụng, tá dược, chất pha loãng, chất phụ trợ, chất ổn định đông khô, các chất làm ướt hoặc chất nhũ hóa, chất đệm pH, chất phụ gia tăng cường độ nhớt hoặc keo hóa, hoặc chất bảo quản, tùy thuộc vào đường dùng.

Các ví dụ về các chất mang được dụng, tá dược hoặc chất pha loãng gồm, nhưng không giới hạn ở nước khử khoáng hoặc nước cất; dung dịch nước muối; dầu có nguồn gốc thực vật như dầu lạc, dầu đậu phộng, dầu cây rum, dầu ôliu, dầu hạt bông, dầu ngô, dầu mè, hoặc dầu dừa; dầu silicon, bao gồm polysiloxan, như metyl polysiloxan, phenyl polysiloxan và metylphenyl polysiloxan; silicon dễ bay hơi; dầu khoáng như dầu parafin lỏng nhẹ, hoặc dầu parafin lỏng nặng; squalen; các dẫn xuất của xenluloza như metyl xenluloza, etyl xenluloza, carboxymetylxenluloza, muối natri carboxymetylxenluloza, hoặc hydroxypropyl metylxenluloza; alkanol thấp, ví dụ etanol hoặc iso-propanol; aralkanol thấp; polyalkylen glycol thấp hoặc alkylen glycol thấp, ví dụ polyetylen glycol, polypropylen glycol, etylen glycol, propylen glycol, 1,3-butylen glycol hoặc glyxerin; este của axit béo như isopropyl palmitat, isopropyl myristat hoặc etyl oleat; polyvinylpyrrolidon; aga; caragenan; gồm tragacan hoặc gồm acacia, và sáp từ xăng dầu. Thông thường, chất mang hoặc các chất mang sẽ tạo ra từ 10% đến 99,9% trọng lượng của chế phẩm vacxin và có thể được đệm bằng các phương pháp thông thường bằng cách

sử dụng các chất thử đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, như natri hydro phosphat, natri dihydro phosphat, kali hydro phosphat, kali dihydro phosphat, hỗn hợp của chúng, và các chất tương tự.

Ví dụ về các chất phù trợ gồm, nhưng không giới hạn ở, nhũ tương dầu trong nước, nhôm hydroxit (phèn), các phức chất kích thích miễn dịch, polyme hoặc copolyme khối không ion, xytokin (như IL-1, IL-2, IL-7, IFN-[alpha], IFN-[beta], IFN-y, v.v.), saponin, monophosphoryl lipid A (MLA), các dipeptit muramyl (MDP) và các chất tương tự. Các chất phù trợ thích hợp khác gồm, ví dụ, nhôm kali sulfat, (các) độc tố đường ruột bền nhiệt hoặc không bền nhiệt được phân lập từ *Escherichia coli*, độc tố bệnh tả hoặc cấu trúc dưới phân tử B của chúng, độc tố bạch hầu, độc tố uốn ván, độc tố ho gà, chất phù trợ hoàn thiện hoặc chưa hoàn thiện của Freund, v.v.. Chất phù trợ dựa trên độc tố, như độc tố bạch hầu, độc tố uốn ván và độc tố ho gà có thể được bất hoạt trước khi sử dụng, ví dụ, bằng cách xử lý bằng formaldehyt.

Các ví dụ về chất ổn định đông khô ví dụ có thể là hydrat cacbon như sorbitol, manitol, tinh bột, sucroza, dextran hoặc glucoza, protein như albumin hoặc casein, và các dẫn xuất của chúng.

Các vacxin có thể chứa kháng nguyên từ một số nguồn bệnh, như PCV2, *Actinobacillus pleuropneumoniae*; Adenovirut; Alphavirut như virut gây bệnh viêm não tủy ở ngựa miền Đông; *Balantidium coli*; *Bordetella bronchiseptica*; *Brachyspira* spp., tốt hơn là *B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli*, *B. innocens*, *Brucella suis*, tốt hơn là biovars 1, 2 và 3; virut gây sốt lợn cổ điển, virut gây sốt lợn châu Phi; *Chlamydia* và *Chlamydophila* sp. và tốt hơn là *C. pecorum* và *C. abortus*; *Clostridium* spp., tốt hơn là *Cl. difficile*, *Cl. perfringens* typ A, B và C, *Cl. novyi*, *Cl. septicum*, *Cl. tetani*; Coronavirut gây bệnh đường tiêu hóa và hô hấp; *Cryptosporidium parvum*; *Eimeria* spp; *Eperythrozoonis suis* hiện nay được gọi tên là *Mycoplasma haemosuis*; *Erysipelothrix rhusiopathiae*; *Escherichia coli*; *Haemophilus parasuis*, tốt hơn là các typ phụ 1, 7 và 14; virut gây bệnh viêm não tủy ngưng kết hồng cầu; *Isospora suis*; virut gây bệnh viêm não Nhật Bản; *Lawsonia intracellularis*; *Leptospira* spp., tốt hơn là *Leptospira australis*, *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagicae*, *Leptospira interrogans*, *Leptospira Pomona* và *Leptospira tarassovi*; *Mannheimia*

haemolytica; *Mycobacterium spp.* tốt hơn là, *M. avium*, *M. intracellular* và *M. bovis*; *Mycoplasma hyponeumoniae*; virus gây bệnh parvo; *Pasteurella multocida*; virus cự bào ở lợn; virus gây bệnh parvo ở lợn, virus gây hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn; virus gây bệnh giả dại; rotavirus; Sagiya virus; *Salmonella spp.* tốt hơn là, *S. typhimurium* và *S. choleraesuis*; *Staphylococcus spp.* tốt hơn là, *S. hyicus*; *Streptococcus spp.*, tốt hơn là *Strep. suis*; virus cự bào ở lợn; virus herpes ở lợn; virus gây bệnh cúm lợn; virus gây bệnh đậu lợn; *Toxoplasma gondii*; virus gây bệnh mụn nước và/hoặc virus gây bệnh ngoại phát ở lợn.

Chế phẩm vaccin theo sáng chế có thể là chế phẩm lỏng như dung dịch chứa nước, nhũ tương nước trong dầu hoặc dầu trong nước, xi-rô, cồn ngọt, rượu thuốc, chế phẩm để dùng ngoài đường tiêu hóa, dưới da, trong da, trong cơ hoặc trong tĩnh mạch (ví dụ, dạng dùng có thể tiêm), như hỗn dịch hoặc nhũ tương vô trùng. Các chế phẩm như vậy đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật và thường được bào chế bằng cách hòa tan kháng nguyên và các chất phụ gia điển hình khác trong chất mang hoặc hệ dung môi thích hợp. Các chế phẩm lỏng cũng có thể bao gồm hỗn dịch và nhũ tương chứa các chất tạo hỗn dịch hoặc chất nhũ hóa.

Đường dùng có thể là đường qua da, thông qua niêm mạc, hoặc thông qua đường dùng ngoài đường tiêu hóa (trong da, trong cơ, dưới da, trong tĩnh mạch, hoặc trong màng bụng). Vaccin theo sáng chế có thể được sử dụng thuận tiện trong mũi, qua da (nghĩa là, được bôi lên hoặc vào bề mặt da để hấp thụ toàn thân), ngoài đường tiêu hóa, mắt, v.v.. Đường dùng ngoài đường tiêu hóa gồm, nhưng không giới hạn ở, đường dùng trong cơ, trong tĩnh mạch, trong màng bụng và các đường dùng tương tự.

Vaccin theo sáng chế có thể được dùng dưới dạng liều đơn hoặc dưới dạng liều nhắc lại. Vaccin theo sáng chế có thể được dùng một mình, hoặc có thể được dùng đồng thời hoặc được dùng tuần tự với một hoặc nhiều chế phẩm khác, như ví dụ các chế phẩm sinh miễn dịch hoặc chế phẩm vaccin khác dùng cho lợn. Khi các chế phẩm được dùng tại các thời điểm khác nhau, các đường dùng có thể tách rời nhau hoặc vào cùng thời điểm.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp gây miễn dịch hoặc kích thích đáp ứng miễn dịch ở động vật có vú không phải là người (ví dụ, lợn) bao gồm việc dùng rSPV hoặc axit nucleic, hoặc tế bào hoặc vaccin cho động vật có vú này như được mô tả ở trên.

Vaccin theo sáng chế tốt hơn là được dùng cho lợn, lợn trưởng thành, vaccin này còn được dùng cho lợn nhỏ, lợn con hoặc lợn nái mang thai. Việc chủng ngừa cho lợn nái mang thai có ưu điểm là có thể mang lại tính miễn dịch thụ động cho lợn mới đẻ thông qua việc truyền kháng thể của mẹ. Các con lợn có thể nhỏ hơn 7, 6, 5, 4, 3, 2 hoặc 1 tuần tuổi; từ 1 đến 6 tuần tuổi; từ 2 đến 5 tuần tuổi; hoặc từ 3 đến 4 tuần tuổi. Tốt hơn là, vaccin này được dùng cho đối tượng mà chưa được tiếp xúc với nguồn bệnh.

Sáng chế cũng đề xuất vật chứa chứa lượng cho hiệu quả miễn dịch của rSPV, axit nucleic, tế bào hoặc vaccin như được mô tả ở trên. Sáng chế cũng đề xuất bộ kit chủng ngừa bao gồm vật chứa vô trùng tùy ý chứa vaccin ở lượng cho hiệu quả miễn dịch, các dụng cụ để phân phối vaccin vào động vật, và tài liệu hướng dẫn tùy ý gồm thông tin sử dụng lượng cho hiệu quả miễn dịch của chế phẩm để điều trị và/hoặc ngăn ngừa bệnh lây nhiễm.

Vaccin PCV2

Sáng chế đặc biệt phù hợp để điều trị (chữa trị, ngăn ngừa) bệnh lây nhiễm PCV2 và các bệnh có liên quan.

Vaccin PCV2 được phát triển hiện nay, như Circovac® (Merial), Ingelvac®, CircoFLEX (Boehringer Ingelheim Vetmedica), hoặc Suvaxyn®, là vaccin PCV2 được bất hoạt hoặc vaccin dưới đơn vị (Sub-Unit). Vaccin dưới đơn vị (Sub-Unit) PCV2 thường sử dụng protein capsit PCV2A tái tổ hợp, đã được tinh chế được tạo ra bằng sự biểu hiện tái tổ hợp gen ORF2 của PCV2A. Về khía cạnh này, protein được mã hóa bằng ORF2 của các chủng phân lập Imp1011 của PCV2 được báo cáo trong patent châu Âu số EP1741785. Protein được mã hóa bằng ORF2 của chủng phân lập PCV2Rm của PCV2 được báo cáo trong công bố đơn quốc tế số WO2010/061000. Protein được mã hóa bằng ORF2 của chủng phân lập 412 của PCV2 được báo cáo trong patent châu Âu số EP1816200. Một protein khác được mã hóa bằng ORF2 của chủng phân lập PCV2 khác được báo cáo trong các patent châu Âu số EP1036180 hoặc EP2225367. Protein loại

ORF2 tổng hợp cải tiến được mô tả trong các công bố đơn quốc tế số WO2013/030320 và WO2014/167060.

Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến rSPV như được nêu ở trên, trong đó trình tự gen ngoại lai mã hóa kháng nguyên PCV2, tốt hơn nữa là protein PCV2, polypeptit hoặc peptit. Theo một phương án được ưu tiên hơn, sáng chế đề cập đến rSPV như được mô tả ở trên, trong đó trình tự gen ngoại lai mã hóa polypeptit ORF2 của PCV2 hoặc mảnh của nó. Theo một phương án cụ thể, polypeptit ORF2 này được chọn từ ORF2 của các chủng phân lập Imp1011, PCV2Rm hoặc 412 của PCV2, hoặc ORF2 có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 80% so với các protein này, hoặc mảnh sinh miễn dịch của nó chứa ít nhất là 10, 15, tốt hơn nữa ít nhất là 20 gốc axit amin gần kề của nó.

Một khía cạnh khác theo sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị và/hoặc ngăn ngừa bệnh có liên quan đến PCV2 ở động vật có vú không phải người, và các phương pháp gây miễn dịch hoặc chủng ngừa cho đối tượng động vật không phải người, như lợn, heo, lợn nái, lợn con, kháng lại bệnh lây nhiễm PCV2, bao gồm bước cho đối tượng động vật nêu trên dùng rSPV, axit nucleic, tế bào, hoặc chế phẩm vacxin như được mô tả ở trên.

Bệnh lây nhiễm PCV2 hoặc các bệnh có liên quan không kể đến những bệnh khác bao gồm hội chứng còi cọc sau cai sữa heo con (Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome - PMWS), hội chứng bệnh ngoài da và thận ở lợn (Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome - PDNS), bệnh hô hấp phức hợp trên lợn (Porcine Respiratory Disease Complex - PRDC), rối loạn sinh sản, bệnh viêm ruột non u hạt, bệnh viêm biểu bì rỉ dịch, bệnh viêm hạch bạch huyết hoại tử, và chứng run bẩm sinh. Tốt hơn là, đối tượng động vật không phải người, như lợn, được bảo vệ đến mức mà trong đó từ một đến tất cả các triệu chứng hoặc ảnh hưởng bất lợi về mặt sinh lý bất thường của bệnh lây nhiễm PCV2 được làm giảm đáng kể, được làm thuyên giảm hoặc ngăn ngừa hoàn toàn.

Theo một phương án, chế phẩm vacxin theo sáng chế được dùng cho lợn dễ mắc hoặc theo cách khác có nguy cơ bị bệnh lây nhiễm PCV2 để tăng cường khả năng đáp ứng miễn dịch của chính đối tượng lợn đó.

Tốt hơn là, đối tượng này là lợn cần được chủng ngừa kháng lại hội chứng còi cọc sau cai sữa heo con (Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome - PMWS) và/hoặc hội chứng bệnh ngoài da và thận ở lợn (Porcine Dermatitis và Nephropathy Syndrome - PDNS).

Các khía cạnh và ưu điểm khác của sáng chế sẽ được bộc lộ trong phần thử nghiệm dưới đây minh họa cho sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Tạo plasmit dùng để tạo ra SPV tái tổ hợp

(1) Tạo pSP92-Ess_ORF2 (Fig.1)

ADN trong hệ gen của SPV được tạo ra như dưới đây:

Chủng SPV kasza (VR-363) và tế bào thận phôi lợn, các tế bào ESK-4 (CL-184) có thể được mua từ Bộ sưu tập chủng giống Hoa Kỳ (American Type Culture Collection - ATCC). Các tế bào ESK-4 này thường được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong CO₂ 5% trong môi trường F-12K của Ham (Gibco, Cat. No.: 21127-022) được bổ sung streptomycin-penicillin 1% (Gibco, Cat. No.: 15140-122) và FBS 5% (Gibco, Cat. No.: 10437-028). Để tạo ra ADN trong hệ gen của SPV, các tế bào ESK-4 nhập dòng trong bình thoát cổ 225cm² được cho lây nhiễm SPV và được ủ trong thời gian 6 ngày cho đến khi các tế bào có 100% tác dụng gây bệnh tế bào (cytopathic effect - CPE). Các tế bào bị lây nhiễm này sau đó được thu lại bằng cách gạt tế bào vào môi trường và ly tâm ở 1300 vòng/phút trong thời gian 5 phút. Môi trường được gạn đi, và viên kết tế bào được tạo hỗn dịch lại nhẹ nhàng trong 2ml nước muối đệm phosphat (PBS: 1,5g Na₂HPO₄, 0,2g KH₂PO₄, 0,8g NaCl và 0,2g KCl trên mỗi lít H₂O) và được tiến hành với hai bước kết đông-làm tan rã liên tiếp. Cặn tế bào sau đó được loại bỏ bằng cách ly tâm ở 3000 vòng/phút trong thời gian 5 phút ở nhiệt độ 4°C. Các virion SPV, có trong dịch nổi bề mặt, sau đó được tạo viên bằng cách ly tâm ở 200.000m/s² (20.000 xg) trong thời gian 20 phút ở nhiệt độ 4°C. Các viên kết tạo thành sau đó được tạo hỗn dịch với Tris 10mM có độ pH=7,5. ADN trong hệ gen của SPV sau đó được chiết từ các virion SPV bằng cách tạo hỗn dịch với dung dịch đệm phân giải (Tris 20mM, độ pH=9, NaCl 0,1M, EDTA 5mM, SDS 0,1%, proteinaza K 0,2mg/ml) và được ủ ở nhiệt độ 60°C trong thời gian 5

phút. Việc chiết phenol:cloroform (1:1) được thực hiện hai lần, và mẫu được làm kết tủa bằng cách bổ sung hai thể tích etanol và ly tâm. Dịch nổi bề mặt được gạn, và viên kết (ADN của SPV) được làm khô trong không khí và được hydrat hóa lại trong Tris 10mM, độ pH=7,5, EDTA 1mM ở nhiệt độ 4°C.

Các vùng chặn của gen protein liên kết interleukin 18 (IL-18bp) trong hệ gen của SPV được nhân dòng vô tính bằng phản ứng chuỗi polymeraza (Polymerase Chain Reaction - PCR). Hai đoạn mồi (oligonucleotit tổng hợp), SP6030F và SP9574R được nêu trong SEQ ID NO: 1 và 2 được mua từ Takara Bio. Phản ứng PCR được thực hiện bằng cách sử dụng LA Taq polymeraza (Takara Bio) và bộ mồi gồm SP6030F và SP9574R với ADN của SPV làm khuôn mẫu theo quy trình chuẩn của nhà sản xuất.

SEQ ID NO: 1: CGAATTCATTCCTTTATCTTTA

SEQ ID NO: 2: GGAAC TACGTTATACGATCAT

ADN đã khuếch đại có kích thước khoảng 3,5kbp được xác định bằng kỹ thuật điện di trên gel agarosa 0,8%, và được tinh chế khỏi gel bằng cách sử dụng bộ kit chiết gel QIAquick (QIAquick Gel Extraction Kit) (Qiagen). Mảnh ADN đã được tinh chế được tách dòng vô tính thành vector pCR4-TOPO (Invitrogen) theo quy trình chuẩn của nhà sản xuất. 12 dạng biến nạp kháng ampicilin màu trắng được nhặt ra và được nuôi trong môi trường cao thịt LB chứa 50µg/ml ampicilin, và mỗi plasmit được tạo ra bằng bộ kit QuickLyse Miniprep (QuickLyse Miniprep Kit) (Qiagen). Mỗi plasmit được phân cắt bằng *ScaI*, và hai loại plasmit tiềm năng (cả hai chiều của ADN đã được chèn) được lựa chọn. ADN đã được chèn của chúng được giải trình tự bằng chất thử giải trình tự chu trình Dye Terminator (Dye Terminator Cycle Sequencing) (DTCS) và thiết bị giải trình tự CEQ2000XL (Beckman Coulter). Một trong số các plasmit tiềm năng, pCR-SPV6030/9574 (#1), được xác nhận rằng có chứa mảnh ADN gồm từ 6030 nucleotit đến 9574 nucleotit của ADN trong hệ gen của SPV (Số nộp lưu ngân hàng gen: NC_003389) và được sử dụng làm plasmit cơ sở (Fig.1).

Tiếp theo, phương pháp phát sinh đột biến PCR được tiến hành để làm khuyết một phần của gen IL-18bp và đưa vào các vị trí enzym đa giới hạn bằng cách sử dụng pCR-

SPV6030/9574 (#1) làm khuôn mẫu và bằng cách sử dụng hai loại bộ môi, (1) SEQ ID NO: 3 và 4 hoặc (2) SEQ ID NO: 5 và 6.

SEQ ID NO: 3: TTCGCCCTTACGGTACCATTCCTTTATCTTTATAAACG

SEQ ID NO: 4: CTATAATATTAAATAAGCTTTATGGAGTTGTTTAAATAC

SEQ ID NO: 5: CACACGATAACACTGCAGTCCACATATTACGGTTC

SEQ ID NO: 6: GCCGCGAATTCGCCCTCGAGGAGCTCACTACG

Mỗi sản phẩm PCR được sử dụng cho kỹ thuật điện di trên gel agarosa 0,8% và được tinh chế bằng cách sử dụng bộ kit chiết gel QIAquick Gel (QIAquick Gel Extraction Kit). Mảnh ADN đã được tinh chế, được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR bằng cách sử dụng bộ môi có SEQ ID NO: 3 và 4, được phân cắt bằng hai enzym giới hạn, *KpnI* và *HindIII*, và được nối bằng cùng enzym giới hạn cut-pBluescript KS(+) (Stratagene). Plasmid pBS-9L(*Kpn*..*Hin*) thu được (Fig.1) được phân cắt bằng *SacI* và *PstI*, và mảnh ADN được cắt bằng cùng enzym giới hạn được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR sử dụng bộ môi có SEQ ID NO: 5 và 6, được chèn vào plasmid này. Plasmid tạo thành được đặt tên là pSP90 (Fig.1).

Các vị trí giữa *EcoRI* và *HindIII* trong các vị trí của enzym đa giới hạn của pSP90 được thay thế bằng đoạn nối tiếp oligonucleotit được tạo ra bằng cách kéo dài hai oligonucleotit ADN tổng hợp có SEQ ID NO: 7 và 8. Plasmid tạo thành được đặt tên là pSP91 (Fig.1).

SEQ ID NO: 7:

AATTGCCCGGGTACCGTCGATCGACTTTTATGGCCCCCCCCGGCCA

SEQ ID NO: 8:

AGCTTGGCCGGGGGGGCCATAAAAAGTCGATCGACGGTACCCGGGC

Mảnh ADN của caset gen ‘gen khởi đầu P7.5–LacZ’ có nguồn gốc từ pNZ76, được phân cắt bằng *HindIII* và *SmaI* của pNZ76 và sau đó cắt cùn bằng ADN polymeraza (được mô tả trong USP5,387,519) được nối vào vị trí *SmaI* của pSP91. Plasmid tạo thành được

đặt tên là pSP92 (Fig.1), và caset gen ‘P7.5-LacZ’ được chèn vào gen IL-18bp (từ 8146 nucleotit đến 7745 nucleotit trong hệ gen của SPV).

Mảnh cắt *Bgl*I có kích thước 0,8kb có nguồn gốc từ pGTPs-Ess_ORF2 (Ví dụ 1 trong công bố đơn quốc tế WO2014/167060) được chèn vào vị trí *Sfi*II của pSP92, và plasmit tạo thành được đặt tên là pSP92-Ess_ORF2 (Fig.1). Plasmit này gồm caset gen ‘gen khởi đầu (Ps)-Ess_ORF2 của poxvirus khỏe (PCV2-ORF2 đã được cải biến)’ cũng nằm trong gen IL-18bp, và được sử dụng làm plasmit tương đồng để tạo ra SPV, SVR12 tái tổ hợp.

(2) Tạo pSP911-EssORF2 (Fig.2)

Trình tự này nằm giữa *Kpn*I và *Pst*I của pSP91 được thay thế bằng đoạn nối tiếp tổng hợp được nêu trong SEQ ID NO: 9 để chèn gen khởi đầu có kích thước là 11-kD của virus gây bệnh đậu bò vào trình tự đó. Plasmit tạo thành được ký hiệu là pSP911.

SEQ ID NO: 9:

GGTACCGAGCTCGGTAGCCCCGGGCCATGGTAGATCCTCTAGAGGATCC
AATTCATTTATAGCATAGAAAAAAACAAAATGAAATTCTACTATATTTTCTG
CAG

Trình tự axit nucleic tổng hợp mã hóa ORF2 đã được cải biến của PCV2 (Ess_ORF2) được thu bằng cách phân cắt pGTPs-Ess_ORF2 bằng *Bam*HI và *Sal*I, và chèn pSP911 đã cắt vào bằng *Bam*HI và *Sal*I. Plasmit tạo thành được ký hiệu là pSP911-Ess_ORF2, và được sử dụng để tạo ra virus gây bệnh đậu lợn tái tổ hợp SVR13.

Ví dụ 2: Sản xuất virus gây bệnh đậu lợn tái tổ hợp (rSPV)

(1) Sản xuất SVR12 (Fig.3)

SPV tái tổ hợp được tạo ra trong các tế bào ESK-4 bằng việc tái tổ hợp tương đồng giữa hệ gen của SPV kiểu dại và các vector tương đồng. Các tế bào ESK-4 nhập dòng phụ trong đĩa có 6 lỗ được cho lây nhiễm SPV kiểu dại (wtSPV), và 17 giờ sau đó, các tế bào đã lây nhiễm wtSPV được chuyển nhiễm với 2 µg pSP92-Ess_ORF2 bằng cách sử dụng chất thử Lipofectamin Plus (Invitrogen) và được ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 5 ngày cho đến khi xuất hiện tác dụng gây bệnh tế bào (CPE). Dịch tan tế bào từ các tế bào đã

lây nhiễm-chuyển nhiễm được sàng lọc các mảng tái tổ hợp biểu hiện β -galactosidaza bằng việc bổ sung 0,5mg/ml Bluo-gal (Invitrogen Cat. No.: 15519-028) trong lớp phủ agarosa dinh dưỡng. Hai virus tái tổ hợp không có wtSPV độc lập được tinh chế 3-4 vòng qua sàng lọc. rSPV đã được tinh chế được ký hiệu là SVR12. Hai dòng vô tính đã được tinh chế của SVR12 được ký hiệu là các dòng vô tính 1H2C9D4G5 và 2F5D5E5.

(2) Sản xuất SVR13 (Fig.3)

Các tế bào ESK-4 nhập dòng phụ trong đĩa có 6 lỗ được cho lây nhiễm SPV kiểu dại (wtSPV), và 17 giờ sau đó, các tế bào đã lây nhiễm wtSPV này được chuyển nhiễm với 2 μ g pSP911-Ess_ORF2 bằng cách sử dụng chất thử Lipofectamin Plus (Invitrogen) và được ủ ở nhiệt độ 37°C cho đến khi xuất hiện tác dụng gây bệnh tế bào (CPE). Dịch tan tế bào từ các tế bào đã lây nhiễm-chuyển nhiễm là hạt chuyển nhiễm (TFS) cho SVR13. TFS được pha loãng đến tỷ lệ 1:20 bằng môi trường F-12K của Ham mà không có FBS, và được lây nhiễm vào các tế bào ESK-4 trong đĩa có 96 lỗ. Bảy ngày sau đó, các tế bào đã lây nhiễm được làm tan bằng dung dịch đệm phân giải (Tris-Cl 20mM, NaCl 0,1M, EDTA 5mM, SDS 0,1%, proteinase K 200 μ g/ml) tiếp đó xử lý gia nhiệt (60°C trong thời gian 5 phút, và 98°C trong thời gian 2 phút). Các mẫu ADN đã được dung giải tế bào lây nhiễm này được sàng lọc bằng kỹ thuật PCR sử dụng bộ mồi gồm 5'-GGCCGTTGATATGATGAGGT-3' (SEQ ID NO:10) và 5'-TCCAGCACTGGCTTAGGAGT-3' (SEQ ID NO:11).

Các mẫu khuếch đại mảnh ADN 0,3kbp là dương tính, và dịch nổi bề mặt tương ứng được chuyển tiếp sang bước sàng lọc tiếp theo. Bước sàng lọc được lặp lại cho đến khi tất cả các mảng xuất hiện được nhuộm bằng thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang (immunofluorescence assay - IFA) bằng cách sử dụng huyết thanh kháng PCV2 của lợn (PAB-PCV2, VMR) làm kháng thể thứ nhất và huyết thanh kháng IgG của lợn được tiếp hợp FITC (F1638-2ML, SIGMA) làm kháng thể thứ hai.

Hai dòng vô tính tái tổ hợp không có wtSPV của SVR13 được tinh chế từ TFS qua ba vòng sàng lọc, và được ký hiệu là các dòng vô tính G2C2D4 và D10E5A5.

Ví dụ 3: Phân tích SPV tái tổ hợp *in vitro*

(1) Biểu hiện gen PCV2-ORF2 bằng phân tích thẩm tách Western

Kích thước phân tử của protein PCV2-ORF2 được biểu hiện bởi rSPV được phân tích bằng SDS-PAGE 15% và phân tích thẩm tách Western bằng cách sử dụng huyết thanh kháng PCV2 của chuột. Các tế bào ESK-4 được cho lây nhiễm với dòng vô tính 1H2C9D4G5, dòng vô tính 2F5D5E5 của SVR12, SVR14, SVR15 hoặc wtSPV. Sáu ngày sau đó, dịch tan tế bào được cắt phân đoạn trên SDS-PAGE 15%. Protein được chuyển lên trên màng polyvinyliden diflorua (polyvinylidene difluoride - PVDF), Immobilon-P (Merk Millipore, Cat. No.: IPVH08130), và được phong bế bằng sữa khô 5% trong PBS. Các vết thẩm trên màng PDVF được dò bằng huyết thanh kháng PCV2 của chuột (1:1000) làm kháng thể thứ nhất, tiếp đó phản ứng với kháng thể thứ cấp kháng IgG của chuột ở dê được tiếp hợp biotin (1:1000), và bộ kit chuẩn VECTASTAIN ABC-AP (VECTASTAIN ABC-AP Standard Kit) (Vector Labs, AK-5000). Các vết thẩm trên màng được hiện lên bằng cơ chất alkaline phosphatase, Nitroblue Tetrazolium (NBT)/5-brom-4-chloro-3-indolyl phosphat (BCIP).

Các kết quả của phân tích thẩm tách Western cho thấy rằng SVR12 và SVR13 biểu hiện hai loại ORF2, kích thước phân tử là 27kDa và 25kDa (Fig.4). Protein 27kDa phía trước tương ứng với dạng tiền thân, và protein 25kDa phía sau tương ứng với dạng được xử lý sau khi phân cắt tại đầu cuối của peptit truyền tín hiệu B5R. Do đó, các kết quả này chứng minh sự biểu hiện hiệu quả kháng nguyên từ các SPV theo sáng chế.

(2) Độ ổn định trong thời gian dài và sự biểu hiện của gen PCV2-ORF2

SVR12, và SVR13 được chuyển vào các tế bào ESK-4 15 lần để kiểm tra độ ổn định của các rSPV theo sáng chế bằng cách sử dụng gen IL-18bp làm vị trí chèn. Độ ổn định và sự biểu hiện của gen đã được chèn sau 15 lần chuyển được kiểm tra bằng kỹ thuật PCR và phân tích thẩm tách Western. Các kết quả của kỹ thuật PCR cho thấy rằng gen đã được chèn của tất cả các rSPV đều ổn định sau 15 lần chuyển *in vitro* (Fig.5). Không có băng nào của sản phẩm gen PCV2-ORF2 có kích thước bất thường xuất hiện trong các lần của 15 lần chuyển *in vitro* lên màng PDVF so với các lần của 0 lần chuyển bằng phân tích thẩm tách Western.

(3) Phát triển các dạng tái tổ hợp trong các tế bào động vật không hướng đích

Độ an toàn của môi trường chứa vacxin sống được thiết kế di truyền là mối quan tâm lớn nhất. Khả năng lây nhiễm hoặc sinh trưởng trong các dòng tế bào hoặc động vật không hướng đích có thể được thử nghiệm là phương pháp đánh giá mức độ an toàn của các SPV. SPV thường không phát triển trong các tế bào HeLa, nhưng có thể phát triển trong các tế bào Vero. Các tế bào Vero đã được thử nghiệm kỹ lưỡng và cho thấy là không có các tác nhân ngoại lai, và được chấp nhận rộng rãi bởi các cơ quan quản lý để sử dụng trong sản xuất vacxin như vacxin bại liệt và ỉa chảy dịch ở lợn.

Các tế bào Vero (ATCC CCL-81; dòng tế bào thương mại có nguồn gốc từ thận của khỉ xanh châu Phi) được nuôi cấy trong các đĩa có 6 lỗ được cho lây nhiễm trong các môi trường nuôi cấy riêng rẽ với ba loại SPV: SVR12 và hai SPV so sánh, cụ thể là SVR3, chứa gen ORF2 ở vị trí nhân dòng vô tính ARP, và SVR7, chứa gen ORF2 ở vị trí nhân dòng vô tính TK. Việc lây nhiễm được thực hiện ở hai mức bội nhiễm (multiplicity of infection - MOI) (mức cao: ~0,01, và mức thấp: ~0,001), và các tế bào được nuôi cấy trong tủ ủ ở nhiệt độ 37°C với CO₂ 5% trong thời gian hai tuần sau khi lây nhiễm. Vào 0, 4, 7, 11 và 14 ngày sau khi lây nhiễm (DPI), các tế bào bị lây nhiễm và dịch nổi bề mặt được thu hồi, kết đông và làm tan rã. Lượng virus lây nhiễm ở 0, 4, 7, 11 và 14 DPI được chuẩn độ bằng thử nghiệm TCID₅₀ bằng cách sử dụng các tế bào ESK-4 trong đĩa có 24 lỗ.

Các kết quả được tổng hợp trong bảng 1 và trên Fig.6. Tỷ lệ sinh trưởng tương đối đối với mỗi độ chuẩn của '0 DPI' được thể hiện trong các dấu ngoặc đơn trong bảng 1, và tiến trình thời gian của tỷ lệ sinh trưởng tương đối được vẽ đồ thị trên Fig.6. Đáng ngạc nhiên là các kết quả này cho thấy rằng khả năng sinh trưởng của các SPV tái tổ hợp bị ảnh hưởng bởi các vị trí chèn, và SPV tái tổ hợp theo sáng chế, bằng cách sử dụng gen IL-18bp làm vị trí chèn, có ưu điểm là không phát triển trong các tế bào Vero.

Đây là một ưu điểm nữa của SPV tái tổ hợp theo sáng chế bằng cách sử dụng gen IL-18bp làm vị trí chèn trên điểm có nguy cơ thấp hơn đối với môi trường.

Bảng 1. Sự phát triển của rSPV trong các tế bào Vero

Virus	MOI	Độ chuẩn của virus: TCID ₅₀ /lỗ (Tỷ lệ 0 DPI)				
		0 DPI	4 DPI	7 DPI	11 DPI	14 DPI
SVR 3	Cao	4,8E+04 (1,0)	6,3E+05 (13,1)	8,5E+05 (17,7)	6,3E+05 (13,1)	4,2E+05 (8,7)
	Thấp	4,8E+03 (1,0)	8,5E+04 (17,7)	1,4E+05 (29,2)	8,5E+04 (17,7)	6,3E+04 (13,1)
SVR 7	Cao	4,8E+04 (1,0)	4,2E+05 (8,8)	4,2E+05 (8,8)	1,4E+05 (2,8)	1,4E+05 (2,8)
	Thấp	4,8E+03 (1,0)	4,8E+04 (10,0)	8,5E+04 (17,8)	6,3E+04 (13,1)	1,4E+04 (2,8)
SVR 12	Cao	8,5E+03 (1,0)	4,8E+03 (056)	4,2E+03 (0,49)	85E+02 (0,10)	1,4E+02 (0,02)
	Thấp	8,5E+02 (1,0)	4,2E+02 (049)	1,4E+02 (0,16)	8,5E+01 (0,10)	6,3E+01 (007)

Ví dụ 4: Kích thích đáp ứng miễn dịch *in vivo*

Các nhóm (N=7) lợn con 4 tuần tuổi âm tính với kháng thể kháng PCV2 được gây miễn dịch dưới da ở thùy tai trái bằng mỗi SPV tái tổ hợp, SVR7 hoặc SVR12 ở 5,0E+04 TCID₅₀/con lợn, hoặc bằng PBS. Các mẫu máu được lấy từ tĩnh mạch cổ phía ngoài ở thời điểm trước khi gây miễn dịch, 1, 2 và 3 tuần sau khi gây miễn dịch (wpi), và kháng thể kháng PCV2 trong huyết thanh được đo bằng kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang gián tiếp. Các tế bào RPL-2 đã được lây nhiễm PCV2 được nuôi cấy trên các đĩa nuôi cấy mô có 96 lỗ, và được cố định bằng axeton/metanol (2:1). Sau khi phong bế bằng sữa không béo 0,5% trong PBS trong thời gian 1 giờ, huyết thanh pha loãng hai lần được tạo lớp trên các lỗ của đĩa nuôi cấy mô có 96 lỗ và được ủ trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ 37°C. Huyết thanh lợn PAB-PCV2 (VMRD) được pha loãng nhiều lần cũng được tạo lớp trên một lần của mỗi đĩa có 96 lỗ là huyết thanh đối chứng dương. Sau khi ủ, các đĩa được rửa 3 lần và các kháng thể kháng IgG-FITC của lợn được tạo ra ở thỏ (SIGMA Cat. #: F1638, 1:1000) được tạo lớp trên các giếng của đĩa nuôi cấy mô có 96 lỗ và được ủ trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ 37°C. Sau khi ủ, các đĩa được rửa ba lần bằng PBS. Tín hiệu của các kháng thể thứ cấp được phát hiện bằng kính hiển vi huỳnh quang, và tín hiệu dương tính hoặc âm tính của mỗi lỗ được ghi lại. Mức pha loãng cao nhất làm cho phản ứng huỳnh quang dương tính là độ chuẩn IF của mẫu, và các sai số thử nghiệm trong số các đĩa và các ngày được định chuẩn bằng độ chuẩn IF (1:2560) của huyết thanh đối chứng dương.

Các kết quả thu được cho thấy rằng độ chuẩn IF trung bình của nhóm được chủng ngừa SVR12 là cao hơn về mặt thống kê ($p < 0,05$) so với độ chuẩn IF trung bình của nhóm được chủng ngừa SVR7. Ngoài ra, việc quan sát lâm sàng mụn đậu và nốt đỏ được tạo ra tại các vị trí chủng ngừa được bắt đầu từ 1 đến 3 wpi. Kích thước mụn đậu cực đại của nhóm được chủng ngừa SVR12 nhỏ hơn so với kích thước mụn đậu của nhóm được chủng ngừa SVR7.

Các kết quả nêu trên cho thấy rằng rSPV theo sáng chế trong đó gen ngoại lai được chèn vào IL-18bp, như SVR12, được giảm độc lực nhiều hơn, và có thể kích thích đáp ứng miễn dịch cao hơn so với rSPV bằng cách sử dụng vị trí TK làm vị trí chèn như SVR7.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Virut gây bệnh đậu lợn tái tổ hợp (rSPV) chứa ít nhất một trình tự gen ngoại lai thứ nhất trong hệ gen của nó, trong đó trình tự gen ngoại lai thứ nhất này được chèn vào gen protein liên kết IL-18 (IL18bp) trong hệ gen của rSPV.
2. rSPV theo điểm 1, trong đó trình tự gen ngoại lai thứ nhất nêu trên được chèn vào thay thế cho tất cả hoặc một phần trình tự gen IL18bp của virut.
3. rSPV theo điểm 2, trong đó hệ gen của rSPV chứa đoạn khuyết gồm ít nhất là 100 cặp bazơ nitơ trong trình tự gen IL18bp, và trong đó trình tự gen ngoại lai thứ nhất được định vị trong đoạn khuyết nêu trên.
4. rSPV theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó rSPV này còn chứa ít nhất một trình tự gen ngoại lai thứ hai được chèn vào vùng khác biệt trong hệ gen của rSPV, tốt hơn là được chèn vào gen Thymidin kinaza (TK) của virut hoặc gen protein lặp Ankyrin.
5. rSPV theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó các trình tự gen ngoại lai thứ nhất và/hoặc thứ hai mã hóa kháng nguyên, tốt hơn là kháng nguyên PCV2.
6. rSPV theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó các trình tự gen ngoại lai thứ nhất hoặc thứ hai mã hóa kháng nguyên capsit PCV2, tốt hơn là protein hoặc peptit ORF2 của PCV2.
7. rSPV theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó mỗi trong số các trình tự gen ngoại lai thứ nhất và/hoặc thứ hai chứa một gen khởi đầu phiên mã.
8. rSPV theo điểm 7, trong đó gen khởi đầu được chọn từ gen khởi đầu có kích thước 7,5-kD (P7,5k), gen khởi đầu có kích thước 11-kD (P11k), hoặc gen khởi đầu có kích thước 28-kD (P28k) của virut gây bệnh đậu bò, gen khởi đầu của poxvirut tổng hợp nhân tạo (Ps), gen khởi đầu beta-actin của gà (Bac) hoặc dẫn xuất của nó, gen khởi đầu Pec, gen khởi đầu rất sớm (ie)1 của virut cự bào ở chuột (Mcmv), gen khởi đầu của virut cự bào ở người (Hcmv), gen khởi đầu của virut gây bệnh ở khỉ không đuôi (SV)40, và gen khởi đầu của virut sacôm Rous (RSV), hoặc mảnh bất kỳ của chúng mà giữ được hoạt tính của gen khởi đầu.

9. rSPV theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó rSPV này chứa trình tự axit nucleic mã hóa kháng nguyên PCV2 trong hệ gen của nó, trong đó trình tự axit nucleic nêu trên được chèn vào gen IL18bp trong hệ gen của rSPV.
10. Phân tử axit nucleic bao gồm hệ gen của rSPV theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên.
11. Tế bào chủ chứa rSPV theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9 hoặc phân tử axit nucleic theo điểm 10.
12. Phương pháp sản xuất rSVP theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho lây nhiễm phân tử axit nucleic theo điểm 10 vào tế bào khả biến và thu rSVP.
13. Chế phẩm chứa rSVP theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9 và tá dược.
14. Chế phẩm theo điểm 13, trong đó chế phẩm này là vaccin.
15. Bộ kit chẩn đoán dùng để gây miễn dịch cho lợn bao gồm các thành phần sau đây:
- c. vaccin theo điểm 14 ở lượng cho hiệu quả, và
 - d. dụng cụ để phân phối vaccin nêu trên vào lợn.

1 / 6

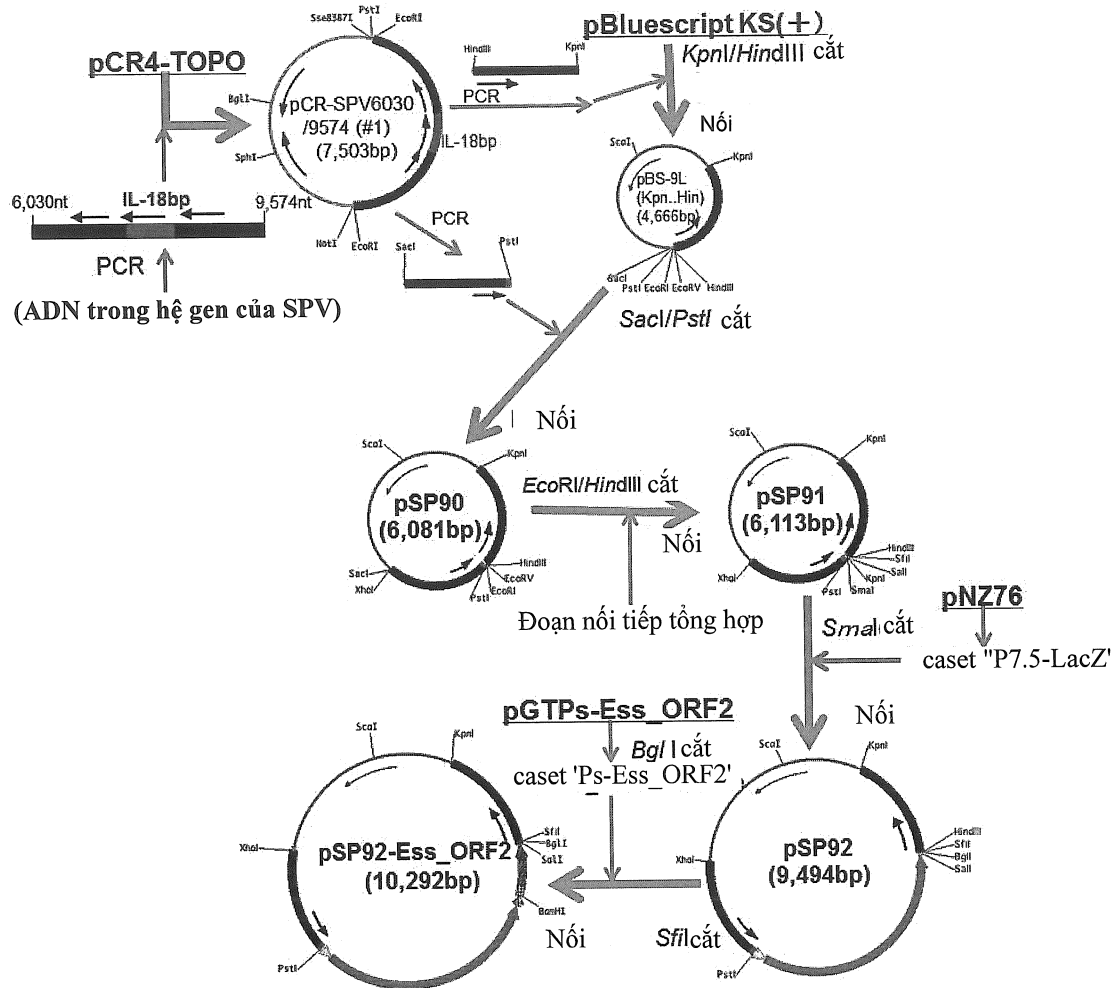


Fig.1

2 / 6

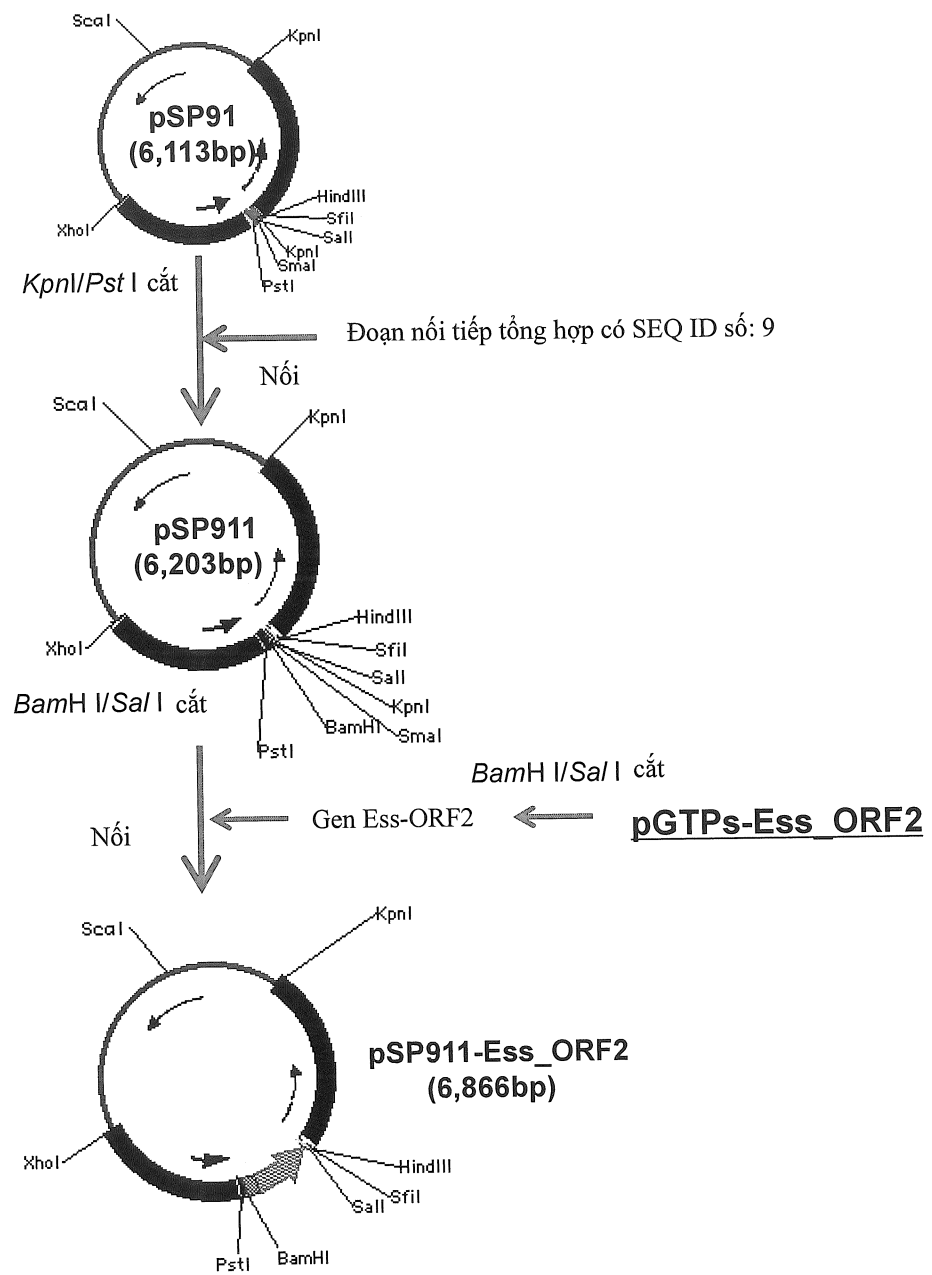


Fig.2

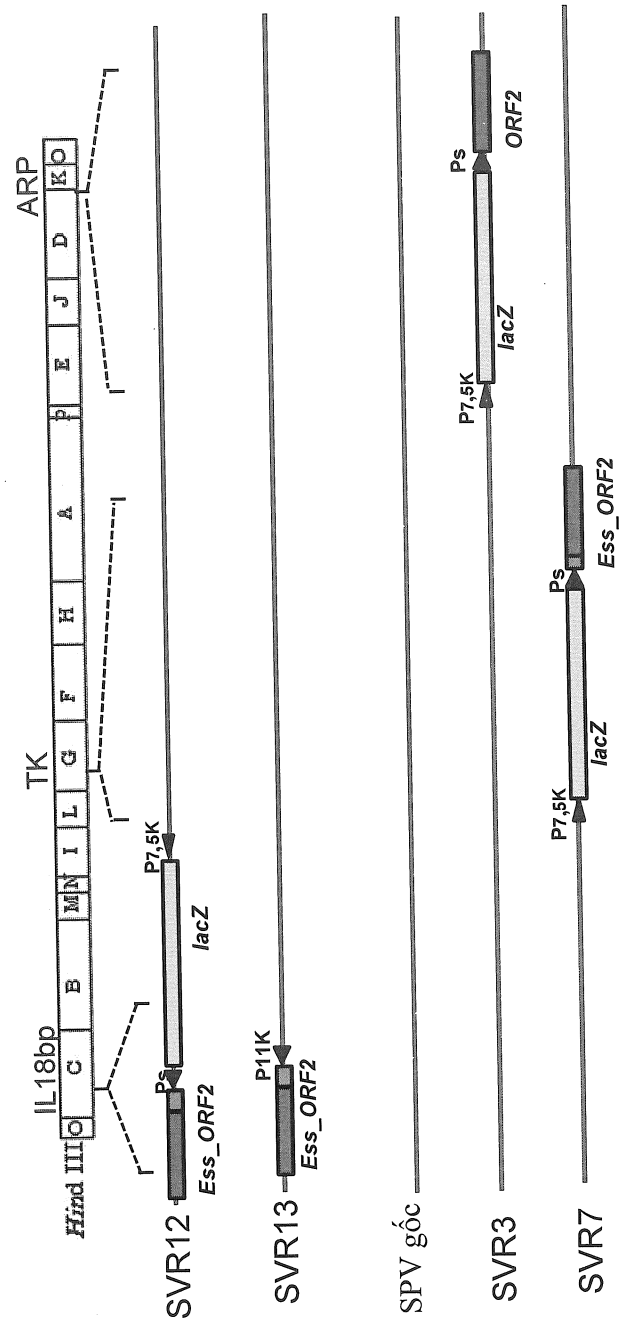


Fig. 3

4 / 6

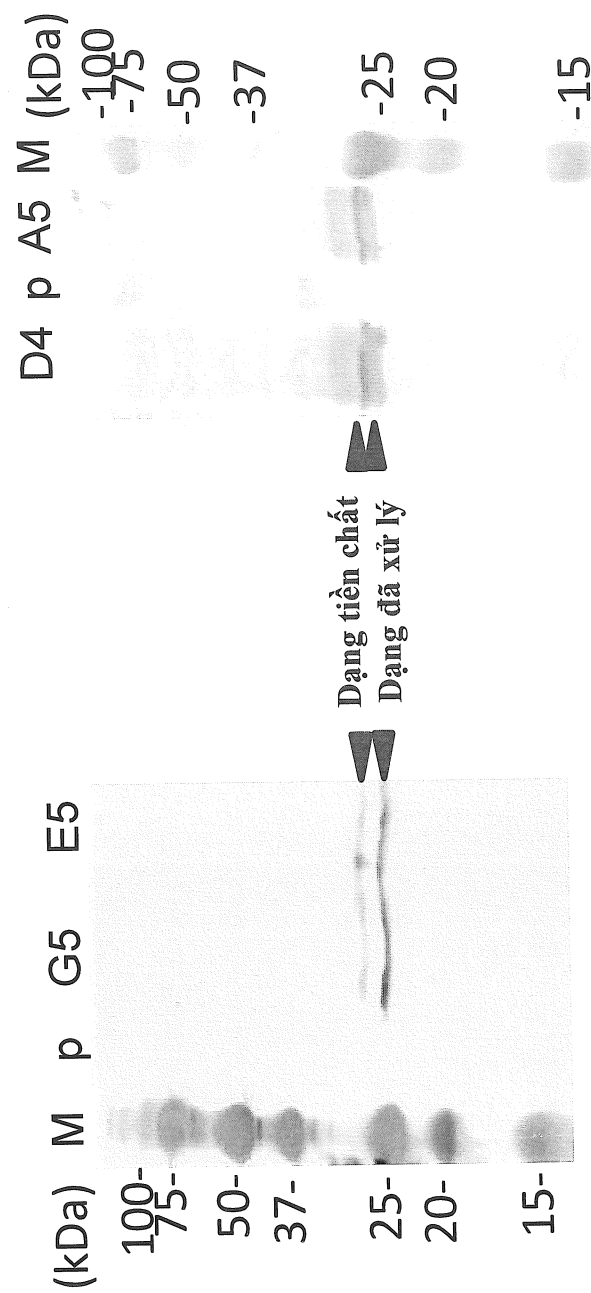


Fig. 4
5 / 6

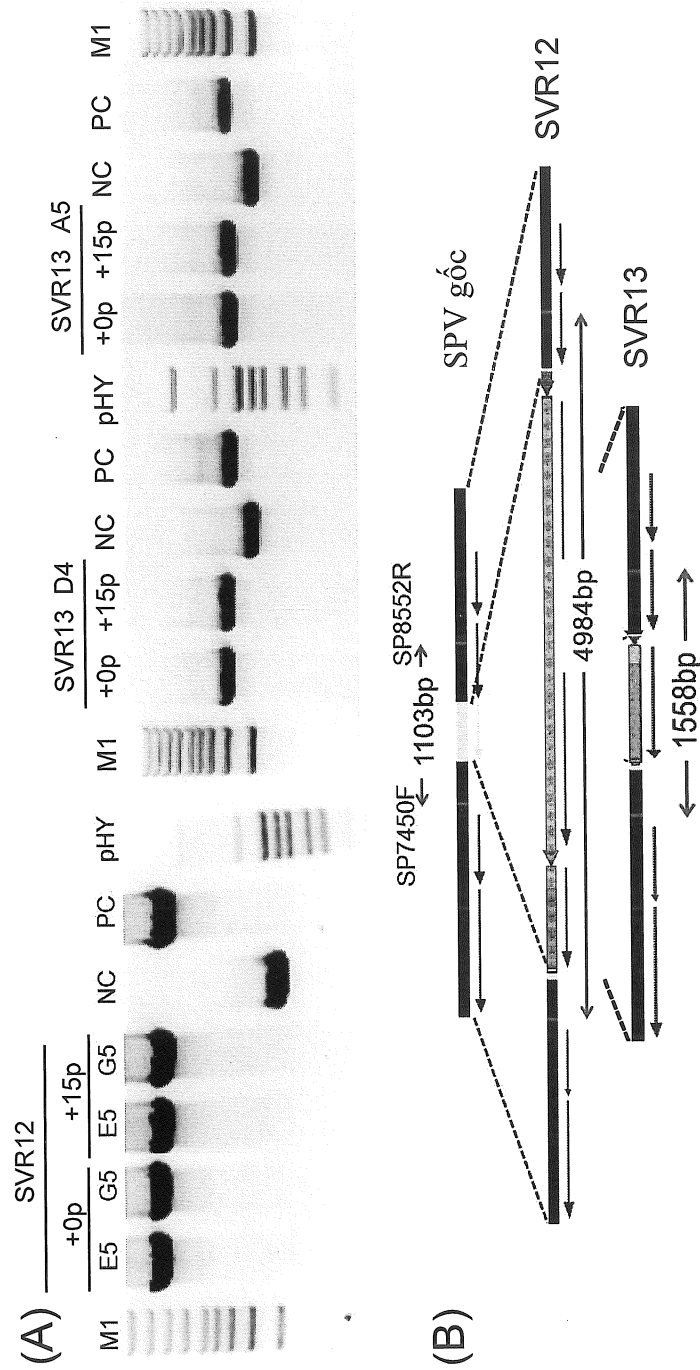


Fig. 5
6 / 6

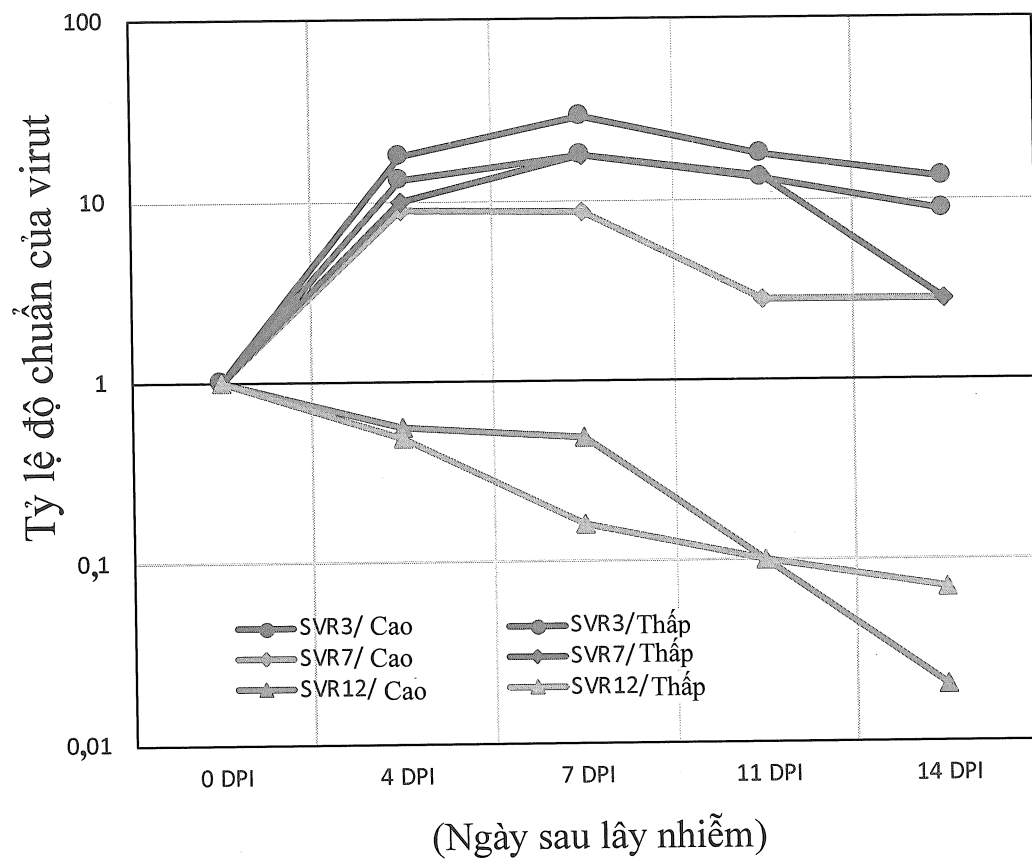


Fig. 6

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> CEVA SANTE ANIMALE
 <120> VIRUT GÂY BỆNH ĐẬU LỘN TÁI TỔ HỢP VÀ CHẾ PHẨM VACXIN CHỨA VIRUT NÀY
 <130> B1945
 <160> 11
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> oligonucleotit
 <400> 1
 cgaattcatt cctttatctt ta 22
 <210> 2
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> oligonucleotit
 <400> 2
 ggaactacgt tatacgatca t 21
 <210> 3
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> oligonucleotit
 <400> 3
 ttcgccctta cggtagcatt cctttatctt tataaacg 38
 <210> 4
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> oligonucleotit
 <400> 4

ctataatatt aaataagctt tatggagttg tttaaatac

39

<210> 5
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> oligonucleotit

<400> 5
 cacacgataa cactgcagtc cacatattac ggttc

35

<210> 6
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> oligonucleotit

<400> 6
 gccgcgaatt cgccctcgag gagctcacta cg

32

<210> 7
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> oligonucleotit

<400> 7
 aattgcccg gtaccgtcga tcgacttttt atggccccc cgcca

46

<210> 8
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> oligonucleotit

<400> 8
 agcttgccg ggggggcat aaaaagtcga tcgacggtac ccgggc

46

<210> 9
 <211> 103
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>

<223> Gen khởi đầu P11K

<400> 9
ggtaccgagc tcggtagccc gggccatggt agatcctcta gaggatccaa ttcatttata 60

gcatagaaaa aaacaaaatg aaattctact atattttctg cag 103

<210> 10

<211> 20

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> oligonucleotit

<400> 10
ggccgttgat atgatgaggt 20

<210> 11

<211> 20

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> oligonucleotit

<400> 11
tccagcactg gcttaggagt 20