



(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)



1-0036708

(51)⁷ A61K 39/12; C12N 15/86; A61P 31/20; (13) B
A61K 39/00

(21) 1-2019-00157

(22) 09/06/2017

(86) PCT/EP2017/064183 09/06/2017

(87) WO 2017/212048 A1 14/12/2017

(30) 16305697.1 10/06/2016 EP

(45) 25/08/2023 425

(43) 26/08/2019 377A

(73) CEVA SANTE ANIMALE (FR)

10 avenue de la Ballastière, 33500 LIBOURNE, France

(72) SATO, Takanori (JP); SAITOH, Shuji (JP); KOMIYA, Yasutoshi (JP).

(74) Công ty TNHH một thành viên Sở hữu trí tuệ VCCI (VCCI-IP CO.,LTD)

(54) VIRUT BỆNH ĐẬU LỢN TÁI TỔ HỢP ĐA GIÁ, PHƯƠNG PHÁP BẢO CHẾ
VIRUT NÀY VÀ CHẾ PHẨM CHỨA VIRUT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến virus bệnh đậu lợn tái tổ hợp và phương pháp bảo chế virus này và chế phẩm chứa virus này. Virus bệnh đậu lợn tái tổ hợp theo sáng chế có khiếm khuyết kép đối với các gen IL 18bp và TK, và chứa ít nhất một gen ngoại lai được tách dòng vào trong trình tự gen TK khiếm khuyết. Sáng chế đặc biệt thích hợp để tạo ra các vacxin dùng cho lợn, đặc biệt là để tiêm chủng cho lợn chống lại sự nhiễm PCV2.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế cập đến virus bệnh đậu lợn tái tổ hợp mới và sử dụng chúng trong các chế phẩm vaccine. Virus bệnh đậu lợn tái tổ hợp theo sáng chế có khiếm khuyết kép và cho phép biểu hiện hữu hiệu một hoặc nhiều trình tự gen ngoại lai *in vivo*. Sáng chế đặc biệt thích hợp để tạo ra các vaccine dùng cho lợn, đặc biệt là để tiêm chủng cho lợn chống lại sự nhiễm circovirus ở lợn (PCV2: Porcine Circovirus type 2).

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các typ virus khác nhau đã được đề xuất trong lĩnh vực này dưới dạng vector để vận chuyển gen hoặc biểu hiện peptit *in vivo*. Cụ thể, các vaccine thú y đã được bào chế biểu hiện ít nhất một kháng nguyên 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 ecpetvirus (Shin, M. -F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81:5867-5870 (1984)). Ví dụ về các vector virus cụ thể cho phép biểu hiện gen đối với một kháng nguyên ngoại lai bao gồm virus bệnh Aujeszky (PRV: PseudoRabies Virus) (Van Zijl M. et al., J. Virol., 65:2761-2765 (1991)), ecpetvirus của gà tây (HVT: HerpesVirus of Turkey) (Morgan R. W. et al., Avian Dis. 36:858-870 (1992)), và virus bệnh Marek (MDV: Marek's Disease Virus). Các vector tái tổ hợp dựa trên giống ecpetvirus đang được nghiên cứu chuyên sâu.

Tuy nhiên, trong lĩnh vực này cần đến các sản phẩm vector virus mới có thể được sử dụng để biểu hiện các peptit hoặc protein tái tổ hợp *in vivo*. Về vấn đề này, poxvirus đã được thao tác di truyền để mã hóa các polypeptit khác nhau. Poxvirus, một khi được giải phóng ra khỏi các tế bào nhiễm bệnh vào trong máu, có thể gây nhiễm các tế bào khác và bằng cách đó có thể dẫn đến các mức biểu hiện gia tăng. Poxvirus tái tổ hợp đã được bào chế từ các typ poxvirus khác nhau bao gồm virus bệnh đậu bò, virus vaccinia và virus bệnh đậu lợn (SPV: SwinePox Virus). Tuy nhiên, cho tới nay, các thể tái tổ hợp của SPV được bào chế chủ yếu bằng cách tách dòng các trình tự gen ngoại lai trong vùng di truyền mà được coi là không thiết yếu đối với sự tồn tại của SPV, vùng TK (Richard W. Moyer, Eladio Vinuela, E. P. J. Gibbs, US5,651,972 (1997)).

Đơn PCT/EP2015/080468 của người nộp đơn mô tả trình tự gen protein gắn kết IL-18 (IL-18bp: IL-18 binding protein) là một vị trí tách dòng mới và rất có lợi trong SPV.

Tiếp tục nghiên cứu này, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng SPV khiếm khuyết kép, trong đó gen IL 18bp và ít nhất gen TK hoặc ARP bị khiếm khuyết, cho phép biểu hiện hiệu quả và ổn định một số trình tự gen ngoại lai in vivo, có thể được nhân lên một cách hiệu quả trong quá trình nuôi cấy, và được giảm độc lực ở mức độ cao in vivo. Do đó, các SPV khiếm khuyết kép này có các tính chất cải thiện và có thể được sử dụng để tạo ra các phương pháp trị liệu hoặc vaccin để điều trị động vật có vú bất kỳ, đặc biệt là lợn.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất virus bệnh đậu lợn tái tổ hợp mới và sử dụng chúng để vận chuyển và biểu hiện gen in vivo, đặc biệt là trong các chế phẩm vaccin. Virus bệnh đậu lợn tái tổ hợp theo sáng chế có khiếm khuyết kép đối với cả gen IL 18bp và gen TK và/hoặc ARP. Tốt hơn là, SPV theo sáng chế chứa một hoặc nhiều trình tự gen ngoại lai, tốt hơn là được tách dòng vào trong các vùng gen TK, ARP, hoặc IL 18bp khiếm khuyết của virus bệnh đậu lợn. Sáng chế đặc biệt thích hợp để tạo ra các vaccin dùng cho lợn, đặc biệt là để tiêm chủng cho lợn chống lại sự nhiễm PCV2.

Do đó, mục đích thứ nhất của sáng chế là đề cập đến virus bệnh đậu lợn tái tổ hợp (rSPV: recombinant SwinePox Virus) có ít nhất một gen virus khiếm khuyết thứ nhất và một gen virus khiếm khuyết thứ hai, trong đó gen virus khiếm khuyết thứ nhất là gen IL 18bp và gen virus khiếm khuyết thứ hai là gen thymidin kinaza (TK: Thymidine Kinase) hoặc gen protein lặp ankirin (ARP: Ankirin Repeat Protein).

Theo phương án cụ thể, sáng chế đề xuất virus bệnh đậu lợn (SPV) tái tổ hợp chứa gen IL 18bp khiếm khuyết và gen TK khiếm khuyết.

Theo phương án cụ thể khác, sáng chế đề xuất virus bệnh đậu lợn (SPV) tái tổ hợp chứa gen IL 18bp khiếm khuyết và gen ARP khiếm khuyết.

Tốt hơn là, rSPV chứa khuyết đoạn gồm ít nhất 50bp, ít nhất 100bp, ít nhất 200bp hoặc thậm chí ít nhất 300bp trong mỗi trình tự trong số các trình tự gen virus khiếm khuyết đích. Hơn nữa, theo phương án được ưu tiên, rSPV còn chứa ít nhất một trình tự gen ngoại lai mà có thể được đặt ở vị trí bất kỳ trong rSPV, tốt hơn là thay cho tất cả hoặc một phần trình tự gen virus bị khuyết đoạn. Theo một phương án cụ thể, rSPV theo sáng chế chứa hai trình tự gen ngoại lai, trình tự gen ngoại lai thứ nhất được chèn vào thay cho

trình tự gen IL 18bp virus khuyết đoạn và trình tự gen ngoại lai thứ hai được chèn vào thay cho trình tự gen TK hoặc ARP virus khuyết đoạn.

Một mục đích khác của sáng chế là phân tử axit nucleic chứa hệ gen của rSPV như được xác định ở trên.

Một mục đích khác của sáng chế là tế bào chủ chứa rSPV hoặc phân tử axit nucleic theo sáng chế.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp sản xuất rSPV, trong đó phương pháp này bao gồm bước gây nhiễm hoặc đưa phân tử axit nucleic như được xác định ở trên vào tế bào khả biến và thu hồi rSPV.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp để nhân lên rSPV, bao gồm bước gây nhiễm tế bào khả biến bằng rSPV như được xác định ở trên và thu hồi 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 xác định ở trên, hoặc tế bào như được xác định ở trên, hoặc phân tử axit nucleic như được xác định ở trên, và tá dược.

Một mục đích khác của sáng chế là chế phẩm vaccin chứa rSPV như được xác định ở trên, hoặc tế bào như được xác định ở trên, hoặc phân tử axit nucleic như được xác định 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 xác định ở trên để sử dụng để vận chuyển peptit hoặc protein trị liệu tới lợn hoặc để tiêm chủng peptit hoặc protein cho lợn.

Sáng chế cũng đề cập đến rSPV hoặc tế bào hoặc phân tử axit nucleic như được xác định ở trên để sử dụng để gây miễn dịch hoặc để tiêm chủng động vật có vú, tốt hơn là lợn, để chống lại tác nhân gây bệnh.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp tiêm chủng động vật có vú, tốt hơn là lợn, để chống lại tác nhân gây bệnh, bao gồm bước cho động vật có vú này sử dụng rSPV hoặc tế bào hoặc phân tử axit nucleic như được xác định ở trên.

Sáng chế cũng đề cập đến bộ kit tiêm chủng để gây miễn dịch cho lợn, trong đó bộ kit này bao gồm các thành phần sau:

- a. lượng hữu hiệu của rSPV hoặc vaccin như được xác định ở trên, và
- b. phương tiện để sử dụng rSPV hoặc vaccin này cho lợn nêu trên.

Sáng chế có thể được sử dụng để vận chuyển và biểu hiện trình tự gen ngoại lai bất kỳ ở động vật có vú, đặc biệt là lợn. Đặc biệt thích hợp để biểu hiện các kháng nguyên ngoại lai để gây miễn dịch hoặc tiêm chủng lợn (ví dụ, lợn, lợn con, lợn nái).

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện sơ đồ cấu trúc của plasmid trung gian pSP91

Fig.2 thể hiện sơ đồ cấu trúc của các plasmid tương đồng pSP911-Ess_ORF2cc, và pSP911-ORF2cc

Fig.3 thể hiện sơ đồ cấu trúc của plasmid tương đồng pSP53-ORF2

Fig. 4 thể hiện sơ đồ cấu trúc của plasmid tương đồng pSP72-ORF2

Fig. 5 minh họa các cấu trúc hệ gen của SPV tái tổ hợp

Fig. 6 thể hiện kết quả kiểm tra giai đoạn cấy chuyển SVR14 và SVR15 in vitro bằng phương pháp phản ứng chuỗi polymeraza (PCR: Polymerase Chain Reaction).

(A) Kết quả PCR. PCR được thực hiện bằng cách sử dụng bộ đoạn môi SP7450F và SP8552R. Mỗi khuôn mẫu là ADN virus của các lần cấy chuyển +0 hoặc +15p in vitro của SVR14 và SVR15. Mỗi plasmid cấy chuyển ở giai đoạn chuyển nhiễm để tạo ra SVR12, SVR14 hoặc SVR15 và pCR4-SPV6030/9574 lần lượt được sử dụng cho khuôn mẫu đối chứng dương tính (PC: positive control) hoặc đối chứng âm tính (NC: negative control). Các dấu chuẩn có trọng lượng phân tử bằng 10kb (M1) và pHY. (B) minh họa vùng bổ sung của gen IL-18bp của SPV cha-mẹ, rSPV, SVR14 và SVR15. Khoảng màu vàng là gen IL-18bp.

Fig.7 thể hiện kết quả của phép thẩm tách Western của rSPV đã tinh chế

Các tế bào ESK-4 được gây nhiễm bằng SPV kiểu dại (wt: wild type), SVR14 (14) hoặc SVR15 (15). 6 ngày sau, dịch tan tế bào được đưa lên SDS-PAGE 15% và phép phân tích thẩm tách Western có sử dụng kháng thể kháng ORF2 của chuột (1:500), kháng thể thứ hai là kháng thể IgG kháng chuột của dê liên hợp với biotin (1:1000) và ABC-ALP (Vecterstain). M: dấu chuẩn trọng lượng phân tử.

Fig. 8 thể hiện kết quả kiểm tra giai đoạn cấy chuyển SVR16 và SVR17 in vitro bằng cách sử dụng phương pháp PCR

(A) Kết quả PCR. PCR được thực hiện bằng cách sử dụng bộ đoạn môi P05-8 và P05-9. Mỗi khuôn mẫu là ADN virus của các lần cấy chuyển (+0p và +15p) in vivo của SVR16 và 17. Plasmid cấy chuyển, pSP53-ORF2 và pNZSP5 (được mô tả trong ví dụ thử nghiệm 3 và Fig. 3 của đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế Nhật bản số JP2003-

111591A) tương ứng được sử dụng làm các khuôn mẫu đối chứng dương tính (PC) và đối chứng âm tính (NC). Các dấu chuẩn có trọng lượng phân tử bằng 10kb (M1) và λ HindIII (M2). (B) minh họa vùng bổ sung của gen ARP của SPV cha-mẹ, rSPV, SVR16 và SVR17.

Fig. 9 là kết quả của phép kiểm tra giai đoạn cấy chuyển SVR20 in vitro bằng phương pháp PCR

(A) Kết quả PCR. PCR được thực hiện bằng cách sử dụng hai bộ đoạn môi (a) SP7450F và SP8552R, và (b) SP55500F và SP56363R. Mỗi khuôn mẫu là mỗi ADN virus của SVR20 của lần cấy chuyển +0p hoặc +15p. Mỗi plasmit pCR4-SPV6030/9574 (N1), hoặc pCR4-SPV54242/57617 (N2), và pSP911-ORF2cc (P1) hoặc pSP72-ORF2 (P2) được sử dụng cho các khuôn mẫu đối với đối chứng âm tính và dương tính. Các sản phẩm PCR của (a) hoặc (b) tương ứng được đặt lên gel agarosa 2% hoặc 0,8%. Các dấu chuẩn có trọng lượng phân tử bằng 10kb (M1) và các dấu chuẩn pHY (M2). (B) minh họa vùng bổ sung của gen TK của SPV kiểu dại và SVR20. Khoảng màu vàng là gen TK.

Fig.10 thể hiện kết quả của phép thâm tách Western của rSPV đã tinh chế

Các tế bào ESK-4 được gây nhiễm bằng SPV kiểu dại (wt), SVR14 (14), SVR15 (15), SVR16 (16), SVR17 (17), hoặc SVR20 (20) ở độ bội nhiễm (M.O.I.: Multiplicity Of Infection) bằng 0,1. 6 ngày sau, các dịch tan tế bào được đưa lên SDS-PAGE 15% và phép phân tích thâm tách Western có sử dụng kháng thể kháng ORF2 của chuột (1:500), kháng thể thứ hai là kháng thể IgG kháng chuột của dê liên hợp với biotin (1:1000) và ABC-ALP (Vecterstain). M: dấu chuẩn trọng lượng phân tử.

Fig.11 thể hiện sự biến đổi của các kích thước vết đỏ ở các vị trí tiêm của lợn.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế cập đến virus bệnh đậu lợn tái tổ hợp mới và việc sử dụng chúng. Virus bệnh đậu lợn tái tổ hợp theo sáng chế có khiếm khuyết kép đối với gen IL 18bp và đối với gen thứ hai được chọn từ các gen TK và ARP của virus bệnh đậu lợn và tốt hơn là chứa một hoặc nhiều trình tự gen ngoại lai. Như được thể hiện trong phần thực nghiệm, các vector khiếm khuyết kép này cho phép biểu hiện gen kéo dài và có hiệu quả. Hơn nữa, rSPV theo sáng chế là ổn định và có thể tạo ra các đáp ứng miễn dịch được cải thiện in vivo. Ngoài ra, các vector SPV theo sáng chế được giảm độc lực ở mức độ cao. Đây là báo cáo đầu tiên về virus SPV khiếm khuyết kép và là sự chứng minh đầu tiên rằng SPV này có thể biểu hiện các trình tự gen ngoại lai, tạo ra các vector SPV tái tổ hợp ổn định, sinh miễn dịch và tạo ra ở mức độ cao. rSPV theo sáng chế có thể chứa nhiều hơn một trình tự gen ngoại

lai, và chúng có thể được sử dụng một mình hoặc phối hợp với các virus hoặc kháng nguyên tái tổ hợp khác để tạo ra các vaccine cải tiến. Sáng chế đặc biệt thích hợp để tạo ra các vaccine dùng cho lợn, đặc biệt là để tiêm chủng cho lợn chống lại sự nhiễm PCV2.

Virut bệnh đậu lợn tái tổ hợp (rSPV)

Trong ngữ cảnh của sáng chế, virus bệnh đậu lợn tái tổ hợp, nói chung là virus bệnh đậu lợn có hệ gen được thao tác di truyền nhân tạo (ví dụ, tái tổ hợp). Đặc biệt, rSPV bao gồm virus bệnh đậu lợn chứa vật liệu hoặc trình tự gen ngoại lai trong hệ gen của nó. rSPV thường chứa hệ gen SPV chứa trình tự gen ngoại lai, được đóng gói vào trong capsit hoặc vỏ SPV, có thể còn chứa protein hoặc peptit ngoại lai.

rSPV theo sáng chế có thể được bào chế bắt đầu từ SPV bất kỳ, như các SPV xuất hiện trong tự nhiên hoặc các SPV sẵn có từ các bộ sưu tập như từ Tổ chức sưu tập giống chuẩn của Mỹ (ATCC: American Type Culture Collection), Tổ chức sưu tập vi sinh vật quốc gia (CNCM: Collection nationale de cultures de micro-organismes), v.v.. Tốt hơn là, rSPV theo sáng chế được tạo ra từ chủng kasza của SPV (VR-363), thể phân lập 17077-99 (GeneBank Acc: AF410153.1), hoặc chủng VTCC/AVA/121 (GeneBank Acc: KJ725378.1). Các SPV như vậy là có sẵn từ các bộ sưu tập hoặc thư viện, hoặc có thể được tách dòng từ các trình tự hệ gen có sẵn công khai của chúng. Các thể phân lập SPV khác cũng có thể được phân lập từ các động vật đã nhiễm bệnh và được sử dụng để bào chế rSPV theo sáng chế.

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

Để xây dựng virus tái tổ hợp theo sáng chế, ban đầu, virus SPV có thể được nhân lên trong tế bào chủ thích hợp và sau đó thu được ADN hệ gen. Tiếp theo, các vùng IL 18bp, TK và/hoặc ARP của ADN hệ gen được nhận dạng và làm cho khiếm khuyết (ví dụ, loại bỏ, toàn bộ hoặc một phần). Tiếp theo, hoặc đồng thời, trình tự gen ngoại lai (hoặc vị trí tách dòng cho phép chèn một trình tự gen ngoại lai) có thể được chèn vào trong ADN hệ gen, tùy ý thay cho trình tự gen nội sinh đã bị loại bỏ. Hệ gen của SPV tái tổ hợp thu được theo cách như vậy có thể được sử dụng để tạo ra rSPV bằng cách chuyển dạng 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 tách dòng) được bổ sung bởi các trình tự tương đồng với các vùng gen IL 18bp, TK và/hoặc ARP và nằm trong vùng mã hóa. Khi đưa vào tế bào khả biến với sự có mặt của virus hoặc hệ gen SPV, sự tái tổ hợp tương đồng giữa vector con thoi và hệ gen tạo ra rSPV có các gen khiếm khuyết và chứa trình tự gen ngoại lai. Một khi rSPV đã được thao tác di truyền như được mô tả ở trên, nó có thể dễ dàng được sao chép và nhân lên bằng cách nuôi cấy đơn giản trên các tế bào khả biến bất kỳ.

SPV có thể được nuôi cấy, duy trì hoặc nhân lên trong các tế bào thận phôi lợn, như tế bào ESK-4 (CL-184), thường được nuôi cấy ở 37°C trong 5% CO₂ trong môi trường Ham's F-12K ((Gibco, Cat. No.: 21127-022) được bổ sung 1% streptomycin-penicillin (Gibco, Cat. No.: 15140-122) và 5% FBS (Gibco, Cat. No.: 10437-028). ADN có thể được chiết ra khỏi các tế bào đã nhiễm virus theo phương pháp thông thường bất kỳ. Ví dụ, các tế bào phát triển thành các lớp đơn phân tử có thể được cạo ra và sau đó quay để thu hồi phần nổi lên trên. Sau khi protein được làm biến tính trong chất đệm phân giải và loại bỏ, ADN có thể được chiết bằng phenol và/hoặc etanol.

Trong ngữ cảnh của sáng chế, gen “khiếm khuyết” nghĩa là gen bị khuyết đoạn một phần hoặc toàn toàn. Cụ thể hơn, SPV chứa gen khiếm khuyết là SPV chứa khuyết đoạn gồm ít nhất 20bp trong trình tự mã hóa của gen này, tốt hơn là ít nhất 50bp, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 100bp, còn tốt hơn nữa là ít nhất 150bp, ít nhất 200bp, hoặc thậm chí ít nhất 300bp.

Gen IL 18bp của ADN virus của SPV chứa khoảng 402bp, và thường nằm ở các gốc nt 7745-8146 của hệ gen SPV. Là một ví dụ cụ thể, trong chủng kasza của SPV (VR-363), gen IL 18bp nằm ở nt7745-8146. Vị trí chính xác của gen IL 18bp trong chủng SPV bất kỳ có thể được xác định một cách dễ dàng bằng cách sử dụng kiến thức phổ biến, phép phân tích trình tự và/hoặc sự sắp thẳng hàng trình tự thông thường.

Gen TK của ADN virus của SPV chứa khoảng 543bp, và thường nằm ở các gốc nt 55625-56167 của hệ gen SPV. Là một ví dụ cụ thể, trong chủng kasza của SPV (VR-363), gen TK nằm ở nt55625-56167. Vị trí chính xác của gen TK trong chủng SPV bất kỳ có thể được xác định một cách dễ dàng bằng cách sử dụng kiến thức phổ biến, phép phân tích trình tự và/hoặc sự sắp thẳng hàng trình tự thông thường.

Gen ARP của ADN virut của SPV chứa khoảng 1455bp, và thường nằm ở các gốc nt 137100-138554 của hệ gen SPV. Là một ví dụ cụ thể, trong chủng kasza của SPV (VR-363), gen ARP nằm ở nt137100-138554. Vị trí chính xác của gen ARP trong chủng SPV bất kỳ có thể được xác định một cách dễ dàng bằng cách sử dụng kiến thức phổ biến, phép phân tích trình tự và/hoặc sự sắp thẳng hàng trình tự thông thường.

rSPV được ưu tiên theo sáng chế chứa gen IL 18bp khiếm khuyết, trong đó gen IL 18bp nội sinh thiếu ít nhất 50nt, tốt hơn là ít nhất 100nt, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 150nt, ít nhất 200nt, ít nhất 250nt, ít nhất 300nt, còn tốt hơn nữa là trong khoảng 320nt và 380nt. rSPV cụ thể và được ưu tiên theo sáng chế chứa khuyết đoạn gồm ít nhất nt 100-200 của gen IL 18bp, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất nt50-300 của gen IL 18bp, như nt31-382 hoặc nt19-369 của gen IL 18bp.

rSPV được ưu tiên theo sáng chế còn chứa gen TK khiếm khuyết, trong đó gen TK nội sinh thiếu ít nhất 50nt, tốt hơn là ít nhất 100nt, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 150nt, ít nhất 200nt, ít nhất 250nt, ít nhất 300nt, còn tốt hơn nữa là ít nhất 400nt, như trong khoảng 420nt và 500nt. rSPV cụ thể và được ưu tiên theo sáng chế chứa khuyết đoạn gồm ít nhất nt 100-300 của gen TK, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất nt70-450 của gen TK, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất nt60-500 của gen TK như nt59-536 của gen TK.

Về gen ARP, trong rSPV theo sáng chế chứa gen ARP khiếm khuyết, trình tự mã hóa gen ARP nội sinh tốt hơn là thiếu ít nhất 50nt, tốt hơn là ít nhất 100nt, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 110nt. rSPV cụ thể và được ưu tiên theo sáng chế chứa khuyết đoạn gồm ít nhất nt1150-1200 của gen ARP, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất nt1130-1220 của gen ARP, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất nt1116-1228 của gen ARP. Sự khuyết đoạn lớn hơn cũng có thể được thực hiện, gồm khoảng từ 800 đến 1300bp của gen ARP.

Theo phương án cụ thể, rSPV theo sáng chế chứa khuyết đoạn gồm ít nhất nt50-300 của gen IL18bp và khuyết đoạn gồm ít nhất nt70-450 của gen TK. Theo phương án cụ thể, rSPV chứa khuyết đoạn nt31-382 hoặc nt19-369 của gen IL18bp và khuyết đoạn nt59-536 của gen TK.

Theo phương án cụ thể khác, rSPV theo sáng chế chứa khuyết đoạn gồm ít nhất nt50-300 của gen IL18bp và khuyết đoạn gồm ít nhất nt11340-1220 của gen ARP. Theo phương án cụ thể, rSPV chứa khuyết đoạn nt31-382 hoặc nt19-369 của gen IL18bp và khuyết đoạn nt1116-1228 của gen TK.

Theo phương án cụ thể, rSPV theo sáng chế chứa một trình tự gen ngoại lai được chèn vào thay cho một trong số các vùng đã loại bỏ nêu trên. Theo một phương án khác, rSPV chứa ít nhất 2 axit nucleic ngoại lai, mỗi axit nằm ở vị trí khác biệt được chọn từ các vùng đã được loại bỏ nêu trên.

Việc xây dựng rSPV theo sáng chế có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp thực chất là đã biết trong lĩnh vực này, theo hướng dẫn và thông tin có trong đơn này. Cụ thể, người có trình độ trong lĩnh vực này có thể chèn một trình tự gen ngoại lai trong trình tự TK, ARP hoặc IL18bp, thay thế hoặc toàn bộ hoặc một phần của trình tự nội sinh, bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết, như gây đột biến, PCR, tái tổ hợp tương đồng, v.v..

Theo một phương án cụ thể, vector con thoi được bào chế bằng kỹ thuật ADN tái tổ hợp, trong đó trình tự gen ngoại lai được tách dòng bổ sung bởi hai vùng tương đồng IL18bp hoặc TK. Thông thường, mỗi vùng tương đồng chứa 50-1000 nt của trình tự gen IL18bp hoặc TK, cho phép sự tái tổ hợp tương đồng cụ thể. Vector con thoi có thể được bào chế từ các plasmit, cosmit và thể thực khuẩn đã biết bất kỳ hoặc thông thường, và loại tương tự, như plasmit pBS, pBR322, pUC18, pUC19 và pHC79. Sau đó, plasmit con thoi có thể được đưa vào tế bào đã gây nhiễm SPV bằng cách sử dụng công nghệ điện di siêu thấm thấu, canxi phosphat, phương pháp trên cơ sở lipopectin hoặc phương pháp tương tự. Virut SPV tái tổ hợp hợp nhất trình tự gen ngoại lai sau đó được lựa chọn. Trình tự của chúng có thể được kiểm tra lại. Sau đó, rSPV có thể được duy trì trong tế bào khả biến thích hợp bất kỳ. Virut có thể được duy trì trong môi trường nuôi cấy, hoặc được tinh chế và làm đông lạnh hoặc làm đông khô nhanh.

Các ví dụ cụ thể về rSPV theo sáng chế chứa khuyết đoạn gồm ít nhất 50nt trong gen IL 18bp, và ít nhất 50nt trong gen TK hoặc ARP.

Virut được ưu tiên theo sáng chế chứa khuyết đoạn gồm ít nhất 100nt trong gen IL 18bp, và ít nhất 100nt trong gen TK hoặc ARP.

Virut được ưu tiên hơn theo sáng chế chứa khuyết đoạn gồm ít nhất 200nt trong gen IL 18bp, và ít nhất 200nt trong gen TK.

Các virut cụ thể khác theo sáng chế là virut bệnh đậu lợn tái tổ hợp (rSPV) có gen virut IL 18bp khiếm khuyết và không chứa trình tự gen ngoại lai mã hóa. Virut này được làm giảm độc lực và có thể được sử dụng để tạo ra rSPV chứa trình tự gen ngoại lai có thể được chèn vào vùng khác biệt với trình tự gen IL 18bp.

Trình tự gen ngoại lai

Trình tự gen ngoại lai có thể là trình tự axit nucleic bất kỳ hoặc phân tử không có mặt tự nhiên trong hệ gen SPV, hoặc không có mặt tự nhiên ở vị trí như vậy trong hệ gen SPV. Trình tự gen ngoại lai thường chứa trình tự axit nucleic mã hóa ARN thông tin (mRNA: Messenger RiboNucleic Acid), peptit hoặc polypeptit (hoặc protein). Trình tự gen ngoại lai, ví dụ, có thể mã hóa nhiều loại phân tử hoạt tính khác nhau, như kháng nguyên, chất phụ trợ, xytokin, lymphokin, yếu tố sinh trưởng, enzym, nguyên tử đánh dấu, v.v..

Theo phương án được ưu tiên, trình tự gen ngoại lai mã hóa kháng nguyên (kháng nguyên peptit, polypeptit hoặc protein) từ tác nhân gây bệnh của bệnh nhiễm ở lợn, và tốt nhất là kháng nguyên từ virus, vi khuẩn, nấm hoặc động vật nguyên sinh. Trong ngữ cảnh của 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 các protein có chiều dài đầy đủ.

Tốt hơn là trình tự gen ngoại lai mã hóa peptit hoặc polypeptit (ví dụ, glycoprotein, protein capsit, hoặc mảnh của nó) của virus hoặc tác nhân gây bệnh được chọn từ circovirus lợn (PCV1, PCV2, PCV2a, PCV2b, PCV2d, PCV3), *Actinobacillus pleuropneumoniae*; Adenovirus; Alphavirus như virus viêm não tủy ngựa miền đông; *Balantidium coli*; *Bordetella bronchiseptica*; *Brachyspira* spp., tốt hơn là *B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli*, *B. innocens*, *Brucella suis*, tốt hơn là biovar 1, 2 và 3; virus dịch tả lợn cổ điển, virus dịch tả 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* các typ A, B và C, *Cl. novyi*, *Cl. septicum*, *Cl. tetani*; coronavirus gây bệnh cắt và hô hấp; *Cryptosporidium parvum*; *Eimeria* spp; *Eperythrozoonis suis* thường được gọi là *Mycoplasma haemosuis*; *Erysipelothrix rhusiopathiae*; *Escherichia coli*; *Haemophilus parasuis*, tốt hơn là các typ phụ 1, 7 và 14; virus viêm não tủy ngưng kết hồng cầu; *Isospora suis*; virus 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 hyopneumoniae*; Parvovirus; *Pasteurella multocida*; virus cự bào ở lợn; parovirus ở lợn, virus gây hội chứng sinh sản và hô hấp ở lợn: virus Pseudorabies; Rotavirus; virus Sagiyama; *Salmonella* spp., tốt hơn là *S. typhimurium* và *S. choleraesuis*;

Staphylococcus spp., tốt hơn là *S. hyicus*; *Streptococcus* spp., tốt hơn là *Streptococcus suis*; virus cự bào ở lợn; virus ecpet ở lợn; virus cúm ở lợn; virus bệnh đậu lợn; *Toxoplasma gondii*; virus bệnh viêm miệng mụn nước hoặc virus bệnh chàm ở lợn.

Theo phương án được đặc biệt ưu tiên, trình tự gen ngoại lai mã hóa kháng nguyên của PCV2, đặc biệt là protein hoặc peptit của PVC2, thậm chí đặc biệt hơn nữa là protein hoặc peptit capsit của PVC2 (ví dụ, ORF2).

Trình tự gen ngoại lai có thể chứa gen khởi đầu phiên mã để cho phép hoặc gia tăng biểu hiện của mARN hoặc polypeptit đã mã hóa. Gen khởi đầu được sử dụng có thể là gen khởi đầu tổng hợp hoặc tự nhiên, kể cả gen khởi đầu của virus bệnh đậu lợn, gen khởi đầu của poxvirus hoặc gen khởi đầu được dẫn xuất từ các virus hoặc tế bào khác nhau như các gen khởi đầu được dẫn xuất từ các sinh vật có nhân chuẩn và chưa có nhân chuẩn. Các ví dụ cụ thể về gen khởi đầu bao gồm gen khởi đầu 7,5-kD của virus vaccinia (P7.5k) (Davison A. J. et al., *J. Mol. Biol.*, 210(4):749-69 (1989)), gen khởi đầu 11-kD (P11k) (Bertholet et al., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 82:2096-2100 (1985)) hoặc gen khởi đầu 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 ecpetvirus (Ross L. J., *Gen. Virol.* 74:371-377 (1993)), gen khởi đầu gB protein (nêu trên) của HVT hoặc MDV, gen khởi đầu IE của virus cự bào ở người (HCMV: Human CytoMegalovirus) (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 Rous sacom (Fiek A. et al., *Nucleic Acids Res.*, 20:1785 (1992)), và gen khởi đầu tương tự. Ngoài ra, các gen khởi đầu của các 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, nằm ở cùng một vùng tách dòng và/hoặc ở các vị trí tách dòng khác biệt.

Theo một phương án cụ thể, rSPV theo sáng chế chứa ít nhất 2 trình tự gen ngoại lai mã hóa hai kháng nguyên khác biệt (từ cùng một tác nhân gây bệnh hoặc từ tác nhân gây bệnh khác biệt). Về vấn đề này, theo một phương án cụ thể khác, rSPV theo sáng chế chứa ít nhất một trình tự gen ngoại lai mã hóa kháng nguyên của PCV2 và một trình tự gen ngoại lai mã hóa một kháng nguyên khác. Theo một phương án cụ thể khác, rSPV

theo sáng chế chứa trình tự gen ngoại lai mã hóa kháng nguyên và trình tự gen ngoại lai mã hóa chất phụ trợ hoặc xytokin.

Theo một phương án cụ thể khác, rSPV theo sáng chế chứa ít nhất hai trình tự gen ngoại lai mỗi trình tự gen ngoại lai này mã hóa một kháng nguyên của PCV2, cụ thể là mỗi trình tự gen ngoại lai mã hóa một protein hoặc peptit của ORF2, mà có thể là giống hoặc khác nhau.

Về vấn đề này, một phương án khác theo sáng chế đề cập đến virus tái tổ hợp chứa ít nhất hai trình tự gen ngoại lai, mỗi trình tự gen ngoại lai này mã hóa protein hoặc peptit của ORF2 của PCV2, trong đó mỗi trình tự trong số các trình tự gen ngoại lai này chứa tín hiệu hướng đến tế bào khác cho phép biểu hiện protein hoặc peptit của ORF2 của PCV2 trong các ngăn khác nhau của tế bào. Cụ thể, theo phương án được ưu tiên, một trong số các trình tự gen ngoại lai này mã hóa protein hoặc peptit của ORF2 trong tế bào chất của PCV2 và trình tự gen ngoại lai còn lại mã hóa protein hoặc peptit của ORF2 của PCV2 được bộc lộ ở bề mặt tế bào (biểu hiện màng tế bào bên ngoài). Thực vậy, sáng chế cho thấy rằng sự đồng biểu hiện protein hoặc peptit của ORF2 của PCV2 trong hai ngăn tế bào khác nhau tạo ra đáp ứng miễn dịch mạnh hơn *in vivo*, cho phép bảo vệ động vật một cách tốt hơn. Theo một phương án cụ thể, sự hướng đến màng tế bào của protein hoặc peptit của ORF2 đạt được bằng cách sử dụng peptit hướng đến màng tế bào được dẫn xuất từ gen B5R của virus vaccinia, như được mô tả trong WO2014/167060. Theo cách khác, các trình tự hướng đến tế bào có thể được cân nhắc.

Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến rSPV chứa ít nhất hai trình tự gen ngoại lai, mỗi trình tự mã hóa một kháng nguyên của PCV2, cụ thể là protein hoặc peptit của ORF2, trong đó một trình tự gen ngoại lai nằm trong hệ gen của virus thay cho trình tự gen IL 18bp đã bị loại bỏ, và một trình tự gen ngoại lai nằm ở hệ gen của virus thay cho trình tự gen TK hoặc ARP đã được loại bỏ của virus, và hơn nữa trong đó một trong số các trình tự gen ngoại lai cho phép biểu hiện kháng nguyên của PCV2 trong tế bào chất và trình tự khác trong số các trình tự gen ngoại lai này cho phép bộc lộ kháng nguyên của PCV2 trên màng tế bào.

Trong rSPV đa giá theo sáng chế, ít nhất hai trình tự gen ngoại lai có thể được kiểm soát bởi các gen khởi đầu giống hoặc khác nhau và ở cùng một hướng hay ở hướng ngược nhau.

Phân tử axit nucleic

Sáng chế cũng đề cập đến phân tử axit nucleic chứa hệ gen của rSPV theo sáng chế. 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, còn được gọi là sợi có nghĩa, hoặc nó có thể là sợi không mã hóa, còn được gọi là sợi đối nghĩa. Sáng chế còn đề cập đến các biến thể hoặc chất tương tự của các phân tử axit nucleic này, ví dụ, các phân tử có độ đồng nhất trình tự của chúng bằng ít nhất 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% cao hơn hoặc.

Độ tương đồng giữa hai trình tự axit nucleic có thể được xác định bằng các chương trình máy tính đã biết trong lĩnh vực này như GAP được cung cấp trong gói chương trình GCG (Hướng dẫn chương trình cho gói Wisconsin, phiên bản 8, 8.1996, Nhóm máy tính di truyền, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 5371 1) (Needleman, S. B. and Wunsch, CD., (1970), *Journal of Molecular Biology*, 48, 443-453). Bằng cách sử dụng GAP có các thiết định sau để so sánh trình tự ADN: Điểm phạt tạo GAP bằng 5,0 và điểm phạt mở rộng GAP bằng 0,3. Các phân tử axit nucleic có thể được sắp thẳng hàng với nhau bằng cách sử dụng phần mềm sắp thẳng hàng Pileup, sẵn có dưới dạng một phần của gói chương trình GCG, ví dụ, bằng cách sử dụng các thiết định ngầm định của điểm phạt tạo GAP bằng 5 và điểm phạt độ rộng GAP bằng 0,3.

Các điều kiện thử nghiệm thích hợp để xác định liệu phân tử axit nucleic đã cho có lai hóa với axit nucleic đã định rõ hay không có thể liên quan đến việc làm thấm ướt sơ bộ bộ lọc chứa mẫu có liên quan của axit nucleic cần được kiểm tra trong 5 x SSC trong 10 phút, và sự lai hóa sơ bộ bộ lọc trong dung dịch 5 x SSC, 5 x dung dịch Denhardt, 0,5% SDS và 100 [mu]g/ml ADN tinh trùng cá hồi đã siêu âm biến tính, tiếp theo lai hóa trong cùng một dung dịch chứa nồng độ 10ng/ml của đoạn dò được đánh dấu bằng P-dCTP trong 12 giờ ở khoảng 45<0>C, theo các phương pháp lai hóa được mô tả trong Sambrook et al. (1989; *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, tái bản lần thứ hai, Cold Spring Harbour, New York). Sau đó, bộ lọc được rửa hai lần trong 30 phút trong 2 x SSC, 0,5% SDS ở ít nhất 55 <0>C (tính chính xác thấp), ít nhất 60<0>C (tính chính xác trung bình), ít nhất 65<0>C (tính chính xác trung bình/cao), ít nhất 70<0>C (tính chính xác cao), hoặc ít nhất 75<0>C (tính chính xác rất cao). Sự lai hóa có thể được phát hiện bằng cách cho bộ lọc tiếp xúc với phim chụp X quang.

Phân tử axit nucleic theo sáng chế có thể được tạo ra ở dạng phân tử axit nucleic thực chất như các phân tử axit nucleic trần; vector; virus hoặc tế bào chủ v.v.. Các vector bao gồm các vector biểu hiện chứa phân tử axit nucleic theo sáng chế.

Tế bào chủ

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất tế bào chủ được biến nạp bằng axit nucleic hoặc bằng rSPV theo sáng chế. Các tế bào này có thể tạo ra rSPV theo sáng chế. Các ví dụ thích hợp về tế bào chủ là đã biết đối với người có trình độ trong lĩnh vực này hoặc có thể được lựa chọn một cách dễ dàng bởi người có trình độ trong lĩnh vực này. Tốt hơn là, các tế bào chủ là tế bào có nhân chuẩn như tế bào 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 tế bào thận lợn, như tế bào ESK-4 (CL-184).

Chế phẩm vaccin và phương pháp

Thuật ngữ “vaccin” như được sử dụng ở đây bao gồm chế phẩm bất kỳ có thể được sử dụng để gây ra, kích thích hoặc khuếch đại đáp ứng miễn dịch ở động vật (ví dụ, lợn) chống lại tác nhân gây bệnh. Các ví dụ cụ thể về vaccin theo sáng chế là chế phẩm có thể gây ra hoặc kích thích hoặc khuếch đại tính miễn dịch chống lại virus PCV2. Trong vaccin theo sáng chế, ít nhất một trình tự gen ngoại lai sẽ mã hóa kháng nguyên hoặc chất phụ trợ.

Thuật ngữ “gây miễn dịch” bao gồm quy trình vận chuyển chất sinh miễn dịch đến đối tượng. Sự gây miễn dịch, ví dụ, có thể cho phép duy trì mức kháng thể và/hoặc đáp ứng tế bào cao trong đó, các lympho bào T có thể tiêu diệt hoặc ức chế tác nhân gây bệnh ở động vật không phải là người đã được gây miễn dịch, như lợn, mà được dự định chống lại tác nhân gây bệnh hoặc kháng nguyên mà động vật đã phơi nhiễm trước đó.

Vaccin theo sáng chế chứa lượng có tác dụng miễn dịch của rSPV hoặc axit nucleic hoặc tế bào như được xác định trên đây trong chất dẫn được dùng.

Trong thực nghiệm, lượng chính xác cần thiết đối với liều lượng có tác dụng miễn dịch có thể thay đổi từ đối tượng này đến đối tượng khác phụ thuộc vào các yếu tố như tuổi và tình trạng chung của đối tượng, bản chất của chế phẩm và phương thức sử dụng. “Lượng có tác dụng” thích hợp có thể được xác định bởi người có trình độ trong lĩnh vực này bằng cách chỉ sử dụng quá trình thử nghiệm thông thường. Ví dụ, các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này để xác định hoặc chuẩn độ các liều lượng thích hợp của vaccin để tìm ra liều lượng có tác dụng tối thiểu dựa trên trọng lượng của đối tượng động vật không phải là người, nồng độ của vaccin và các yếu tố thông thường khác. Theo phương án thông thường, vaccin bao gồm liều đơn vị chứa rSPV theo sáng chế với lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 10.000.000 TCID₅₀, tốt hơn là trong khoảng từ 100 đến 1.000.000

TCID₅₀, thậm chí tốt hơn nữa là trong khoảng từ 1.000 đến 100.000 TCID₅₀. TCID₅₀ dùng để chỉ liều gây nhiễm 50% giống nuôi cấy mô, nghĩa là, lượng virus tạo ra mức thay đổi bệnh lý bằng 50% của giống nuôi cấy tế bào đã cấy truyền.

Liều lượng vaccin, nồng độ của các thành phần ở đây và việc chọn thời gian sử dụng vaccin, để tạo ra đáp ứng miễn dịch thích hợp có thể được xác định bằng các phương pháp như bằng cách chuẩn độ kháng thể trong huyết thanh, ví dụ bằng phương pháp xét nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym (ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) và/hoặc phân tích xét nghiệm trung hòa huyết thanh và/hoặc bằng cách đánh giá thử thách dùng vaccin.

Vaccin có thể chứa các thành phần khác, thực chất là đã biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, như chất mang, tá dược, chất pha loãng, chất phụ trợ, chất làm ổn định quá trình làm khô đông lạnh, chất thẩm ướt hoặc chất nhũ hóa, chất đệm pH, chất tạo gel hoặc chất phụ gia tăng cường độ nhớt, hoặc chất bảo quản được dùng, phụ thuộc vào đường sử dụng.

Ví dụ về các chất mang, tá dược hoặc chất pha loãng được dùng, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nước khử khoáng hoặc nước cất; dung dịch nước muối; dầu thực vật như dầu lạc, dầu lạc, dầu hoa rum, dầu oliu, dầu hạt bông, dầu ngô, dầu vừng hoặc dầu dừa; dầu silicon, kể cả các polysiloxan, như methyl polysiloxan, phenyl polysiloxan và methylphenyl polysiloxan; các silicon dễ bay hơi; các dầu khoáng như dầu parafin lỏng nhẹ, hoặc dầu parafin lỏng nặng; squalen, các dẫn xuất xenluloza như methyl xenluloza, etyl xenluloza, carboxymethylxenluloza, muối carboxymethylxenluloza natri hoặc hydroxypropyl methylxenluloza; các alkanol thấp, ví dụ etanol hoặc iso-propanol; các aralkanol thấp; các polyalkylen glycol thấp hoặc các alkylen glycol thấp, ví dụ polyetylen glycol, polypropylen glycol, etylen glycol, propylen glycol, 1,3-butylen glycol hoặc glyxerin; các este của axit béo như isopropyl palmitat, isopropyl myristat hoặc etyl oleat; polyvinylpyrrolidon; aga; caragenan; gồm tragacant hoặc gồm acaxia, và vazolin. Thông thường, chất mang hoặc các chất mang sẽ chiếm từ 10% đến 99,9% trọng lượng của chế phẩm vaksin và có thể được tạo đệm bằng các phương pháp thông thường bằng cách sử dụng các chất phản ứng đã biết trong lĩnh vực này, như natri hydro phosphat, natri dihydro phosphat, kali hydro phosphat, kali dihydro phosphat, hỗn hợp của chúng, và chất tương tự.

Ví dụ về các chất phụ trợ, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nhũ tương dầu trong nước, nhôm hydroxit (alum), phức chất kích thích miễn dịch, polyme hoặc copolyme khối không ion, các xytokin (như IL- 1, IL-2, IL-7, IFN-[alpha], IFN-[beta], IFN-y, v.v.), các saponin, monophosphoryl lipit A (MLA), muramyl dipeptit (MDP) và chất tương tự. Các chất phụ trợ thích hợp khác, ví dụ, bao gồm, nhôm kali sulfat, (các) độc tố đường ruột không bền nhiệt hoặc ổn định nhiệt được phân lập từ *Escherichia coli*, độc tố cholera hoặc cấu trúc dưới phân tử B của nó, độc tố diphtheria, độc tố tetanus, độc tố pertussis, chất phụ trợ Freund không hoàn chỉnh hoặc hoàn chỉnh, v.v.. Các chất phụ trợ trên cơ sở độc tố, như độc tố diphtheria, độc tố tetanus và độc tố pertussis có thể được làm bất hoạt trước khi sử dụng, ví dụ, bằng cách xử lý bằng formaldehyt.

Ví dụ về chất làm ổn định quá trình làm khô đông lạnh, ví dụ, có thể là các carbohydrat như sorbitol, manitol, tinh bột, sucroza, dextran hoặc glucoza, các protein như albumin hoặc casein, và các dẫn xuất của chúng.

Các vaccin có thể chứa các kháng nguyên từ một số tác nhân gây bệnh như PCV2, *Actinobacillus pleuropneumoniae*; Adenovirut; Alphavirut như virut viêm não tủy ngựa miền đông; *Balantidium coli*; *Bordetella bronchiseptica*; *Brachyspira* spp., tốt hơn là *B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli*, *B. innocens*, *Brucella suis*, tốt hơn là các biovar 1, 2 và 3; virut dịch tả lợn cổ điển, virut dịch tả 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* các typ A, B và C, *Cl. novyi*, *Cl. septicum*, *Cl. tetani*; coronavirut gây bệnh cắt và hô hấp; *Cryptosporidium parvum*; *Eimeria* spp; *Eperythrozoonis suis* thường được gọi là *Mycoplasma haemosuis*; *Erysipelothrix rhusiopathiae*; *Escherichia coli*; *Haemophilus parasuis*, tốt hơn là các typ phụ 1, 7 và 14; virut viêm não tủy ngưng kết hồng cầu; *Isospora suis*; virut 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 hyponeumoniae*; Parvovirut; *Pasteurella multocida*; virut cự bào ở lợn; parovirut ở lợn, virut gây hội chứng sinh sản và hô hấp ở lợn: virut Pseudorabies; Rotavirut; virut Sagiyama; *Salmonella* spp., tốt hơn là *S. typhimurium* và *S. choleraesuis*; *Staphylococcus* spp., tốt hơn là *S. hyicus*; *Streptococcus* spp., tốt hơn là *Streptococcus suis*;

virut cự bào ở lợn; virut ecpet ở lợn; virut cúm ở lợn; virut bệnh đậu lợn; *Toxoplasma gondii*; virut bệnh viêm miệng mụn nước và/hoặc virut bệnh chàm ở lợn.

Chế phẩm vaksin theo sáng chế có thể là chế phẩm lỏng như dung dịch hệ nước, nhũ tương nước trong dầu hoặc dầu trong nước, xi rô, cồn ngọt, cồn thuốc, chế phẩm để dùng ngoài đường cắt, dưới da, trong chân bì, trong cơ hoặc trong tĩnh mạch (ví dụ sử dụng bằng cách tiêm), như hỗn dịch hoặc nhũ tương vô khuẩn. Các chế phẩm như vậy là đã biết trong lĩnh vực này và thường được bào chế bằng cách hòa tan kháng nguyên và các chất phụ gia thông thường khác trong chất mang hoặc hệ dung môi thích hợp. Các chế phẩm lỏng cũng có thể bao gồm các hỗn dịch và nhũ tương chứa chất tạo hỗn dịch hoặc chất tạo nhũ tương.

Đường sử dụng có thể là sử dụng dưới da, qua niêm mạc, hoặc ngoài đường cắt (trong chân bì, trong cơ, dưới da, trong tĩnh mạch, hoặc trong màng bụng). Vaksin theo sáng chế có thể được sử dụng thuận tiện trong mũi, qua chân bì (nghĩa là đưa lên hoặc ở bề mặt da để hấp thu toàn thân), ngoài đường cắt, qua đường mắt, v.v.. Cách sử dụng ngoài đường cắt bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các đường trong cơ, trong tĩnh mạch, trong màng bụng và đường tương tự.

Vaksin theo sáng chế có thể được sử dụng dưới dạng các liều duy nhất hoặc các liều lặp lại. Vaksin theo sáng chế có thể được sử dụng một mình, hoặc có thể được sử dụng đồng thời hoặc được sử dụng lần lượt cùng với một hoặc nhiều chế phẩm khác, ví dụ, như các chế phẩm miễn dịch hoặc chế phẩm vaksin khác dùng cho lợn. Khi các chế phẩm này được sử dụng ở các thời điểm khác nhau, việc sử dụng có thể tách biệt với nhau hoặc gối lên nhau theo thời gian.

Sáng chế còn đề cập đến các phương pháp gây miễn dịch hoặc tạo ra đáp ứng miễn dịch ở động vật có vú không phải là người (ví dụ, lợn) bao gồm bước cho động vật có vú này sử dụng rSPV hoặc axit nucleic hoặc tế bào hoặc vaksin như được mô tả trên đây.

Các vaksin theo sáng chế tốt hơn là được sử dụng cho lợn, lợn trưởng thành, và cả lợn mới lớn, lợn con hoặc lợn nái đang mang thai. Việc tiêm chủng lợn nái đang mang thai là có lợi vì nó có thể tạo ra tính miễn dịch thụ động cho lợn con mới sinh qua việc truyền các kháng thể của mẹ. Lợn có thể nhỏ hơn 7, 6, 5, 4, 3, 2 hoặc 1 tuần tuổi; 1 đến 6 tuần tuổi; 2 đến 5 tuần tuổi; hoặc 3 đến 4 tuần tuổi. Mong muốn là, vaksin được sử dụng cho đối tượng chưa từng tiếp xúc với tác nhân gây bệnh.

Sáng chế cũng đề xuất đồ chứa chứa lượng có tác dụng miễn dịch của rSPV, axit nucleic, tế bào hoặc vaccin như được mô tả ở trên. Sáng chế cũng đề xuất bộ kit tiêm chủng bao gồm đồ chứa vô khuẩn tùy ý chứa lượng có tác dụng miễn dịch của vaccin, phương tiện để sử dụng vaccin cho động vật có vú, và tùy ý sách hướng dẫn sử dụng bao gồm các thông tin để sử dụng lượng có tác dụng miễn dịch của chế phẩm để điều trị và/hoặc phòng ngừa bệnh nhiễm.

Vaccin PCV2

Sáng chế đặc biệt thích hợp để điều trị (điều trị dự phòng) sự nhiễm PCV2 và các bệnh có liên quan.

Các vaccin PCV2 đã được phát triển gần đây như các vaccin Circovac® (Merial), Ingelvac®, CircoFLEX (Boehringer Ingelheim Vetmedica), hoặc Suvaxyn®, là các vaccin PCV2 bất hoạt hoặc vaccin tiểu đơn vị. Các vaccin tiểu đơn vị PCV2 thường sử dụng protein capsit của PCV2A tái tổ hợp, đã tinh chế được tạo ra bởi sự biểu hiện tái tổ hợp của gen ORF2 của PCV2A. Về vấn đề này, protein được mã hóa bởi ORF2 của các thể phân lập Imp1011 của PCV2 đã được báo cáo trong đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế châu Âu số EP1741785. Protein được mã hóa bởi ORF2 của thể phân lập PCV2Rm của PCV2 đã được báo cáo trong công bố đơn quốc tế số WO2010/061000. Protein được mã hóa bởi ORF2 của thể phân lập 412 của PCV2 đã được báo cáo trong đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế châu Âu số EP1816200. Một protein khác được mã hóa bởi ORF2 của thể phân lập PCV2 khác đã được báo cáo trong đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế châu Âu số EP1036180 hoặc EP2225367. Các protein loại ORF2 tổng hợp cải tiến đã 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 xác định ở trên, trong đó trình tự gen ngoại lai mã hóa kháng nguyên của PCV2, cụ thể hơn là protein, polypeptit hoặc peptit của PCV2. Theo một phương án được ưu tiên hơn, sáng chế đề cập đến rSPV như được xác định 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, ORF2 được chọn từ ORF2 của các thể phân lập Imp1011, PCV2Rm, hoặc 412 của PCV2, hoặc ORF2 có độ tương đồng trình tự ít nhất 80% với các protein này, hoặc mảnh gây miễn dịch của nó chứa ít nhất 10, 15, tốt hơn nữa là ít nhất 20 gốc axit amin liên tiếp của nó.

Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến rSPV chứa ít nhất hai trình tự gen ngoại lai, mỗi trình tự mã hóa một kháng nguyên của PCV2, cụ thể là protein hoặc peptit của ORF2, trong đó một trình tự gen ngoại lai nằm trong hệ gen của virus thay cho trình tự gen IL 18bp đã bị loại bỏ của virus, và một trình tự gen ngoại lai nằm ở hệ gen của virus thay cho trình tự gen TK hoặc ARP đã được loại bỏ của virus, và hơn nữa trong đó một trong số các trình tự gen ngoại lai cho phép biểu hiện kháng nguyên của PCV2 trong tế bào chất và trình tự khác trong số các trình tự gen ngoại lai này cho phép bộc lộ kháng nguyên của PCV2 trên màng tế bào.

Theo một phương án, rSPV chứa ít nhất hai trình tự gen ngoại lai, mỗi trình tự mã hóa một protein hoặc peptit của ORF2 từ các genotip khác nhau, tốt hơn là từ PCV2b và PCV2d.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến các phương pháp điều trị và/hoặc phòng ngừa bệnh đi kèm với PCV2 ở động vật có vú không phải là người, và đến các phương pháp gây miễn dịch hoặc tiêm chủng đối tượng động vật không phải là người, như lợn, lợn trưởng thành, lợn nái, lợn con, để phòng chống nhiễm PCV2, bao gồm việc cho đối tượng động vật này sử dụng rSPV, axit nucleic, tế bào, chế phẩm vacxin như được xác định ở trên.

Sự nhiễm PCV2 hoặc các bệnh có liên quan bao gồm, không kể những bệnh khác, hội chứng còi cọc sau khi cai sữa ở lợn con (PMWS: Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome), hội chứng viêm da và bệnh thận ở lợn (PDNS: Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome), phức hợp bệnh hô hấp ở lợn (PRDC: Porcine Respiratory Disease Complex), rối loạn sinh sản, bệnh viêm ruột u hạt, bệnh viêm loét da do tụ cầu khuẩn, bệnh viêm hạch bạch huyết hoại tử, và chứng run bầm sinh. Tốt hơn là, đối tượng động vật không phải là người, như lợn, được phòng ngừa tới mức trong đó một trong số tất cả các triệu chứng sinh lý có hại hoặc các tác động của việc nhiễm PCV2 được giảm đáng kể, được cải thiện hoặc hoàn toàn được ngăn chặn.

Theo một phương án, chế phẩm vacxin theo sáng chế được sử dụng cho lợn dễ mắc hoặc có nguy cơ nhiễm PCV2 để gia tăng khả năng đáp ứng miễn dịch của bản thân lợn.

Tốt hơn là, đối tượng là lợn cần tiêm chủng chống lại hội chứng còi cọc sau khi cai sữa ở lợn con (PMWS) và/hoặc hội chứng viêm da và bệnh thận ở lợn (PDNS).

Các khía cạnh và lợi ích khác của sáng chế sẽ được bộc lộ trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây nhằm minh họa sáng chế được bảo hộ.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Xây dựng các plasmit để tạo ra SPV tái tổ hợp

(1) Xây dựng pSP91 (Fig. 1)

ADN hệ gen của SPV được điều chế như sau:

Chủng kasza của SPV (VR-363) và tế bào thận phôi lợn, tế bào ESK-4 (CL-184) có thể mua được từ Tổ chức sưu tập giống chuẩn của Mỹ (ATCC). Các tế bào ESK-4 thường được nuôi cấy ở 37°C trong 5% CO₂ trong môi trường Ham's F-12K (Gibco, Cat. No.: 21127-022) được bổ sung 1% streptomycin-penicillin (Gibco, Cat. No.: 15140-122) và 5% FBS (Gibco, Cat. No.: 10437-028). Để điều chế ADN hệ gen của SPV, các tế bào ESK-4 nhập dòng trong bình có dung tích 225cm² được gây nhiễm bằng SPV và ủ trong 6 ngày cho tới khi các tế bào thể hiện tác dụng gây bệnh tế bào 100% (CPE: CytoPathic Effect). Sau đó, các tế bào đã được gây nhiễm được thu hồi bằng cách cạo các tế bào này vào trong môi trường và ly tâm ở 1300 vòng/phút (rpm: round per minute) trong 5 phút. Môi trường được lắng gạn và hạt tế bào được tái tạo huyền phù một cách nhẹ nhàng trong 2ml dung dịch nước muối đệm phosphat (PBS (Phosphate Buffer Saline): 1,5g Na₂HPO₄, 0,2g KH₂PO₄, 0,8g NaCl và 0,2g KCl cho mỗi lít H₂O) và được trải qua hai chu trình kết đông-xả đông liên tiếp. Sau đó, mảnh vỡ tế bào được loại bỏ bằng cách ly tâm ở 3000rpm trong 5 phút ở 4°C. Sau đó, virion của SPV có mặt trong phần nổi lên trên được tạo hạt bằng cách ly tâm ở 20000 xg trong 20 phút ở 4°C. Sau đó, hạt tạo ra được tạo huyền phù bằng Tris 10mM có độ pH=7,5. Sau đó, ADN hệ gen của SPV được chiết ra khỏi virion của SPV bằng cách tạo huyền phù bằng chất đệm phân giải (Tris 20mM, độ pH=9, NaCl 0,1M, EDTA 5mM, SDS 0,1%, proteinaza K 0,2mg/ml) và ủ ở 60°C trong 5 phút. Việc chiết bằng phenol:clorofom (1:1) được thực hiện hai lần, và mẫu được kết tủa bằng cách bổ sung hai thể tích etanol và ly tâm. Phần nổi lên trên được găng gạn, và hạt (ADN của SPV) được làm khô trong không khí và hydrat hóa lại trong Tris 10mM độ pH=7,5, EDTA 1mM ở 4°C.

Các vùng bổ sung của gen mã hóa protein gắn kết interleukin 18 (IL-18bp) trong hệ gen SPV được tách dòng bằng phương pháp phản ứng chuỗi polymeraza (PCR). Hai đoạn mồi (các oligonucleotit tổng hợp) SP6030F và SP9574R được thể hiện 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 đoạn mồi bao gồm SP6030F và SP9574R với ADN của SPV làm khuôn mẫu theo quy trình của nhà sản xuất.

SEQ ID NO: 1:

CGAATTCATTCCTTTATCTTTA

SEQ ID NO: 2:

GGAAC TACGTTATACGATCAT

ADN đã được khuếch đại gồm khoảng 3,5kbp được xác nhận bằng phép điện di gel agarosa 0,8%, và được tinh chế ra khỏi gel bằng cách sử dụng bộ kit chiết gel QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Mảnh ADN đã tinh chế được tách dòng vào trong vector pCR4-TOPO (Invitrogen) theo quy trình của nhà sản xuất. 12 thể biến nạp kháng ampicillin trắng thu được và được phát triển trong canh thang LB chứa 50 micro-g/ml ampicillin và mỗi plasmit được điều chế bằng bộ kit QuickLyse Miniprep Kit (Qiagen). Mỗi plasmit được cắt bằng *ScaI*, và hai loại plasmit cạnh tranh (cả hai hướng của ADN đã được chèn vào) được lựa chọn. Các ADN đã được chèn vào của chúng được xác định trình tự bằng chất phản ứng xác định trình tự DTCS (Dye Terminator Cycle Sequencing reagent) và thiết bị xác định trình tự CEQ2000XL (Beckman Coulter). Một trong số các plasmit cạnh tranh, pCR-SPV6030/9574 (#1), được xác nhận là nó chứa mảnh ADN từ 6030nt đến 9574nt của ADN của hệ gen SPV (GeneBank Acc: NC_003389) và được sử dụng làm plasmit cơ bản (Fig.1).

Tiếp đó, việc gây đột biến bằng phương pháp PCR được thực hiện để loại bỏ một phần của gen IL-18bp (nt31-382) và để đưa vào các vị trí enzym đa giới hạn bằng cách sử dụng pCR-SPV6030/9574 (#1) làm khuôn mẫu và sử dụng hai bộ đoạn mồi, (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 điện di trên gel agarosa 0,8% và tinh chế bằng cách sử dụng bộ kit chiết gel QIAquick Gel Extraction Kit. Mảnh ADN đã tinh chế, đã được khuếch đại bằng phương pháp PCR có sử dụng bộ đoạn môi SEQ ID NO: 3 và 4, được cắt bằng hai enzym giới hạn, *KpnI* và *HindIII*, và buộc bằng pBluescript KS(+) đã được cắt bằng các enzym giới hạn (Stratagene). Plasmid pBS-9L(*Kpn*..*Hin*) tạo ra (Fig. 1) được cắt bằng *SacI* và *PstI*, và cùng mảnh ADN đã được cắt bằng các enzym giới hạn được khuếch đại bằng phương pháp PCR có sử dụng bộ đoạn môi SEQ ID NO: 5 và 6, được chèn vào trong đó. Plasmid tạo ra được gọi là pSP90 (Fig.1).

Giữa các vị trí *EcoRI* và *HindIII* trong các vị trí enzym đa giới hạn của pSP90 được thay thế bằng phân tử gá lắp oligonucleotit được điều chế bằng cách ủ hai oligonucleotit ADN tổng hợp có SEQ ID NO: 7 và 8. Plasmid tạo ra được gọi là pSP91 (Fig.1).

SEQ ID NO: 7:

AATTGCCCCGGGTACCGTCGATCGACTTTTTATGGCCCCCCCCGGCCA

SEQ ID NO: 8:

AGCTTGGCCGGGGGGGCCATAAAAAGTCGATCGACGGTACCCGGGC

(2) Xây dựng pSP911-ORF2cc và pSP911-Ess_ORF2cc (Fig.2)

Trình tự giữa *KpnI* và *PstI* của pSP91 được thay thế bằng phân tử gá lắp tổng hợp được thể hiện trong SEQ ID NO: 9 để chèn gen khởi đầu 11-kD của virus vaccinia được báo cáo là gen khởi đầu sau mạnh (A.J. Davison and B. Moss. J. Mol. Biol. 210, 771-784, 1989) vào trong đó. Plasmid tạo ra được gọi là pSP911 (Fig.2).

SEQ ID NO: 9:

GGTACCGAGCTCGGTAGCCCGGGCCATGGTAGATCCTCTAGAGGATCCAATT
CATTTATAGCATAGAAAAAAACAAAATGAAATTCTACTATATTTTCTGCAG

Các trình trình tự gen ngoại lai mã hóa ORF2 của PCV2 được tổng hợp: Trình tự thứ nhất chứa ORF2 đã thay đổi bởi codon của PCV2 được điều chế (được gọi là ORF2cc (codon-changed ORF2)). Trình tự này cho phép biểu hiện trong tế bào chất. Một trình tự khác được điều chế chứa cùng một ORF2 đã thay đổi bởi codon của PCV2, nhưng được cải biến tiếp để chứa trình tự hướng tới màng tế bào (được gọi là Ess_ORF2cc). Trình tự này cho phép bộc lộ polypeptit đã mã hóa trên màng tế bào. Các trình tự của ORF2cc và Ess_ORF2cc đã tổng hợp lần lượt là SEQ ID NO:10 và 11.

SEQ ID NO: 10:

ATGACCTACCCTAGAAGAAGATATAGGAGGCGGAGGCATCGGCCACGGAGT
CACCTGGGACAAATTCTGCGGAGAAGGCCATGGTTGGTGCATCCAAGACATA
GATATAGGTGGAGGAGAAAGAACGGAATCTTTAATACAAGACTGTCTAGAA
CTTTTGGGTACACCGTGAAAAGAACAACCGTGAGGACCCCATCTTGGGCCGT
TGATATGATGAGGTTTAACATCAACGATTTCTTCCCTCCTGGGGGAGGATCTA
ATCCTAGATCCGTTCCATTTCGAGTATTATAGGATCAGGAAAGTGAAAGTGGA
GTTTTGGCCATGTAGCCCAATTACTCAAGGAGATAGAGGTGTTGGATCTAGC
GCCGTGATCCTGGACGACAATTCGTGACCAAAGCAACCGCACTGACTTACG
ATCCTTACGTGAATTATTCTAGCAGACACACTATTACTCAACCATTTAGCTAT
CACAGCAGATATTTCACTCCTAAGCCAGTGCTGGACAGCACCATCGACTATTT
TCAGCCTAATAATAAGAGGAATCAACTTTGGCTTAGGCTTCAGACCGCCGGG
AACGTGGATCACGTGGGATTGGGAACCGCATTGAGAATTCTATTTATGATC
AAGAGTATAACATTAGAGTGACTATGTACGTGCAGTTTAGGGAGTTCAACCT
GAAAGATCCACCTCTGAATCCATAA

SEQ ID NO: 11:

ATGAAAACGATTTCCGTTGTTACGTTGTTATGCGTACTACCTGCTGTTGTTTAT
TCAACATGTACTGTACCCACTATGAATAACGCTAAATTGACGTCTACCGAAA
CATCGTGGAAAAAAGAGAAAGGAGTCTTGAACACCAGATTGTCTAGAACCTT
CGGTTACACCATTAAGAGAACCACCGTCAAAACCCCATCTTGGGCTGTTCGAT
ATGATGAGATTCAACATCAACGATTTTCGTCCACCTGGTGGTGGATCAAACC
CTAGATCCGTTCCATTTCGAGTACTACAGAATCAGAAAAGTCAAAGTCGAGTT
CTGGCCATGCTCTCCTATTACTCAGGGTGATAGAGGAGTTGGATCAACTGCC
GTCATCTTGGATGACAACCTTCGTCACTAAGGCTACTGCCTTGACCTACGATCC
TTACGTCAATTACTCTAGTAGACACACCATCACCCAACCATTCTCATACCATT
CCAGATACTTCACTCCAAAACCTGTCTTGGACTCAACCATCGATTACTTTCAA
CCAAACAACAAGAGAAACCAATTGTGGTTGAGATTGCAAACCTGCCGGTAACG
TCGATCATGTCGGATTGGGAACCGCCTTCGAAAACCTCAAATACGACCAGGA
GTACAACATTAGAGTCACCATGTACGTCCAATTTCAGAGAGTTCAACTTGAAG
GACCCACCATTGAACCCATAA

Các gen tổng hợp này – ORF2cc và Ess_ORF2cc – có vị trí *Bam*HI hoặc *Sal*I liên hợp ở các đầu tận cùng 5' hoặc 3' được cắt bằng *Bam*HI và *Sal*I, và chèn vào pSP911 đã cắt bằng *Bam*HI and *Sal*I. Các plasmit tạo ra được gọi là pSP911-ORF2cc hoặc pSP911-

Ess_ORF2cc (Fig.2), và được sử dụng để tương ứng tạo ra mỗi virus bệnh đậu lợn tái tổ hợp SVR15 hoặc SVR14.

(3) Xây dựng pSP53-ORF2 (Fig. 3)

Gen mã hóa protein lặp ankirin (ARP) của SPV thu được từ plasmid pNZSP52L (JP2003-111591A). Phân tử gá lắp tổng hợp được thể hiện trong SEQ ID NO: 12 được thay vào vùng giữa *HindIII* và *EcoRI* của pNZSP52L, và plasmid tạo ra được gọi là pSP53.

Gen PCV2-ORF2 được sử dụng được thể hiện trong SEQ ID NO: 13. Gen này được tổng hợp, cắt bằng *BamHI* và *SalI*, và được chèn vào các vị trí *BamHI* và *SalI* của pSP53. Các plasmid tạo ra được gọi là pSP53-ORF2 (Fig. 3) và được sử dụng để tương ứng tạo ra hai virus bệnh đậu lợn tái tổ hợp SVR16 hoặc SVR17.

SEQ ID NO: 12:

AAGCTTGGCCGGGGGGGCCAGCTCGGTACATAAAAATGTCGACGGATCCGA
GTGCAATAAATTAGAATAGTTTTTCAATTTTACGCGTAATTAATTATTGTAT
TTATTATTTATATGCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCTTCATAAAAAGTCG
ATCGACGGTACCACCCGGGGATCGATCCAAAAAATCTTTCGGCCTGCATGA
ATGGCCTTGTTGATCGCTTATTATTATTTTGTACACCAGACCAACTGGTAATG
GTAGCGACCGGCGCTCAGCTGGAATTC

SEQ ID NO: 13:

GGATCCATGACGTATCCAAGGAGGCGTTACCGCAGAAGAAGACACCGCCCCC
GCAGCCATCTTGGCCAGATCCTCCGCGCCGCCCTGGCTCGTCCACCCCCGC
CACCGCTACCGTTGGAGAAGGAAAAATGGCATCTTCAACACCCGCCTCTCCC
GCACCTTCGGATATACTGTCAAGCGTACCACGGTCACAACGCCCTCCTGGGC
GGTGGACATGATGAGATTTAACTTGACGACTTTGTTCCCCCGGGAGGGGGG
ACCAACAAAATCTCTATAACCCTTTGAATACTACAGAATAAGAAAGGTTAAGG
TTGAATTCTGGCCCTGCTCCCCCATCACCCAGGGTGATAGGGGAGTGGGCTC
CACTGCTGTTATTCTAGATGATAACTTTGTACCAAAGGCACCAGCCCTAACCT
ATGACCCATATGTAACTACTCCTCCCGCCATACAATCCCCCAACCCTTCTCC
TACCACTCCCGTTACTTCACACCCAAACCTGTTCTTGACTCCACTATTGATTA
CTTCCAACCAAATAACAAAAGGAATCAGCTTTGGCTGAGGCTACAAACCTCT
AGAAATGTGGACCACGTAGGCCTCGGCACTGCGTTTCGAAAACAGTAAATACG
ACCAAGACTACAATATCCGTGTAACCATGTATGTACAATTCAGAGAATTTAA
TCTTAAAGACCCCCCACTTAACCCCTAAGTCGAC

(4) Xây dựng pSP72-ORF2 (Fig. 4)

Các vùng hai bên của gen mã hóa thymidin kinaza (TK) trong hệ gen SPV được tách dòng bằng phương pháp phản ứng chuỗi polymeraza (PCR). Hai đoạn môi (các oligonucleotit tổng hợp) SP54242F và SP57617R được thể hiện trong SEQ ID NO: 14 và 15 được mua từ Takara Bio. Phản ứng PCR được thực hiện bằng cách sử dụng LA Taq polymeraza (Takara Bio) và bộ đoạn môi bao gồm SP54242F và SP57617R với ADN của SPV làm khuôn mẫu theo quy trình của nhà sản xuất.

SEQ ID NO: 14:

AATATTACGGGTGCTGTTT

SEQ ID NO: 15:

AAAAACATCGTATTCCTG

ADN đã được khuếch đại gồm khoảng 3,4kbp được xác nhận bằng phép điện di gel agarosa 0,8%, và được tinh chế ra khỏi gel bằng cách sử dụng bộ kit chiết gel QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Mảnh ADN đã tinh chế được tách dòng vào trong vector pCR4-TOPO (Invitrogen) theo quy trình của nhà sản xuất. 14 thể biến nạp kháng ampicillin trắng thu được và được phát triển trong canh thang LB và mỗi plasmit được điều chế bằng bộ kit QuickLyse Miniprep Kit (Qiagen). Mỗi plasmit được cắt bằng *SpeI*, và hai loại plasmit cạnh tranh (cả hai hướng của ADN đã được chèn vào) được lựa chọn. Các ADN đã được chèn vào của chúng được xác định trình tự bằng chất phản ứng xác định trình tự DTCS (Dye Terminator Cycle Sequencing reagent) và thiết bị xác định trình tự CEQ2000XL (Beckman Coulter). Một trong số các plasmit cạnh tranh, pCR-SPV54242/57617 (#2), được xác nhận là nó chứa mảnh ADN từ 54242nt đến 57617nt của ADN hệ gen của SPV (GeneBank Acc: NC_003389) và được sử dụng làm plasmit cơ bản (Fig. 4).

Tiếp đó, việc gây đột biến bằng phương pháp PCR được thực hiện để loại bỏ một phần của gen TK (nt59-536) và để đưa vào các vị trí enzym đa giới hạn bằng cách sử dụng pCR-SPV54242/57617 (#2) làm khuôn mẫu và sử dụng hai bộ đoạn môi, (1) SEQ ID NO: 16 và 17 hoặc (2) SEQ ID NO: 18 và 19.

SEQ ID NO: 16:

CGTTCATGTAAAGCTTAACCTGAAATATTG

SEQ ID NO: 17:

GTTTAAACGAATTCGGTACCCTTAAAAACATCG

SEQ ID NO: 18:

CGCCGAGCTCGAGAATATTACGGGTGCTGTTTTTAC

SEQ ID NO: 19:

CCAGACTGCAGAGAACATAGGTCCTAATATAAG

Mỗi sản phẩm PCR được điện di trên gel agarosa 0,8% và tinh chế bằng cách sử dụng bộ kit chiết gel QIAquick Gel Extraction Kit. Mảnh ADN đã tinh chế, đã khuếch đại bằng phương pháp PCR có sử dụng bộ đoạn mồi SEQ ID NO: 16 và 17, được cắt bằng hai enzym giới hạn *KpnI* và *HindIII*, và buộc bằng cùng một plasmit pBluescript KS(+) đã được cắt bằng các enzym giới hạn (Stratagene). Plasmit pBS-TKR(*Kpn*..*Hin*) tạo ra (Fig. 4) được cắt bằng *SacI* và *PstI*, và cùng một mảnh ADN đã được cắt bằng các enzym giới hạn khuếch đại bằng phương pháp PCR có sử dụng bộ đoạn mồi SEQ ID NO: 18 và 19, được chèn vào trong đó. Plasmit tạo ra được gọi là pSP70 (Fig. 4).

Phân tử gá lắp tổng hợp được thể hiện trong SEQ ID NO: 12 được thay vào vùng giữa *HindIII* và *EcoRI* của pSP70, và plasmit tạo ra được gọi là pSP711. Mảnh DNA của caset gen ‘gen khởi đầu P7.5 –LacZ’ được dẫn xuất từ pNZ76, đã được cắt bằng *HindIII* và *SmaI* của pNZ76 và tiếp theo cắt cùn bằng ADN polymeraza (được mô tả trong đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế Mỹ số USP5,387,519) được buộc vào vị trí *SmaI* của pSP711. Plasmit tạo ra được gọi là pSP721 (Fig. 4), và caset gen ‘P7.5-LacZ’ được chèn vào gen TK. Gen PCV2-ORF2 tổng hợp được thể hiện trong SEQ ID NO: 13 được cắt bằng *BamHI* và *SalI*, và được chèn vào vị trí *BamHI* và *SalI* của pSP721, và plasmit tạo ra được gọi là pSP72-ORF2 (Fig. 4). Plasmit này được sử dụng làm plasmit tương đồng để tạo ra SPV tái tổ hợp là SVR20.

Ví dụ 2

Bào chế virus bệnh đậu lợn tái tổ hợp (rSPV)

(1) Bào chế rSPV SVR14 và SVR15 (Fig. 5)

SPV tái tổ hợp được tạo ra trong các tế bào ESK-4 bằng cách tái tổ hợp tương đồng giữa hệ gen SPV kiểu dại và các vector plasmit tương đồng. Các tế bào ESK-4 dưới nhập dòng trong đĩa 6 lỗ được gây nhiễm bằng SPV kiểu dại (wtSPV), và 17 giờ sau khi các tế bào đã nhiễm wtSPV được chuyển nhiễm bằng 2µg pSP911-Ess_ORF2cc hoặc pSP911-ORF2cc bằng cách sử dụng chất phản ứng Lipofectamin Plus (Invitrogen) và để ủ ở 37°C trong 5 ngày cho tới khi xuất hiện tác dụng gây độc tế bào (CPE). Dịch tan tế bào từ các tế bào đã gây nhiễm-chuyển nhiễm tương ứng là giống chuyển nhiễm (TFS:

TransFection Seed) đối với SVR14 và TFS đối với SVR15. Chúng được pha loãng với tỷ lệ 1:20 bằng môi trường Ham's F-12K không chứa FBS, và được gây nhiễm vào trong tế bào ESK-4 trong các đĩa 96 lỗ. Bảy ngày sau, mỗi phần nổi lên trên trong các đĩa 96 lỗ được chuyển vào các đĩa 96 lỗ trống mới, và các tế bào đã được gây nhiễm được phân giải bằng chất đệm phân giải (Tris-Cl 20mM, NaCl 0,1M, EDTA 5mM, SDS 0,1%, proteinase K 200µg/ml), tiếp theo xử lý nhiệt (60°C, 5 phút, và 98°C, 2 phút). Các mẫu ADN đã được phân giải bằng tế bào đã gây nhiễm được sàng lọc bằng qPCR bằng cách sử dụng chất phản ứng SYBR-Green (Bio-Rad Catalog #: 170-8882) với bộ đoạn mồi SEQ ID NO: 20 và SEQ ID NO: 21.

SEQ ID NO: 20

AAGTGGAGTTTTGGCCATGT

SEQ ID NO: 21

TCCAGCACTGGCTTAGGAGT

Các mẫu thể hiện tín hiệu khuếch đại ADN bằng qPCR là dương tính và các phần nổi lên trên tương ứng được đưa đến bước sàng lọc tiếp theo. Bước sàng lọc được lặp lại cho tới khi toàn bộ các mảnh đã xuất hiện được nhuộm màu bằng thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang (IFA: ImmunoFluorescence Assay) có sử dụng huyết thanh lợn kháng PCV2 (PAB-PCV2, VMR) làm kháng thể thứ nhất và IgG kháng lợn liên hợp với FITC (F1638-2ML, SIGMA) làm kháng thể thứ hai.

Hai virus tái tổ hợp không chứa wtSPV (các dòng vô tính G2C2C4 và D10E5F5) được tinh chế từ TFS đối với SVR14 và đối với SVR15 qua ba vòng sàng lọc và tương ứng được gọi là SVR14 and SVR15.

(2) Bào chế rSPV SVR16 và SVR17 (Fig. 5)

SPV tái tổ hợp SVR16 được tạo ra bằng cách tái tổ hợp tương đồng giữa SPV tái tổ hợp, hệ gen SVR15 và vector plasmit tương đồng pSP53-ORF2. Và SVR17 được tạo ra bằng cách tái tổ hợp tương đồng giữa hệ gen SVR14 và vector tương đồng pSP53-ORF2. Các tế bào ESK-4 dưới nhập dòng trong đĩa 6 lỗ được gây nhiễm bằng SVR15 hoặc SVR14, và 17 giờ sau các tế bào đã được gây nhiễm bằng rSPV được truyền nhiễm bằng 2µg pSP53-ORF2 bằng cách sử dụng chất phản ứng Lipofectamine Plus. Sau khi CPE xuất hiện, các dịch tan tế bào (TFS đối với SVR16 và đối với SVR17) từ các tế bào đã gây nhiễm và chuyển nhiễm được sàng lọc đối với các vết tái tổ hợp biểu hiện β -galactosidaza bằng cách bổ sung 0,5mg/ml Bluo-gal (Invitrogen Cat. No.: 15519-028) trong lớp phủ

agaroza dinh dưỡng. Các virus tái tổ hợp đã tinh chế được cho đi qua 3-4 vòng sàng lọc cho tới khi tất cả các vết dương tính với β -galactosidaza, và tương ứng được gọi là SVR16 and SVR17.

(3) Bào chế rSPV, SVR20 (Fig. 5)

SPV, SVR20 tái tổ hợp được tạo ra bằng cách tái tổ hợp tương đồng giữa SPV tái tổ hợp, hệ gen SVR14 và vector plasmit tương đồng pSP72-ORF2. Các tế bào ESK-4 dưới nhập dòng trong đĩa 6 lỗ được gây nhiễm bằng SVR 14, và 17 giờ sau các tế bào đã được gây nhiễm bằng SVR14 được chuyển nhiễm bằng 2 μ g pSP72-ORF2 bằng cách sử dụng chất phản ứng Lipofectamine Plus. Sau khi CPE xuất hiện, các dịch tan tế bào (TFS đối với SVR20) từ các tế bào đã gây nhiễm và chuyển nhiễm được sàng lọc đối với các vết tái tổ hợp biểu hiện β -galactosidaza bằng cách bổ sung 0,5mg/ml Bluo-gal (Invitrogen Cat. No.: 15519-028) trong lớp phủ agaroza dinh dưỡng. Các virus tái tổ hợp đã tinh chế được cho đi qua 3-4 vòng sàng lọc cho tới khi tất cả các vết dương tính với β -galactosidaza, và tương ứng được gọi là SVR20.

Ví dụ 3

Phân tích SPV tái tổ hợp in vitro

(1) Xác nhận các cấu trúc hệ gen và độ ổn định sau các lần cấy chuyển của SVR14 và SVR15 bằng phương pháp PCR

Để xác nhận các cấu trúc hệ gen của SVR14 và SVR15 đã được tinh chế, ADN hệ gen của chúng được điều chế cũng như các quy trình được mô tả trong ví dụ 1 (1) và được sử dụng dưới dạng các khuôn mẫu không cấy chuyển (+0p) đối với phương pháp PCR. Và để xác nhận độ ổn định hệ gen của SVR14 và SVR15, chúng được cho đi 15 lần qua các tế bào ESK-4 (+15p) và được bào chế như đối với +0p. Các ADN hệ gen được kiểm tra bằng phương pháp PCR có sử dụng bộ đoạn mồi gồm SP7450F và SP8552R được thể hiện trong SEQ ID NO: 22 và 23 (Fig. 6).

SEQ ID NO: 22

CAATTGAAACATCTATATATCCTT

SEQ ID NO: 23

CAATGTGAAGCGATAAAATACAG

Các kết quả của phương pháp PCR (Fig. 6) cho thấy rằng SVR14 và SVR15 đã tinh chế có cấu trúc hệ gen mong muốn và không chứa SPV kiểu dại, và chúng ổn định sau

15 lần cấy chuyển *in vitro*.

(2) Xác nhận protein PCV2-ORF2 được biểu hiện bởi SVR14 và SVR15

Kích thước phân tử của các protein PCV2-ORF2 được biểu hiện bởi SVR14 và SVR15 được phân tích bằng phương pháp SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate–PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) 15% và phép phân tích thấm tách Western có sử dụng huyết thanh chuột kháng PCV2. Các tế bào ESK-4 được gây nhiễm bằng SVR14, SVR15 hoặc SPV kiểu dại. Sáu ngày sau, các dịch tan tế bào được phân đoạn dựa vào phương pháp SDS-PAGE 15%. Các protein được chuyển lên trên màng polyvinyliden diflorua (PVDF), Immobilon-P (Merk Millipore, Cat. No.: IPVH08130), và chặn bằng 0,5% sữa khô trong PBS. Các vết màng PDVF được dò bằng huyết thanh kháng PCV2 của chuột (1:1000) dưới dạng kháng thể thứ nhất, tiếp theo phản ứng với kháng thể thứ hai là IgG kháng chuột của dê liên hợp với biotin (1:1000), và bộ kit VECTASTAIN ABC-AP Standard Kit (Vector Labs, AK-5000). Các vết màng được phát triển bằng chất nền phosphatasa kiềm, nitroblue tetrazoli (NBT)/5-bromo-4-clo-3-indolyl phosphat (BCIP).

Các kết quả của phép thấm tách Western cho thấy rằng SVR14 biểu hiện hai loại ORF2 có kích thước phân tử bằng 27kDa và 25kDa (Fig. 7). Protein 27kDa trước được cho là dạng tiền chất, và protein sau được cho là dạng đã được xử lý sau khi tách ở đầu peptit tín hiệu. Mặt khác, SVR15 chỉ biểu hiện protein 27kDa có mặt trong nhân tế bào đã gây nhiễm (Fig. 7).

(3) Xác nhận các cấu trúc hệ gen của các thể tái tổ hợp kép SVR16 và SVR17

Để xác nhận các cấu trúc hệ gen của SVR16 và SVR17 đã được tinh chế, ADN hệ gen của chúng được điều chế cũng như các quy trình được mô tả trong ví dụ 1 (1) và được sử dụng làm các khuôn mẫu không cấy chuyển (+0p) đối với phương pháp PCR. Và để xác nhận độ ổn định hệ gen của SVR16 và SVR17, chúng được cho đi qua các tế bào ESK-4 15 lần (+15p) và được bào chế cũng như +0p. Các ADN hệ gen được kiểm tra bằng phương pháp PCR có sử dụng bộ đoạn mồi P05-8 and P05-9 được thể hiện trong SEQ ID NO: 24 và 25 (Fig. 8).

SEQ ID NO: 24

TATGTCTAAAGGTGCGTCTA

SEQ ID NO: 25

AGTGGCTATATTATCATCCTG

Các kết quả của phương pháp PCR (Fig. 8) cho thấy rằng SVR16 và SVR17 đã được tinh chế có cấu trúc hệ gen mong muốn và rằng chúng ổn định sau 15 lần cấy chuyển *in vitro*.

(4) Xác nhận các cấu trúc hệ gen của thể tái tổ hợp kép SVR20

Để xác nhận các cấu trúc hệ gen của SVR20 đã được tinh chế, ADN hệ gen của nó được điều chế theo các quy trình được mô tả trong ví dụ 1 (1) và được sử dụng làm các khuôn mẫu không cấy chuyển (+0p) đối với phương pháp PCR. Để xác nhận độ ổn định hệ gen của SVR20, nó được cho đi qua các tế bào ESK-4 15 lần (+15p) và được bào chế như đối với +0p. Các ADN hệ gen này được kiểm tra bằng phương pháp PCR có sử dụng các bộ đoạn mồi (a) SP7450F and SP8552R được thể hiện trong SEQ ID NO: 22 và 23 đối với vị trí IL 18bp, and (b) SP55500F và SP56363R được thể hiện trong SEQ ID NO: 26 và 27 đối với vị trí TK (Fig. 9).

SEQ ID NO: 26

ATACGATTAAGCGATAGTGATA

SEQ ID NO: 27

ATATTATTTTCATTTGTTTCCTA

Các kết quả của phương pháp PCR (Fig. 9) cho thấy rằng SVR20 đã được tinh chế có cấu trúc hệ gen mong muốn và rằng nó ổn định sau 15 lần cấy chuyển *in vitro*.

(5) Xác nhận protein của PCV2-ORF2 được biểu hiện bởi SVR16, SVR17 và SVR20

Các protein PCV2-ORF2 được biểu hiện bởi SPV tái tổ hợp được phân tích bằng phương pháp thẩm tách Western. Các tế bào ESK-4 trong các đĩa 6 lỗ được gây nhiễm bằng SPV kiểu đại, SVR14, SVR15, SVR16, SVR17, hoặc SVR20 ở độ bội nhiễm (M.O.I.) bằng 0,1. Sáu ngày sau, các dịch tan tế bào được áp dụng phương pháp SDS-PAGE 15% và thẩm tách lên màng PVDF. Sau khi thẩm tách bằng sữa khô 0,5% trong PBS, các vết màng PDVF được dò bằng huyết thanh kháng PCV2 của chuột (1:500) làm kháng thể thứ nhất, tiếp theo phản ứng với kháng thể thứ hai là IgG kháng chuột của dê liên hợp với biotin (1:1000), và bộ kit VECTASTAIN ABC-AP Standard Kit (Vector Labs, AK-5000). Các vết màng được phát triển bằng cơ chất phosphatase kiềm, nitroblue tetrazoli (NBT)/5-bromo-4-clo-3-indolyl phosphat (BCIP).

Ngạc nhiên là, các kết quả của phương pháp thẩm tách Western (Fig. 10) cho thấy rằng các virus khiếm khuyết kép theo sáng chế biểu hiện gen ngoại lai hiệu quả hơn so với các virus đơn khiếm khuyết. SVR16 biểu hiện protein 25kDa nhiều hơn SVR15, và

SVR17 và SVR20 biểu hiện hai loại protein ORF2 (protein tiền chất 27kDa và protein đã xử lý 25kDa) nhiều hơn SVR14.

Ví dụ 4

Thử nghiệm về độ an toàn của rSPV trên lợn

Gây miễn dịch ở lợn

12 con lợn SPF (lợn ZEN-NOH premium) được mua từ Liên đoàn các hiệp hội hợp tác nông nghiệp quốc gia (National Federation of Agricultural Co-operative Associations, Chiba, Japan) và được chia thành 4 nhóm (N=3 mỗi nhóm). Mỗi lợn trong nhóm từ 1 đến 4 được gây miễn dịch vào bên phải cổ bằng cách sử dụng kim tiêm 23G 1,5 inxơ (3,8cm) với 1ml SVR16, SVR17, SVR20, hoặc SPV kiểu đại (wtSPV) ở TCID₅₀/ml tương ứng ở thời điểm 4 tuần tuổi.

(2) Quan sát lợn được gây miễn dịch

Vị trí tiêm chủng được quan sát trong các ngày từ ngày 1 sau khi tiêm chủng (1-DPV (Day Post Vaccination)) đến ngày 18 sau khi tiêm chủng (18-DPV). Trong quá trình thử nghiệm, mọi con lợn đều khỏe mạnh và không thể hiện các ca lâm sàng như triệu chứng tiêu chảy hoặc hô hấp ngoại trừ các phản ứng trên da ở vị trí tiêm được chủng bằng SVR16, SVR17 hoặc wtSPV. Kích thước của vết đỏ do phản ứng viêm da được xác định định lượng dưới dạng diện tích [chiều rộng (mm) x chiều dài (mm)= mm²]. Chiều rộng (W) là trục X là hướng trục dài hơn của vết đỏ. Chiều dài (D) là trục Y là hướng trục ngắn hơn của vết đỏ. Kích thước của vết đỏ của lợn được gây miễn dịch được tổng hợp trong bảng 1 và được vẽ đồ thị trên Fig. 11.

Bảng 1. Kích thước vết đỏ (mm²) ở lợn thuộc các nhóm từ 1 đến 4.

Nhóm (Vaccin)	Số thẻ của lợn	Kích thước vết đỏ (mm ²) vào ngày sau khi tiêm chủng (DPV)																	
		1DPV	2DPV	3DPV	4DPV	5DPV	6DPV	7DPV	8DPV	9DPV	10DPV	11DPV	12DPV	13DPV	14DPV	15DPV	16DPV	17DPV	18DPV
Nhóm 1 (SVR16)	Số 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Số 5	0	0	0	0	0	0	9,1	15,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Số 6	0	0	0	0	0	0	7,0	23,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nhóm 2 (SVR17)	Số 7	0	0	0	0	0	0	33,2	38,3	23,7	8,2	6,7	4,1	7,8	9,8	0	0	0	0
	Số 8	0	0	0	0	0	0	10,3	26,0	14,7	6,3	4,4	2,4	3,3	4,5	0	0	0	0
	Số 9	0	0	0	0	0	0	16,5	24,7	12,8	9,6	5,7	4,2	5,6	5,7	0	0	0	0
Nhóm 3 (SVR20)	Số 10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Số 11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Số 12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nhóm 4 (wtSPV)	Số 13	0	0	0	0	0	0	17,5	23,3	18,7	11,6	10,1	7,4	14,6	17,5	12,7	8,7	7,4	5,4
	Số 14	0	0	0	0	0	0	28,7	40,4	35,7	15,7	13,7	10,4	8,5	9,1	10,5	1,3	1,8	2,0
	Số 15	0	0	0	0	0	0	26,0	79,0	32,2	21,5	17,3	13,8	15,2	18,0	13,6	9,9	4,7	4,3

Các diện tích có màu đỏ lớn nhất là ở lợn được tiêm chủng bằng SPV kiểu đại. Không quan sát thấy vết đỏ ở vị trí tiêm trên lợn được gây miễn dịch bằng SVR20. Các kết quả cho thấy rằng các thể tái tổ hợp khuyết đoạn kép của gen IL 18bp và TK an toàn hơn nhiều so với SPV kiểu đại. Cụ thể, SVR20 được suy giảm độc lực.

Ví dụ 5

Thử nghiệm thứ hai trên lợn về tính sinh miễn dịch và độ an toàn của rSPV

(1) Gây miễn dịch

30 con lợn SPF (lợn ZEN-NOH premium) được mua từ Liên đoàn các hiệp hội hợp tác nông nghiệp quốc gia (National Federation of Agricultural Co-operative Associations, Chiba, Japan) và được chia thành 6 nhóm (N=5 mỗi nhóm).

Các con lợn thuộc nhóm 3 được gây miễn dịch trong cơ vào phía phải của cổ bằng 1ml SVR20 10^5 TCID₅₀/ml ở thời điểm 4 tuần tuổi. Các con lợn thuộc nhóm 4 được gây miễn dịch trong cơ vào phía phải của cổ bằng 1ml vacxin PCV2 thương mại Ingelvac CircoFLEX (Boehringer Ingelheim Vetmedica). Các con lợn thuộc nhóm 5 và 6 không được gây miễn dịch. Tất cả các con lợn được tiêm chủng bằng SVR20 trông đều mạnh khỏe.

(2) Thử thách PCV2 ở lợn

Sau 3 tuần sau khi tiêm chủng, lợn thuộc các nhóm 1 đến 5 được thử thách bằng cách phun 6 x chủng PCV2b Rm40 10^5 TCID₅₀ (nhập khẩu từ Ceva-Phylaxia, Hungary) vào mũi bên phải. Lợn thuộc nhóm 6 là nhóm đối chứng không được gây miễn dịch và không được thử thách.

(3) Lượng tải PCV2 ở các cơ quan bạch huyết

Sau 3 tuần sau khi thử thách (10 tuần tuổi), toàn bộ lợn được gây chết nhẹ nhàng và giải phẫu. Các phần cắt của bốn hạch bạch huyết, hạch bạch huyết bẹn (ILN: Inguinal Lymph Node), hạch bạch huyết rốn (HLN: Hilar Lymph Node), amidan và hạch bạch huyết màng treo ruột (MLN: Mesenteric Lymph Node), được lấy ra bằng cách sử dụng các kéo và kẹp sạch, riêng rẽ. Các phần cắt của chúng được cho vào trong các ống nghiệm Eppendorf dung tích 50ml vô khuẩn và giữ ở -80°C cho tới quá trình xử lý tiếp theo.

ADN từ các mẫu cơ quan được chiết bằng bộ kit QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. ADN của PCV2 được xác định số lượng bằng cách sử dụng phương pháp PCR thời gian thực trên cơ sở TaqMan được mô tả trong J. Virol. Methods, 2004.12.15; 122 (2): 171-178 (PMID: 15542141).

Tỷ lệ lợn dương tính với PCV2 ($> 1 \times 10^3$ bản sao/mg-cơ quan) được tổng hợp trong bảng 2.

Bảng 2. Tỷ lệ lợn dương tính với PCV2 ở 4 cơ quan bạch huyết sau 3 tuần sau khi thử thách.

Nhóm		Số lợn dương tính với PCV2/tổng số (%)			
#	Tiêm chủng/thử thách	HLN	ILN	Amidan	MLN
G3	SVR20	1/5 (20)	0/5 (0)	1/5 (20)	0/5 (0)
G4	CircoFlex/Ch	4/5 (80)	1/5 (20)	3/5 (60)	1/5 (20)
G5	NI/Ch	5/5 (100)	5/5 (100)	5/5 (100)	4/5 (80)
G6	NI/N-Ch	0/5 (0)	0/5 (0)	0/5 (0)	0/5 (0)

Việc tiêm chủng bằng các virus khiếm khuyết kép theo sáng chế là rất hữu hiệu để ức chế lượng tải PCV2 ở các hạch bạch huyết. Cụ thể, về lượng tải PCV2 ở HLN, toàn bộ lợn thuộc nhóm G5 (không được tiêm chủng) là dương tính với PCV2 (100%), trong lúc đó chỉ có 1 con lợn thuộc nhóm G3 (được tiêm chủng bằng SVR20) là dương tính (20%). Đáng chú ý là, lượng tải virus ở lợn thuộc nhóm G4 được tiêm chủng bằng vaccine kháng PCV2 thương mại, là cao hơn nhiều (80% lợn dương tính). Về lượng tải PCV2 ở ILN, toàn bộ lợn thuộc nhóm G5 (không được tiêm chủng) là dương tính với PCV2 (100%), trong lúc toàn bộ lợn thuộc nhóm G3 (được tiêm chủng bằng SVR20) là âm tính (0%). Đáng chú ý là, lượng tải virus ở lợn thuộc nhóm G4 được tiêm chủng bằng vaccine kháng PCV2 thương mại, là cao hơn (20% lợn dương tính). Về lượng tải PCV2 ở amidan, toàn bộ lợn thuộc nhóm G5 (không được tiêm chủng) là dương tính với PCV2 (100%), trong lúc đó chỉ có 1 con lợn thuộc nhóm G3 (được tiêm chủng bằng SVR20) là dương tính (20%). Hơn nữa, lượng tải virus ở lợn thuộc nhóm G4 được tiêm chủng bằng vaccine kháng PCV2 thương mại, là cao hơn nhiều (60% lợn dương tính). Về lượng tải PCV2 ở MLN, hầu hết lợn thuộc nhóm G5 (không được tiêm chủng) là dương tính với PCV2 (80%), trong lúc toàn bộ lợn thuộc nhóm G3 (được tiêm chủng bằng SVR20) là âm tính (0%). Lượng tải virus ở lợn thuộc nhóm G4 được tiêm chủng bằng vaccine kháng PCV2 thương mại, là cao hơn (20% lợn dương tính).

Các kết quả này cho thấy rằng việc tiêm chủng bằng SVR20 tạo ra sự bảo vệ mạnh hơn nhiều so với vaccine thương mại.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Virut bệnh đậu lợn tái tổ hợp (rSPV: recombinant SwinePox Virus) có ít nhất một gen virut khiếm khuyết thứ nhất và một gen virut khiếm khuyết thứ hai, trong đó gen virut khiếm khuyết thứ nhất là gen IL18bp và gen virut khiếm khuyết thứ hai là gen thymidin kinaza (TK: Thymidine Kinase) hoặc protein lặp ankirin (ARP: Ankirin Repeat Protein), trong đó các gen virut này khiếm khuyết do khuyết đoạn.
2. rSPV theo điểm 1, trong đó rSPV này chứa khuyết đoạn gồm ít nhất 50bp trong trình tự gen TK và khuyết đoạn gồm ít nhất 50bp trong trình tự gen IL18bp.
3. rSPV theo điểm 1, chứa khuyết đoạn gồm ít nhất 100bp trong trình tự gen TK và khuyết đoạn gồm ít nhất 100bp trong trình tự gen IL18bp.
4. rSPV theo điểm 1, trong đó rSPV này chứa khuyết đoạn gồm ít nhất 50bp trong trình tự gen ARP và khuyết đoạn gồm ít nhất 50bp trong trình tự gen IL18bp.
5. rSPV theo điểm 1, còn bao gồm trình tự gen ngoại lai thứ nhất, được định vị thay cho trình tự gen TK, ARP hoặc IL18bp virut khiếm khuyết.
6. rSPV theo điểm 2, trong đó hệ gen của rSPV này chứa khuyết đoạn gồm ít nhất 100bp trong trình tự gen TK và trong đó trình tự gen ngoại lai thứ nhất được định vị trong khuyết đoạn này.
7. rSPV theo điểm 3, trong đó rSPV này chứa trình tự gen ngoại lai thứ nhất được định vị thay cho trình tự gen TK virut đã bị xóa, và trình tự gen ngoại lai thứ hai được định vị thay cho trình tự gen IL18bp virut đã bị xóa.
8. rSPV theo điểm 4, trong đó rSPV này chứa trình tự gen ngoại lai thứ nhất được định vị thay cho trình tự gen ARP virut đã bị xóa, và trình tự gen ngoại lai thứ hai được định vị thay cho trình tự gen IL18bp virut đã bị xóa.
9. rSPV theo điểm 7, trong đó các trình tự gen ngoại lai thứ nhất và/hoặc thứ hai mã hóa kháng nguyên.
10. rSPV theo điểm 9, trong đó các trình tự gen ngoại lai thứ nhất và/hoặc thứ hai mã hóa kháng nguyên của PCV2, kháng nguyên capsit của PCV2, hoặc protein hoặc peptit ORF2 của PCV2 .
11. rSPV theo điểm 9, trong đó mỗi trong số trình tự gen ngoại lai thứ nhất và/hoặc thứ hai chứa gen khởi đầu phiên mã.

12. rSPV theo điểm 11, trong đó mỗi gen khởi đầu được chọn từ nhóm bao gồm gen khởi đầu 7,5-kD của virus vaccinia (P7.5k), gen khởi đầu 11-kD của virus vaccinia (P11k), gen khởi đầu 28-kD của virus vaccinia (P28k), gen khởi đầu poxvirus tổng hợp nhân tạo (Ps), gen khởi đầu beta-actin (Bac) của gà, gen khởi đầu Pec, gen khởi đầu tiền-sóm (ie)1 của virus cự bào loài gặm nhấm (Mcmv: Murine cytomegalovirus), gen khởi đầu của virus cự bào ở người (Hcmv: Human cytomegalovirus), gen khởi đầu (SV)40 của virus ở khỉ, hoặc gen khởi đầu của virus sarcoma Raus (RSV: Raus Sarcoma virus).

13. rSPV theo điểm 1, trong đó rSPV này chứa trình tự axit nucleic thứ nhất mã hóa kháng nguyên của PCV2 được chèn vào thay cho trình tự gen TK đã bị xóa của hệ gen của rSPV, và trình tự axit nucleic thứ hai mã hóa kháng nguyên của PCV2 được chèn vào thay cho trình tự gen IL18bp đã bị xóa của hệ gen của rSPV.

14. Virus bệnh đậu lợn tái tổ hợp (rSPV) có gen IL18bp virus khiếm khuyết, trong đó gen virus này khiếm khuyết do khuyết đoạn.

15. Phân tử axit nucleic chứa hệ gen của rSPV theo điểm 1.

16. Tế bào chủ được phân lập chứa rSPV theo điểm 1.

17. Phương pháp bào chế rSPV, bao gồm bước gây nhiễm tế bào khả biến bằng phân tử axit nucleic theo điểm 15 và thu hồi rSPV.

18. Chế phẩm chứa rSPV theo điểm 1 và tá dược.

19. Chế phẩm theo điểm 18, trong đó chế phẩm này là vaccin.

20. Bộ kit tiêm chủng để gây miễn dịch cho lợn, trong đó bộ kit này bao gồm các thành phần sau:

a. lượng hữu hiệu của vaccin theo điểm 19, và

b. phương tiện để sử dụng vaccin này cho lợn nêu trên.

21. Tế bào chủ được phân lập chứa axit nucleic theo điểm 15.

DANH SÁCH TRÌNH TỰ

<110> CEVA SANTE ANIMALE

<120> VIRUT BỆNH ĐẦU LỢN TÁI TỔ HỢP ĐA GIÁ, PHƯƠNG PHÁP BẢO CHẾ VIRUT NÀY VÀ CHẾ PHẨM CHỨA VIRUT NÀY

<130> B2263

<160> 27

<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 tatac gatca t

21

<210> 3

<211> 38

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> oligonucleotit

<400> 3

ttcgccctta cggtaaccatt 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 gggtc 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
 aattgcccgg gtaccgtcga tcgacttttt atggcccccc cggcca 46
 <210> 8
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> oligonucleotit
 <400> 8
 agcttgcccg ggggggcat aaaaagtcga tcgacggtac ccgggc 46
 <210> 9
 <211> 103
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> oligonucleotit
 <400> 9
 ggtaccgagc tcggtagccc gggccatggt agatcctcta gaggatccaa ttcatttata 60
 gcatagaaaa aaacaaaatg aaattctact atattttctg cag 103
 <210> 10
 <211> 702
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>

<223> ORF2 tổng hợp

<400> 10

```

atgacctacc ctagaagaag atataggagg cggaggcatc ggccacggag tcacctggga      60
caaattctgc ggagaaggcc atggttggtg catccaagac atagatatag gtggaggaga      120
aagaacggaa tctttaatac aagactgtct agaacttttg ggtacaccgt gaaaagaaca      180
accgtgagga ccccatcttg ggccgttgat atgatgaggt ttaacatcaa cgatttcttc      240
cctcctgggg gaggatctaa tcctagatcc gttccattcg agtattatag gatcaggaaa      300
gtgaaagtgg agttttggcc atgtagccca attactcaag gagatagagg tgttggatct      360
agcgccgtga tcctggacga caatttcgtg accaaagcaa ccgcactgac ttacgatcct      420
tacgtgaatt attctagcag acacactatt actcaaccat ttagctatca cagcagatat      480
ttcactccta agccagtgtt ggacagcacc atcgactatt ttcagcctaa taataagagg      540
aatcaacttt ggcttaggct tcagaccgcc gggaaacgtgg atcacgtggg attgggaacc      600
gcatttgaga attctattta tgatcaagag tataacatta gagtgactat gtacgtgcag      660
tttagggagt tcaacctgaa agatccacct ctgaatccat aa                          702

```

<210> 11

<211> 702

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> ORF2 tổng hợp

<400> 11

```

atgaaaacga tttccgttgt tacgttggtt tgcgtactac ctgctgttgt ttattcaaca      60
tgtactgtac ccactatgaa taacgctaaa ttgacgtcta ccgaaacatc gtggaaaaaa      120
gagaaaggag tcttgaacac cagattgtct agaacccttcg gttacaccat taagagaacc      180
accgtcaaaa ccccatcttg ggctgtcgat atgatgagat tcaacatcaa cgatttcgtc      240
ccacctggtg gtggatcaaa ccctagatcc gttccattcg agtactacag aatcagaaaa      300
gtcaaagtcg agttctggcc atgctctcct attactcagg gtgatagagg agttggatca      360
actgccgtca tcttgatga caacttcgtc actaaggcta ctgccttgac ctacgatcct      420
tacgtcaatt actctagtag acacaccatc acccaaccat tctcatacca ttccagatac      480
ttcactccaa aacctgtctt ggactcaacc atcgattact ttcaaccaa caacaagaga      540
aaccaattgt ggttgagatt gcaaactgcc ggtaacgtcg atcatgtcgg attgggaacc      600
gccttcgaaa actccaaata cgaccaggag tacaacatta gagtcacat gtacgtccaa      660
ttcagagagt tcaacttgaa ggaccaccca ttgaacccat aa                          702

```

<210> 12

<211> 288
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> oligonucleotit

<400> 12
 aagcttggcc gggggggcca gctcgggtaca taaaaatgtc gacggatccg agtgcaataa 60
 attagaatag tttttcaatt tttagcgtata attaatatt gtatttatta tttatatgcc 120
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa gcttcataaa aagtcgatcg acgggtaccac ccgggggatcg 180
 atccaaaaaa atctttcggc ctgcatgaat ggccttggtg atcgcttatt attatttttg 240
 acaccagacc aactggtaat ggtagcgacc ggcgctcagc tggaattc 288

<210> 13
 <211> 714
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> ORF2 tổng hợp

<400> 13
 ggatccatga cgtatccaag gaggcgttac cgcagaagaa gacaccgccc ccgcagccat 60
 cttggccaga tcctccgccg ccgcccctgg ctctgccacc cccgccaccg ctaccgttg 120
 agaaggaaaa atggcatctt caacacccgc ctctcccgca ccttcggata tactgtcaag 180
 cgtaccacgg tcacaacgcc ctctggggcg gtggacatga tgagatttaa acttgacgac 240
 tttgttcccc cgggaggggg gaccaacaaa atctctatac ctttgaata ctacagaata 300
 agaaagggtta aggttgaatt ctggccctgc tcccccatca ccagggtga taggggagt 360
 ggctccactg ctgttattct agatgataac tttgtaccaa aggcaccagc cctaacttat 420
 gacccatatg taaactactc ctcccgccat acaatcccc aacccttctc ctaccactcc 480
 cgttacttca cacccaaacc tggtcttgac tccactattg attacttcca accaaataac 540
 aaaaggaatc agctttggct gaggtacaa acctctagaa atgtggacca cgtaggcctc 600
 ggcactgctg tcgaaaacag taaatacgac caagactaca atatccgtgt aaccatgtat 660
 gtacaattca gagaatttaa tcttaaagac cccccactta acccctaagt cgac 714

<210> 14
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> oligonucleotit

<400> 14
 aatattacgg gtgctgttt 19

<210> 15
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> oligonucleotit

 <400> 15
 aaaaacatcg tattcctg 18

 <210> 16
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> oligonucleotit

 <400> 16
 cgttcatggt aagcttaacc tgaaatattg 30

 <210> 17
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> oligonucleotit

 <400> 17
 gtttaaacga attcgggtacc cttaaaaaca tcg 33

 <210> 18
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> oligonucleotit

 <400> 18
 cgccgagctc gagaatatta cgggtgctgt ttttac 36

 <210> 19
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> oligonucleotit

 <400> 19
 ccagactgca gagaacatag gtcctaatat aag 33

 <210> 20
 <211> 20
 <212> ADN

<213> Nhân tạo
 <220>
 <223> oligonucleotit
 <400> 20
 aagtggagtt ttggccatgt 20

<210> 21
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> oligonucleotit
 <400> 21
 tccagcactg gcttaggagt 20

<210> 22
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> oligonucleotit
 <400> 22
 caattgaaac atctatatat cctt 24

<210> 23
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> oligonucleotit
 <400> 23
 caatgtgaag cgataaaata cag 23

<210> 24
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> oligonucleotit
 <400> 24
 tatgtctaaa ggtgcttcta 20

<210> 25
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> oligonucleotit

<400> 25
agtggctata ttatcatcct g 21

<210> 26
<211> 22
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> oligonucleotit

<400> 26
atacgattaa gcgatagtga ta 22

<210> 27
<211> 23
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> oligonucleotit

<400> 27
atattatttt catttgtttc cta 23

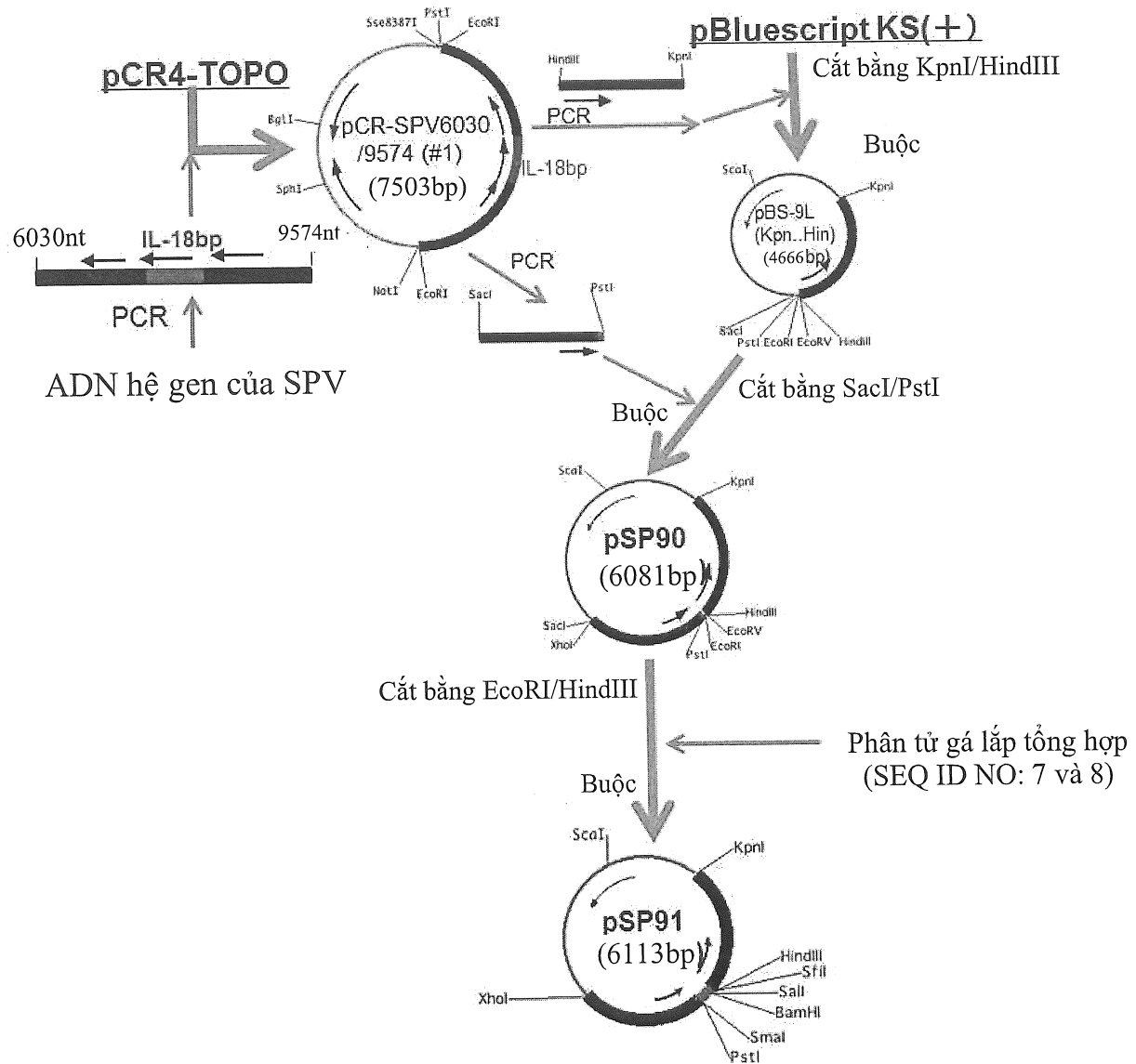


Fig. 1

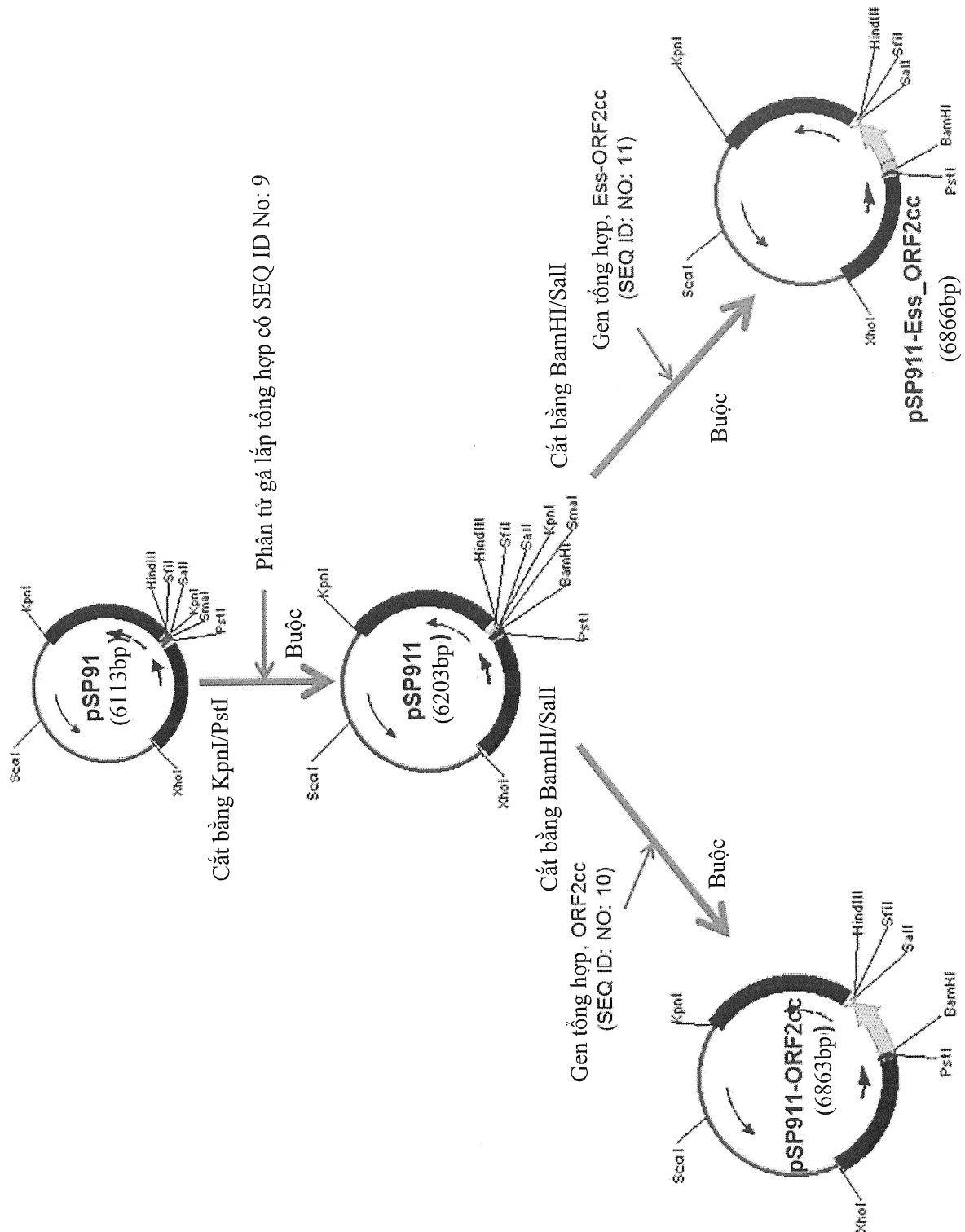


Fig. 2

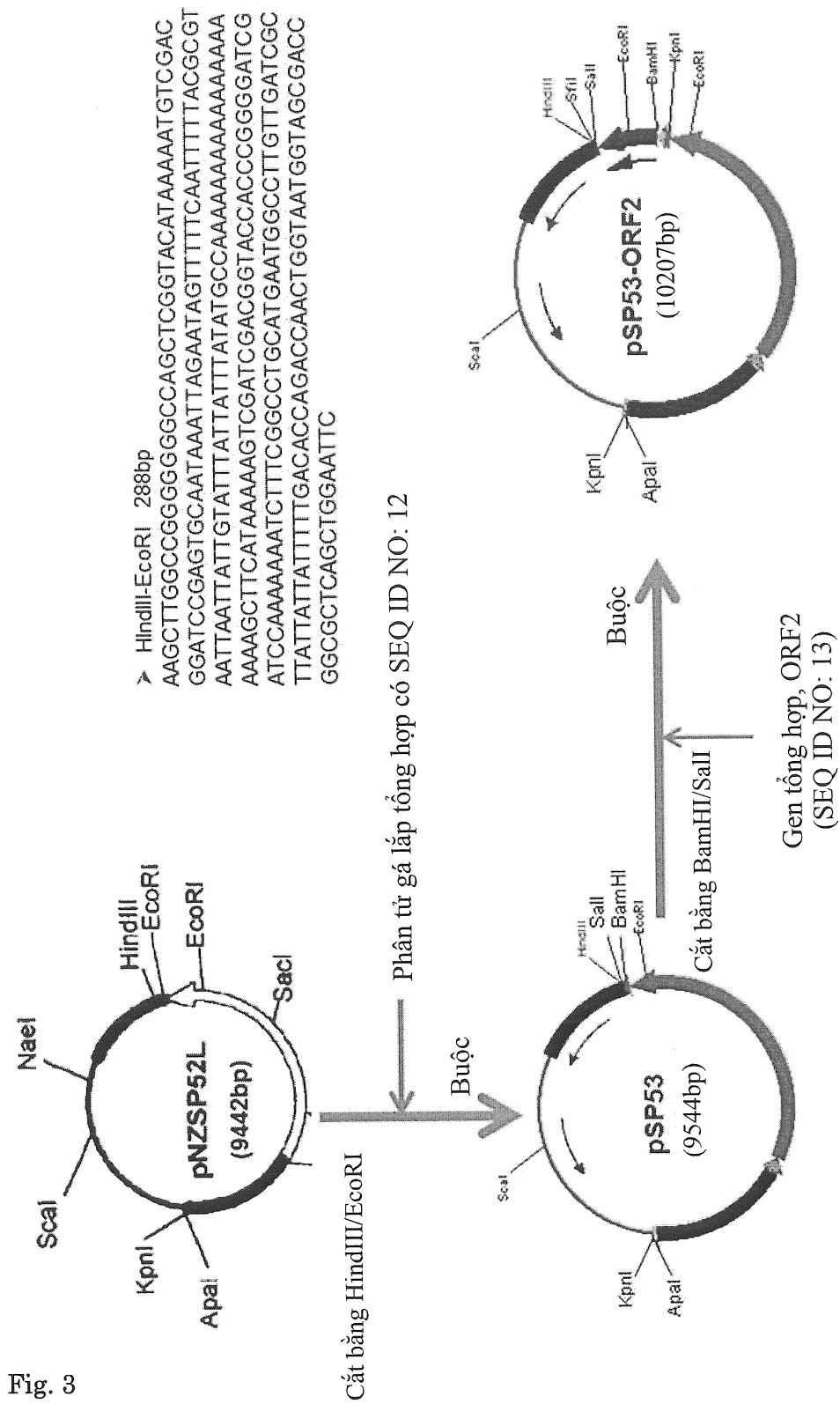


Fig. 3

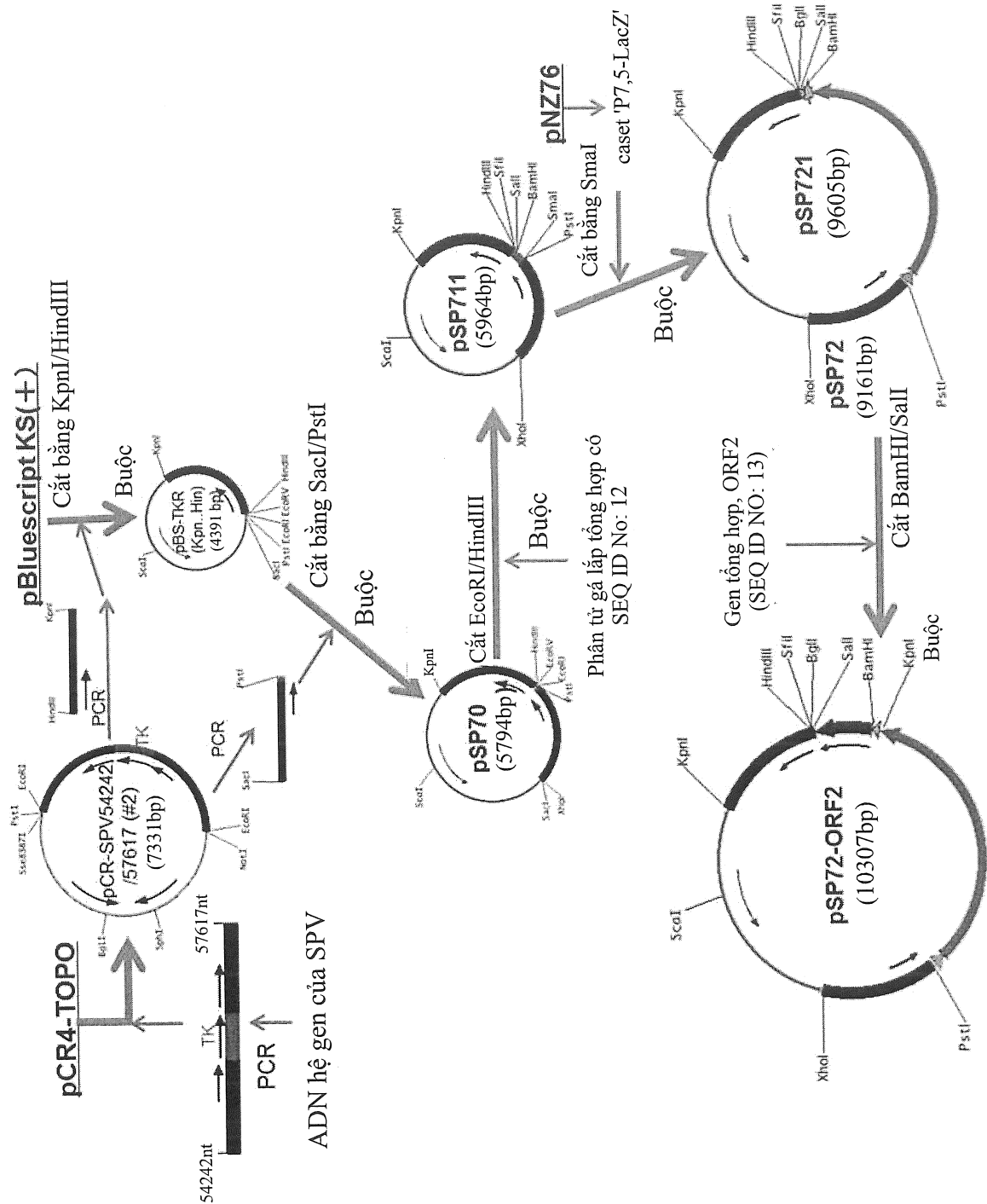


Fig. 4

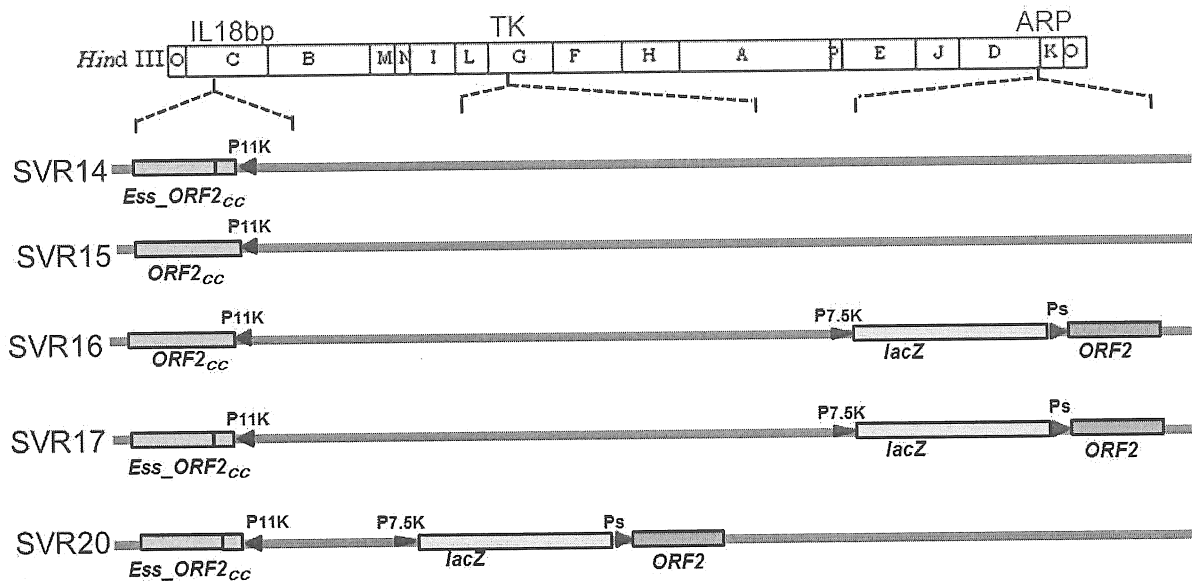


Fig. 5

6 / 11

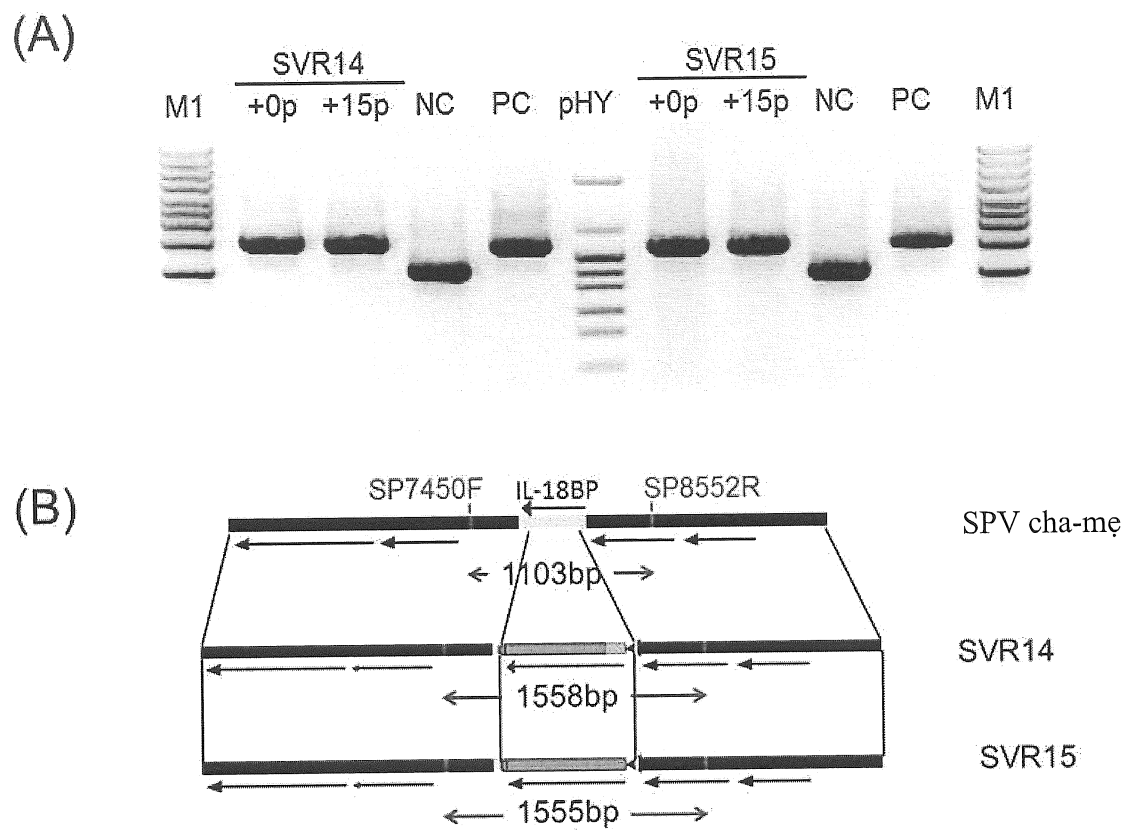


Fig. 6

7 / 11

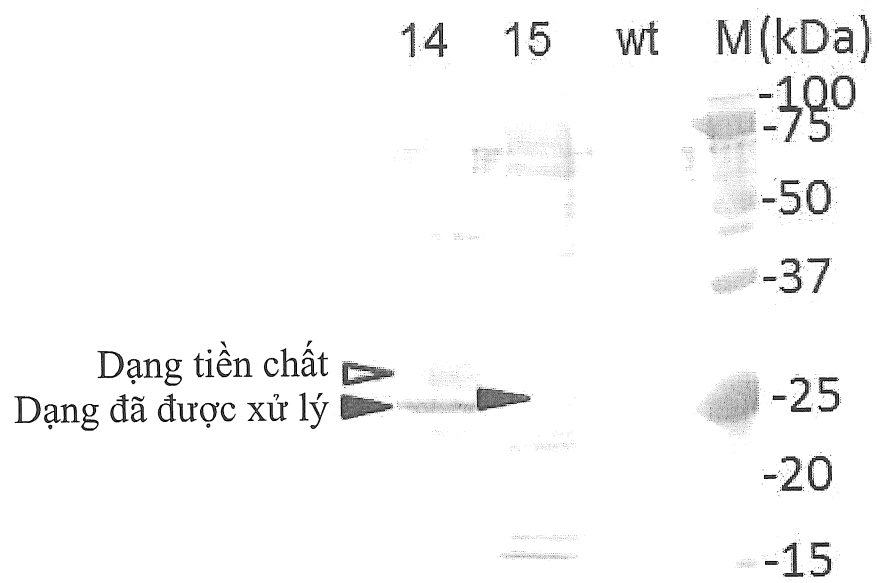


Fig. 7

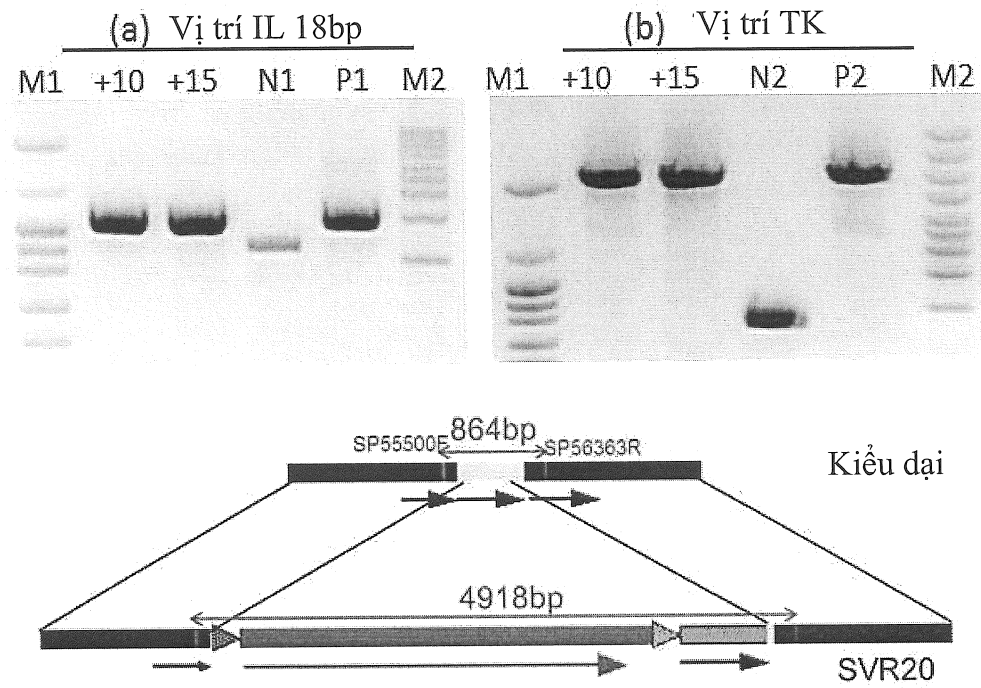


Fig. 9

10 / 11

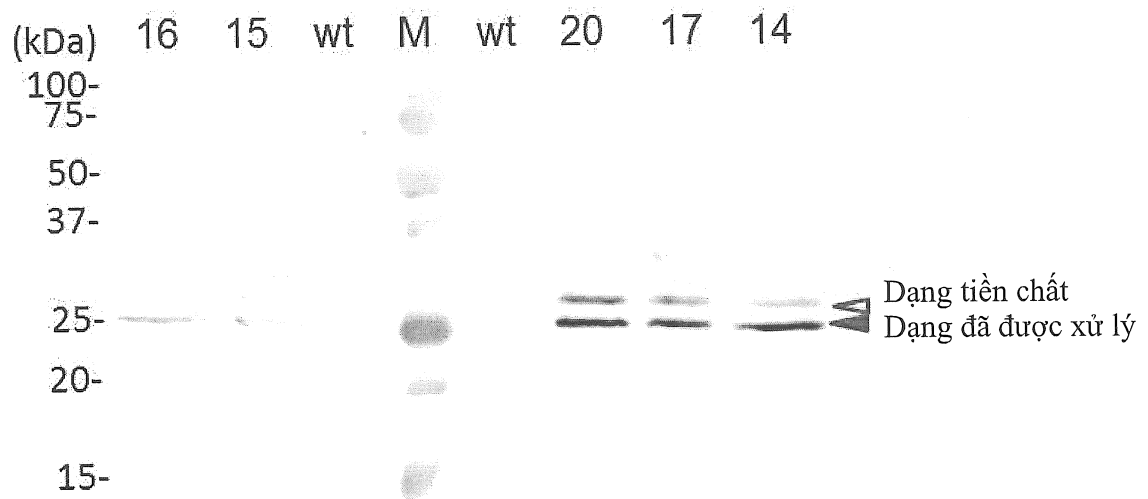


Fig. 10

11 / 11

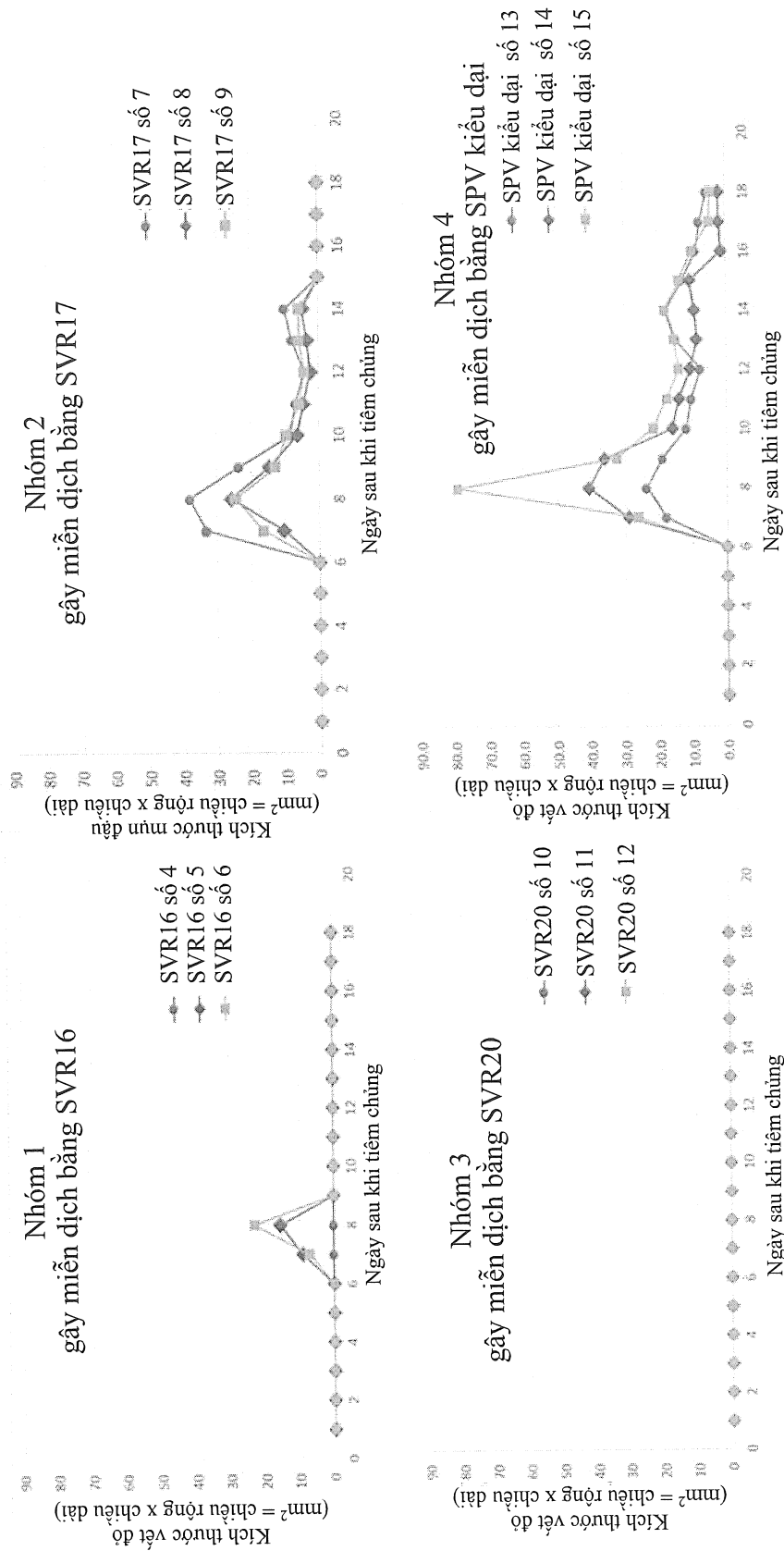


Fig. 11