



(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)



1-0037038

(51)⁷ C12N 15/861; A61K 39/12; C07K (13) B
14/005; C12N 7/04; C12N 15/86; A61K
39/00; C12N 15/85

(21) 1-2019-01939

(22) 18/09/2017

(86) PCT/EP2017/073481 18/09/2017

(87) WO2018/054840 29/03/2018

(30) 16189780.6 20/09/2016 EP

(45) 25/09/2023 426

(43) 25/07/2019 376A

(73) BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH (DE)

Binger Strasse 173, 55216 INGELHEIM AM RHEIN, Germany

(72) MUNDT, Alice (DE); GALLEI, Andreas (DE); KOUKUNTALA, Ramesh (IN);
MANDELL, Robert, Barry (US); REHMET, Kristina (DE); VAUGHN, Eric, Martin
(US).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) TRÌNH TỰ KHỞI ĐẦU, CAT-XET BIỂU HIỆN VÀ VECTƠ THÍCH HỢP ĐỂ
BIỂU HIỆN GEN QUAN TÂM, CHẾ PHẨM SINH MIỄN DỊCH, VACXIN, HOẶC
DƯỢC PHẨM CHỨA CHÚNG, VÀ KIT CHỨA CHẾ PHẨM SINH MIỄN DỊCH
HOẶC VACXIN NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến lĩnh vực (vectơ) vaccin, và đặc biệt là đề cập đến trình tự khởi
đầu, cat-xet biểu hiện và vectơ, mà thích hợp để biểu hiện gen quan tâm, đặc biệt là trình tự
mã hóa kháng nguyên. Các vectơ virus theo sáng chế là hữu dụng để sản xuất chế phẩm
sinh miễn dịch hoặc vaccin. Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch, vaccin,
hoặc dược phẩm chứa trình tự khởi đầu và/hoặc cat-xet biểu hiện và/hoặc vectơ đã nêu.
Sáng chế cũng đề cập đến kit chứa chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực vaccin (vector), và đặc biệt là đề cập đến trình tự khởi đầu mới, cat-xet biểu hiện và vector, mà thích hợp để biểu hiện gen quan tâm, đặc biệt là trình tự mã hóa kháng nguyên. Các vector virus theo sáng chế là hữu dụng để sản xuất chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Tác nhân gây bệnh cho ngựa Equid Alphaherpesvirus 1 (virus gây sảy thai ở ngựa, EHV-1) thuộc chi *Varicellovirus* trong phân họ *Alphaherpesvirinae* thuộc họ *Herpesviridae* trong bộ *Herpesvirales*. Nó là virus lớn, có vỏ với hệ gen ADN sợi kép khoảng 150.000 cặp bazơ. Các thành viên quan trọng khác của phân chi *Varicellovirus* là Human Alphaherpesvirus 3 (virus Varicella Zoster), Suid Alphaherpesvirus 1 (virus Pseudorabies), Bovine Alphaherpesvirus 1 (virus gây bệnh viêm phế quản truyền nhiễm - Infectious Bronchitis Virus), và Equid Alphaherpes Virus 4 (Equine Rhinopneumitis Virus, EHV-4) (<http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp> Virus Taxonomy: 2015 Release EC 47, London, UK, July 2015; Email ratification 2016 (MSL #30) EHV-1 và EHV-4 là đặc hữu và tác động đến ngựa trên toàn thế giới. Trong khi EHV-4 chủ yếu gây lây nhiễm nhẹ cho đường hô hấp trên, thì EHV-1 có thể gây lây nhiễm toàn thân với phổ bệnh từ các triệu chứng rối loạn hô hấp đến sảy thai và bệnh não tủy gây tử vong tùy thuộc vào chủng và tình trạng miễn dịch của vật chủ. Hai vaccin sống được cải biến (MLV) được cấp phép kháng EHV-1 hiện có sẵn ở Mỹ và châu Âu lần lượt là RhinomuneoTM (Boehringer Ingelheim) và PrevaccinoloTM (MSD). Cả hai vaccin này đều chứa chủng EHV-1 RacH đã được làm suy giảm độc lực theo cách truyền thống, mà được cấy chuyển 256 lần trong các tế bào biểu mô của lợn để làm giảm độc lực (Ma et al. 2013). Cơ chế làm giảm độc lực đã được nghiên cứu ở mức độ phân tử. Osterrieder et al. (1996) thể hiện rằng RacH thiếu hai bản sao hệ gen của orf67 và việc khôi phục một bản sao là đủ để khôi phục độc lực. Ngoài ra, RacH mang đoạn

xóa 1283 bp loại bỏ trên 90% của trình tự mã hóa của orf1 mà mã hóa protein virus ức chế miễn dịch. Các đột biến khác cũng có thể tác động đến việc làm giảm độc lực, nhưng đã không được nghiên cứu chi tiết cho đến nay. Tất cả các điều này khiến cho RacH là chủng vaccin rất an toàn vì sự phục hồi độc lực bằng cách cấy chuyển trên động vật được chủng ngừa, nếu có, là rất khó xảy ra.

Nhiễm sắc thể nhân tạo của vi khuẩn *E.coli* (BAC) mang toàn bộ hệ gen của chủng vaccin Equid Alphaherpes Virus 1 (EHV-1) RacH (pRacH-SE) đã được biết là nền tảng cho sự phát triển vaccin vector. Đã thấy rằng các vaccin vector trên cơ sở RacH EHV-1 có thể tạo ra tính miễn dịch ở một số loài động vật có vú bao gồm lợn, gia súc, và chó (Rosas et al. 2007, Rosas et al. 2008, Trapp et al. 2005, Said et al. 2013). Các gen mã hóa các protein kháng nguyên của các tác nhân gây bệnh có thể được biểu hiện bằng RacH EHV-1 tái tổ hợp. Hệ gen RacH-EHV-1 được xử lý dưới dạng BAC của nó trong *E.coli* và được điều chỉnh để biểu hiện các protein bổ sung thường bằng cách cài xen các cat-xet biểu hiện gen chuyển (Tischer et al., 2010). Khi chuyển nhiễm ADN pRacH-SE trong các tế bào cho phép được nuôi cấy, sự sao chép EHV-1 được bắt đầu bằng bằng các yếu tố phiên mã tế bào. Hoạt tính của ADN polymeraza virus dẫn đến sự xóa bỏ tất cả các trình tự có liên quan đến vector BAC và khôi phục hệ gen RacH EHV-1 về trạng thái ban đầu của nó. Virus lây nhiễm được sinh ra, nó không thể phân biệt với RacH.

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

Tuy nhiên, lượng protein chuyển gen được biểu hiện mà không có trình tự khởi đầu ngoại sinh bổ sung thường khá thấp. Vì thế, chưa đáp ứng được nhu cầu về trình tự khởi đầu bổ sung mà có thể được sử dụng để biểu hiện các protein chuyển gen từ vector như vậy, đặc biệt là EHV-1 RacH tái tổ hợp.

Các chủng EHV-1 kiểu dại có ba khung đọc mở (open reading frame - orf) được gọi là orf1, orf 2 và orf3 ở một đầu của đoạn đơn nhất dài của hệ gen của chúng (các tọa độ trình tự 1298-3614; fig. 2). Orf1 và orf3 được sắp xếp tuần tự trên một sợi của

ADN trong khi orf 2 được mã hóa bởi sợi bổ sung. Chủng vaccin RacH có đoạn xóa 1283 bp trong đó vùng ảnh hưởng đến các orf 1 và 2 thể hiện rằng các gen này là không thiết yếu cho sự sao chép của virus. Vì lý do này, vị trí này đóng vai trò là vị trí cài xen gen chuyển. Bằng cách sử dụng yếu tố tăng cường vùng khởi đầu gen rất sớm 1 của Human cytomegalovirus (Boshart et al. 1985), gen chuyển được thông báo là được biểu hiện hiệu quả từ vị trí cài xen orf1/3. Trong các nghiên cứu này, tín hiệu polyadenyl hóa hormon tăng trưởng bò (bovine growth hormone - BGH) được sử dụng để làm ổn định các sản phẩm phiên mã để biểu hiện tốt hơn (Ma et al. 2012; Said et al. 2013). Mặc dù không có bằng chứng nào cho thấy HCMV có thể gây ra khối u ở người, nhưng rủi ro về mặt lý thuyết không thể được loại trừ. Trước khi yếu tố tăng cường HCMV-IE được mô tả (Boshart et al. 1985) phần lớn các yếu tố tăng cường mạnh được phát hiện trong hệ gen của các virus gây ung thư như virus Simian 40, virus polyoma hoặc virus gây sarcom cho chuột Moloney. Mặc dù yếu tố tăng cường trình tự khởi đầu IE HCMV và MCMV (cytomegalovirus ở chuột nhắt) đặc hiệu không thuộc mô và cực mạnh cực kỳ thích hợp cho nhiều hoạt động nghiên cứu, chúng có thể không phải là lựa chọn đầu tiên của trình tự khởi đầu cho vaccin vector chuyển gen nói chung. Cụ thể, nguy cơ phơi nhiễm ngẫu nhiên của người chủng ngừa cho động vật có thể được các cơ quan quản lý xem là rào cản cho việc cấp phép vaccin.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Để tránh những trở ngại bất kỳ như vậy, sáng chế đề xuất trình tự axit nucleic điều hòa / trình tự khởi đầu mới để biểu hiện gen chuyển, đặc biệt là trong trường hợp vaccin vector và đặc biệt là trong trường hợp vector EHV-1.

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

Sáng chế đề xuất trình tự axit nucleic điều hòa / trình tự khởi đầu mới để biểu hiện gen chuyển, chế phẩm miễn dịch, vaccin, và các phương pháp liên quan mà khắc phục được các thiếu sót trong lĩnh vực.

Trình tự khởi đầu được thiết lập được sử dụng rộng rãi để khiến cho sự biểu hiện gen chuyển ở mức cao trong các hệ vectơ khác nhau bao gồm herpesvirut là trình tự khởi đầu của gen rất sớm của HCMV (Boshart et al. 1985; Foecking and Hofstetter 1986) hoặc the cytomegalovirut ở chuột nhắt (MCMV; Dorsch-Häsler et al. 1985) hoặc trình tự khởi đầu mạnh của virut gây ung thư như virut simian 40 (SV40), chẳng hạn trình tự khởi đầu kháng nguyên T lớn SV40 và nhiều trình tự khởi đầu khác (chẳng hạn trong tài liệu: Kim et al. 1990). Các trình tự khởi đầu mạnh như vậy được các nhà sinh học tế bào ưu tiên do chúng hoạt động độc lập trong nhiều hệ nuôi cấy tế bào khác nhau. Trong trường hợp sao chép virut, tế bào đã gây nhiễm được biến nạp bởi các chức năng của virut thành bộ máy sao chép virut. Quá trình sinh học của sự sao chép và hình thái học của herpesvirut đã được biết rõ. Sau khi gây nhiễm, chỉ rất ít gen (các gen α) được phiên mã và dịch mã thành protein rất sớm (IEp). Các IEp này là các chất hoạt hóa phiên mã đối với các gen β mã hóa enzym virut như ADN polymeraza và nhiều enzym khác. Sự khởi đầu quá trình sao chép hệ gen virut đánh dấu sự bắt đầu pha muộn của sự sao chép virut ở đó các gen β và γ đang được phiên mã mà mã hóa cho protein cấu trúc ở virut (Fields, 2013). Đối với vacxin vectơ cải tiến, tuy nhiên, không nhìn thấy trình tự khởi đầu mạnh độc lập nào được mô tả ở trên như một tùy chọn, cụ thể là các trình tự khởi đầu mạnh độc lập có nguồn gốc từ virut gây ung thư có profin an toàn bất lợi. Vì vậy, cần tạo ra các trình tự khởi đầu có hoạt tính sao chép virut cao như các trình tự khởi đầu của các gen β và γ EHV-1. Do không thể sử dụng một trình tự ADN giống hệt hai lần trong một phân tử vectơ mà không dẫn đến nguy cơ tái tổ hợp tương đồng bên trong và vì vậy làm mất ổn định về mặt di truyền, sáng chế đề xuất trình tự khởi đầu thay thế mới có nguồn gốc từ trình tự bộ gen đã công bố EHV-4 (Equid Alpha herpesvirut 4 chủng NS80567, bộ gen hoàn thiện, Số truy cập AF030027, Version AF030027.1 GI:2605950, ngày 21 tháng 5 năm 1998). Độ đồng nhất về mặt trình tự của các gen với gen EHV-1 nằm trong khoảng từ 55 đến 84%.

Sáng chế đề xuất hai trình tự khởi đầu mới: p430 và p455, mà được chỉ ra là có chức năng tạo ra sự sao chép rEHV1-RacH trong nuôi cấy tế bào, cũng như ở động vật (lợn và chuột nhắt). Mức hoạt tính của hai trình tự khởi đầu mới này trong chu kỳ sao

chép của virus dường như rất giống như được suy ra từ các thí nghiệm động học trình tự khởi đầu in vitro.

Các đặc điểm này cho phép tạo ra vaccine vector tái tổ hợp dựa trên việc EHV-1 *RacH* biểu hiện hai kháng nguyên khác nhau theo cách song song với hiệu quả tương tự. Nếu đích vaccine gồm có hai mầm bệnh khác nhau, việc ứng dụng hai trình tự khởi đầu mới này trong hai vị trí cài xen được kết hợp với hai trình tự polyadenyl hóa có thể làm giảm đáng kể chi phí hàng hóa và có ưu điểm rõ ràng so với vector chỉ biểu hiện một thành phần kháng nguyên.

Sáng chế đề xuất hai trình tự khởi đầu mới: 4pgG600 và 4pMCP600, và các dẫn xuất với chiều dài ngắn hơn của nó, mà được chỉ ra là có chức năng sau khi chuyển nhiễm tạm thời trong nuôi cấy tế bào hoặc trong bối cảnh sao chép rEHV1-*RacH* trong nuôi cấy tế bào.

Ngoài ra, trình tự khởi đầu mới được tạo ra bởi sáng chế được chỉ ra là hữu hiệu trong các bối cảnh vector khác như adenovirus ở chó (CA_{AdV}) chẳng hạn.

Quan trọng là, việc giải phóng CA_{AdV} tái tổ hợp không đạt được khi trình tự khởi đầu CAG hoặc CMV5 đều có mặt trong cat-xet biểu hiện được đặt trong vùng E3. Điều này dường như là đặc hiệu trình tự do kích thước của cat-xet biểu hiện không vượt quá giới hạn kích thước hệ gen thí nghiệm quan sát được. Vì vậy, trình tự khởi đầu mới bắt nguồn từ EHV-4 theo sáng chế như p430 và p455 không chỉ tạo điều kiện cho sự biểu hiện gen chuyển, mà còn trợ giúp cho bước giải phóng virus quyết định, và vì vậy có lợi hơn so với trình tự khởi đầu đã biết trong lĩnh vực.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

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

Fig. 1. Hình minh họa vị trí cài xen *orf70*

UL = đoạn đơn nhất dài

US = đoạn đơn nhất ngắn

IR = lặp đoạn ngược chiều bên trong

TR = lặp đoạn ngược chiều đầu tận

gG = glycoprotein G

gpII = glycoprotein II

orf = khung đọc mở

bp = cặp bazơ

Fig. 2. Sơ đồ minh họa so sánh các vùng orf1/3 của chủng EHV-1 kiểu dại (wt) ab4 và chủng vacxin giảm độc lực EHV-1 RacH.

Fig. 3. Các kết quả qPCR của thử nghiệm động học trình tự khởi đầu.

Đồ thị trên hình 3.a thể hiện động học của sự phiên mã orf72, mã hóa cho glycoprotein D thiết yếu. Các dữ liệu này được sử dụng để chuẩn hóa dữ liệu của động học phiên mã của mCherry (đồ thị trên 3.b).

Fig. 4. Các kết quả qPCR của thử nghiệm động học hai trình tự khởi đầu độc lập: Sự tương quan dương của hoạt tính phiên mã và giá trị được mô tả. Các giá trị Ct đã chuẩn hóa của các kết quả mCherry qPCR tại các thời điểm khác nhau sau khi lây nhiễm được trừ từ giá trị Ct trung bình tương ứng tại t=0. Hai thử nghiệm trong hai dòng tế bào khác nhau được thể hiện.

Fig. 5. Bản đồ plasmit của plasmit chuyển để cài xen cat-xet biểu hiện p455-H3-71 vào orf70 của EHV-1 RacH.

ORF69 đầu 3' trình tự ADN bộ gen virus kẹp sườn vị trí cài xen ngược chiều

ORF70 đầu 3' trình tự ADN bộ gen virus kẹp sườn vị trí cài xen xuôi chiều

p455 trình tự khởi đầu điều khiển sự biểu hiện của gen chuyển

H3 gen chuyển (IAV hemagglutinin)

71pA trình tự polyadenyl hóa

I-SceI vị trí phân cắt đối với I-SceI

trình tự khởi đầu aph trình tự khởi đầu ở sinh vật nhân sơ điều khiển sự biểu hiện của gen kháng Kanamycin

Kana orf kháng Kanamycin

ORI gốc sao chép của vector plasmit

Apr gen kháng Ampicillin

EcoRI, SalI, NotI, HindIII, KpnI, BamHI, XbaI biểu thị các vị trí phân cắt endonucleaza giới hạn

Fig. 6. Sơ đồ minh họa hệ gen của rEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3 với vùng cài xen orf70 được phóng đại.

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

Fig. 7. Thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang gián tiếp: Thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang gián tiếp của tế bào VERO bị nhiễm rEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3 24 h p.i. tế bào được cố định bằng etanol và được làm khô bằng không khí. Bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng kháng H3 có bán trên thị trường làm kháng thể sơ cấp và IgG của thỏ kháng chuột được liên hợp FITC làm kháng thể thứ cấp, H3 đã thể hiện trong các tế bào bị nhiễm EHV-1 RacH SE-70-p455-H3 tái tổ hợp bằng kính hiển vi huỳnh quang.

Fig. 8. Thẩm tách Western: Thẩm tách Western đối với tế bào bị nhiễm các dịch cấy chuyển khác nhau của rEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3 hoặc rEHV-1 RacH-SE đối chứng hoặc được gây nhiễm giả. Mẫu thẩm tách bên trái được ủ với kháng thể đơn dòng Ai2G7 được hướng đến gpII của EHV-1. Mẫu thẩm tách bên phải được ủ với huyết thanh tăng miễn dịch của thỏ có bán trên thị trường kháng hemagglutinin H3 cúm A (PA5-34930). Chú thích các đường:

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

Fig. 9a và 9b. Độ chuẩn virus:

Các biểu đồ thể hiện tải lượng virus của các mẫu phổi của các con lợn được chủng ngừa hoặc không được chủng ngừa sau thử thách

Inact = vaccin vô hoạt có bán trên thị trường

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

Fig. 10. Bản đồ plasmit của plasmit chuyển để cài xen cat-xet biểu hiện p430-H1av-BGH vào orf1/3 của EHV-1 RacH.

Flank A trình tự ADN bộ gen virus kẹp sườn vị trí cài xen xuôi chiều

Flank B trình tự ADN bộ gen virus kẹp sườn vị trí cài xen xuôi chiều

p430 trình tự khởi đầu điều khiển sự biểu hiện của gen chuyển

H1av gen chuyển (IAV hemagglutinin)

BGHpA trình tự polyadenyl hóa

I-SceI vị trí phân cắt đối với I-SceI

trình tự khởi đầu aph trình tự khởi đầu ở sinh vật nhân sơ điều khiển sự biểu hiện của gen kháng Kanamycin

Kana orf kháng Kanamycin

ORI gốc sao chép của vector plasmit

Apr gen kháng Ampicillin

EcoRI, Sall, NotI, HindIII, KpnI, BamHI biểu thị các vị trí phân cắt endonucleaza giới hạn

Fig. 11. Sơ đồ minh họa hệ gen của rEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1av với vùng cài xen orf1/3 được phóng đại.

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

Fig. 12. Thẩm tách Western và miễn dịch huỳnh quang của tế bào bị nhiễm rEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1av thể hiện sự biểu hiện của gen chuyển.

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

SE = rEHV-RacH-SE (đối chứng)

Giả = tế bào không bị nhiễm (đối chứng)

Fig. 13. Sơ đồ minh họa hệ gen của rEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1av-70-p455-H3 (rEHV-1-RacH-SE **B**) với hai vùng cài xen được phóng đại.

Δ orf1: Phần còn lại của khung đọc mở 1 ngược chiều với vị trí cài xen; p430: trình tự khởi đầu mới; H1av: hemagglutinin virut cúm gen chuyển; BGHpA: trình tự polyadenyl hóa hormon tăng trưởng bò; orf3: khung đọc mở 3 xuôi chiều với vị trí cài xen. orf69: khung đọc mở 69 ngược dòng của vị trí cài xen trong orf70; p455: trình tự khởi đầu mới; H3: hemagglutinin virut cúm gen chuyển; 71pA: trình tự polyadenyl hóa mới; Δ orf70: phần còn lại của orf70 chứa trình tự khởi đầu đối với orf71, mã hóa glycoprotein II virut cấu trúc (gpII).

Fig. 14. Thăm tách Western: Thăm tách Western của tế bào bị nhiễm rEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1av-70-455-H3 (B), vector trống rEHV-1 RacH-SE (SE), hoặc được gây nhiễm giả (ctrl). Các mẫu thăm tách bản sao được ủ với huyết thanh tăng miễn dịch của thỏ có bán trên thị trường (PA-34930) kháng H3 (H3), huyết thanh tăng miễn dịch của thỏ có bán trên thị trường (PA -34929) kháng H1 (H1), hoặc kháng thể đơn dòng Ai2G7 kháng EHV-1 gpII (gpII).

Fig.15: Phân tích đếm tế bào trong dòng chảy đối với tế bào AI-ST 2015 bị nhiễm CAV2 CMVie CPV VP2: 72h sau nhiễm

Fig. 16: rCAV-2 với trình tự khởi đầu EHV-4 mới: Phân tích đếm tế bào trong dòng chảy đối với tế bào AI-ST 2015 đã nhiễm: 48h sau nhiễm

Fig. 17: rCAV-2 với trình tự khởi đầu EHV-4 mới: Phương pháp phân tích thăm tách điểm của sự biểu hiện protein CPV VP2 ở các tế bào E1B MDCK (rCAV-2 mới) đã gây nhiễm

1° = 1/50 a-CPV-FITC mAb (VMRD)

2° = 1/1000 IgG-peroxidaza dê kháng chuột (JIR)

A) Dữ liệu điểm thăm tách ban đầu

B) Dữ liệu bán định lượng được tạo ra từ thăm tách điểm: Đề định lượng, các điểm thăm tách được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm ImageJ (Burger, W.,

Burge, M.J. (Eds.), 2008. Digital Image Processing: An algorithmic introduction using Java. Springer-Verlag, New York). Màu sắc của hình ảnh được đảo ngược để trừ đi nền và mật độ tích hợp của mỗi điểm được ghi. Các giá trị được gán các tên gọi + và – như sau: “++++” = >800000, “+++” = từ 500000 đến 800000, “++” = từ 300000 đến 499999, “+” = từ 120000 đến 299999, “+/-” = từ 80000 đến 119999 và “-” = <80000.

Fig.18: Phát hiện RabG ở các tế bào bị lây nhiễm với rCAV-2 p455 RabG: sự biểu hiện được phát hiện ở < 1% tế bào bị lây nhiễm với rCAV-2 CMVie RabG ban đầu

Fig.19: Phát hiện RabG ở các tế bào bị lây nhiễm với rCAV-2 p455 RabG: A) IFA đối với sự biểu hiện CPV VP2 ở các tế bào AI-ST 2015 bị lây nhiễm, B) IFA đối với sự biểu hiện RabG ở các tế bào AI-ST 2015, C) IFA đối với sự biểu hiện RabG ở các tế bào BIVI 2011 MDCK – vết nhuộm kép đối với với RabG và CAV-2.

Fig. 20. Thân nhiệt trung bình của các nhóm trước và ở 1,2, và 3 ngày sau khi thử thách. Khoảng sai số, độ lệch chuẩn. Từ trái sang phải trên mỗi ngày thử nghiệm: nhóm đối chứng âm (neg. ctrl.), nhóm đối chứng thử thách (chall. ctrl.), động vật được chủng ngừa một lần bằng RacH-SE-70-p455-H3 (1x EHV-1), được chủng ngừa hai lần bằng RacH-SE-70-p455-H3 (2x EHV-1), hoặc hai lần bằng vaccin IAV lợn vô hoạt (2x chết).

Fig. 21. Điểm số trung bình của phổi của các nhóm một và ba ngày sau khi thử thách. Khoảng sai số, độ lệch chuẩn. Nhóm đối chứng âm (neg. ctrl.), nhóm đối chứng thử thách (chall. ctrl.), động vật được chủng ngừa một lần bằng RacH-SE-70-p455-H3 (1x EHV-1), được chủng ngừa hai lần bằng RacH-SE-70-p455-H3 (2x EHV-1), hoặc hai lần bằng vaccin IAV lợn vô hoạt (2x chết).

Fig. 22. Độ chuẩn trung hòa huyết thanh thuận nghịch (SN) của huyết thanh động vật kháng chủng thử thách IAV H3 lợn R452-14 được thu gom vào ngày thử thách. 20, giới hạn phát hiện. Nhóm đối chứng âm (neg. ctrl.), nhóm đối chứng thử thách (chall. ctrl.), động vật được chủng ngừa một lần bằng RacH-SE-70-p455-H3 (1x EHV-1), được chủng ngừa hai lần bằng RacH-SE-70-p455-H3 (2x EHV-1), hoặc hai lần bằng vaccin IAV lợn vô hoạt (2x chết).

Fig. 23. Các kết quả từ IL-1 β từ BALF được lấy một hoặc hai ngày sau khi sử

dụng thử thách IAV lợn. Mỗi chấm là giá trị được xác định cho mỗi động vật. Nhóm đối chứng âm tính (Neg. Ctr.), nhóm đối chứng thử thách (Chall. Ctr.), các con vật được chủng ngừa một lần bằng RacH-SE-70-p455-H3 (1x EHV-1), được chủng ngừa hai lần bằng RacH-SE-70-p455-H3 (2x EHV-1), hoặc hai lần bằng vacxin IAV lợn vô hoạt (2x chết).

Fig. 24. Các kết quả từ IFN γ -ELISpots của PBMC được kích thích lại 7 ngày sau khi chủng ngừa lần hai. (A), nhóm đối chứng không được chủng ngừa; (B), được chủng ngừa hai lần bằng vacxin IAV lợn vô hoạt; (C), được chủng ngừa một lần bằng rEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3; (D), được chủng ngừa hai lần bằng rEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3. Đối với các động vật chỉ được chủng ngừa một lần bằng rEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3 việc kích thích lại tương ứng với 7 ngày sau khi chủng ngừa lần thứ nhất. Mỗi chấm là giá trị được xác định cho mỗi con vật ở thời điểm đã định và sau khi kích thích lại bằng các tác nhân kích thích cụ thể. Để kích thích lại, IAV HA lợn được biểu hiện tái tổ hợp tương ứng với kháng nguyên vacxin H3 trong rEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3 (HA_V), IAV HA lợn được biểu hiện tái tổ hợp tương ứng với H3 của chủng thử thách R452-14 (HA_CH), môi trường để pha loãng HA_V và HA_CH (RPMI), vector EHV-1 RacH-SE trống (EHV-1 trống), vacxin RacH-SE-70-p455-H3 (EHV-1-H3), chủng thử thách IAV lợn H3N2 R452-14 (H3N2), dịch nổi tế bào từ các tế bào không bị nhiễm được sử dụng để nuôi cấy R452-14 (MDCK), hoặc nucleoprotein IAV lợn (NP) được biểu hiện tái tổ hợp được sử dụng.

Fig. 25. Bản đồ sơ lược của plasmid chuyển pU1/3-p430-H1hu-BGHKBGH

Fig. 26: Bản đồ sơ lược của plasmid chuyển pU70-p455-H1pdm-71K71

Fig. 27: Hệ gen ADN sợi kép mạch thẳng của rEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1hu-70-p455-H1pdm (rEHV-1 RacH-SE_D) với các vùng cài xen orf1/3 và orf70 được phóng đại

Fig. 28: Thâm tách Westerns của các tế bào bị nhiễm rEHV-1 RacH-SE_B, RacH-SE_D, RacH-SE, hoặc không bị nhiễm (ctrl). Các mẫu thâm tách bản sao được ủ với huyết thanh tăng miễn dịch đa dòng của thử kháng H3 (PA5-34930), huyết thanh tăng miễn dịch đa dòng của thử kháng H1 (PA5-34929), hoặc kháng thể đơn dòng (Ai2G7) kháng EHV-1 glycoprotein II (gpII). Tất cả các kháng thể được tạo ra các mẫu

như kỳ vọng xác nhận sự biểu hiện của các kháng nguyên mong muốn H3 và H1 và hiệu quả sao chép có thể so sánh của các virus khác nhau như được đánh giá từ các kết quả nhuộm rất giống nhau của EHV-1 gpII trên tất cả các mẫu tế bào bị nhiễm.

Fig. 29: Kết quả của các thử nghiệm trung hòa virus cúm A đối với huyết thanh chuột nhắt. * Khoảng sai số thể hiện độ lệch chuẩn.

Fig. 30: Bản đồ của plasmit chuyển pU70-455-SBVGc_71K71

Fig. 31: A) Kết quả của RT-PCR định lượng đối với gia súc đối chứng không được chủng ngừa (ô trên) và các con vật được chủng ngừa hai lần bằng rEHV-SBV-Gc (ô dưới) để phát hiện hệ gen virus SBV. Các con vật riêng rẽ được nhận diện bằng các loại đường và ký hiệu khác nhau lần lượt đối với mỗi nhóm động vật không được chủng ngừa và được chủng ngừa. Con vật số 1 được mô tả là đường nét liền màu đen với các hình tròn đen (tương ứng với cột màu đen trên fig.27B). Con vật số 2 được mô tả là đường nét đứt màu xám với các hình tam giác màu xám (tương ứng với cột màu xám nhạt trên fig.27B). Con vật số 3 được mô tả là đường nét đứt màu đen với các hình vuông trắng (tương ứng với các cột màu trắng trên fig.27B). Con vật số 4 được mô tả là đường nét đứt màu xám với hình thoi màu xám (tương ứng với cột màu xám đậm trên fig.27B). B) Kết quả từ các thử nghiệm trung hòa huyết thanh đối với gia súc đối chứng không được chủng ngừa (ô trên) và các con vật được chủng ngừa hai lần bằng rEHV-SBV-Gc (ô dưới). Các con vật riêng rẽ được nhận diện bằng các màu sắc cột khác nhau (từ màu đen đến xám nhạt đến xám đậm và đến trắng) lần lượt đối với mỗi nhóm động vật không được chủng ngừa và được chủng ngừa. Con vật số 1 được mô tả là cột màu đen (tương ứng với đường màu đen với các hình tròn màu đen trên fig.27A). Con vật số 2 được mô tả là cột màu xám nhạt (tương ứng với đường nét đứt màu xám với các hình tam giác màu xám trên fig.27A). Con vật số 3 được mô tả là cột màu trắng (tương ứng với đường nét đứt màu đen với các hình vuông màu trắng trên fig.27A). Con vật số 4 được mô tả là cột màu xám đậm (tương ứng với đường nét đứt màu xám với hình thoi màu xám trên fig.27A).

Fig. 32: Thử nghiệm trung hòa EHV. Tất cả các kết quả thu được từ các mẫu của con vật giống nhau trong nhóm tương ứng được thể hiện dưới sắc thái màu xám như nhau: một con vật được biểu thị bằng cột màu đen, con vật khác được biểu thị bằng cột

màu xám nhạt, con vật thứ ba được biểu thị bằng cột màu trắng, và con vật thứ tư được biểu thị bằng cột màu xám đậm.

Fig. 33: Độ chuẩn IAV lợn ở phổi được xác định là mô phổi TCID₅₀/g đối với các động vật bị giết một ngày sau khi thử thách. neg. ctrl., nhóm đối chứng âm; chall. ctrl., nhóm đối chứng âm thử thách; 2x IM, nhóm được chủng ngừa hai lần trong cơ; IN+IM, nhóm được chủng ngừa lần thứ nhất trong mũi và lần thứ hai trong cơ; 2X IN, nhóm được chủng ngừa hai lần trong mũi. Các điểm dữ liệu thể hiện giá trị trung bình thu được từ các con vật riêng lẻ. Đường nằm ngang ở giữa tương ứng thể hiện các giá trị trung bình của nhóm. Các đường nằm ngang trên và dưới tương ứng cho biết các độ lệch chuẩn. Giá trị p đối với các so sánh thống kê theo cặp của các nhóm được nêu dưới đây và được tính bằng kiểm định t bằng cách sử dụng kiểm định Mann-Whitney và GraphPad Prism® cho phần mềm Windows 7.02, GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA 92037, USA, bằng cách cài đặt các phần mềm chuẩn tương ứng.

Fig. 34: Độ chuẩn IAV trong phổi lợn được xác định là TCID₅₀/g mô phổi đối với các con vật bị giết ba ngày sau khi thử thách. neg. ctrl., nhóm đối chứng âm; chall. ctrl., nhóm đối chứng âm thử thách; 2x IM, nhóm được chủng ngừa hai lần trong cơ; IN+IM, nhóm được chủng ngừa lần thứ nhất trong mũi và lần thứ hai trong cơ; 2X IN, nhóm được chủng ngừa hai lần trong mũi. Các điểm dữ liệu thể hiện giá trị trung bình thu được từ các con vật riêng lẻ. Đường nằm ngang ở giữa tương ứng thể hiện các giá trị trung bình của nhóm. Các đường nằm ngang trên và dưới tương ứng cho biết các độ lệch chuẩn. Giá trị p đối với các so sánh thống kê theo cặp của các nhóm được nêu dưới đây và được tính bằng kiểm định t bằng cách sử dụng kiểm định Mann-Whitney và GraphPad Prism® cho phần mềm Windows 7.02, GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA 92037, USA, bằng cách cài đặt các phần mềm chuẩn tương ứng.

Fig. 35: Độ chuẩn IAV ở phổi lợn được xác định là TCID₅₀/g mô phổi đối với các con vật bị giết năm ngày sau khi thử thách. neg. ctrl., nhóm đối chứng âm; chall. ctrl., nhóm đối chứng âm thử thách; 2x IM, nhóm được chủng ngừa hai lần trong cơ; IN+IM, nhóm được chủng ngừa lần thứ nhất trong mũi và lần thứ hai trong cơ; 2X IN, nhóm được chủng ngừa hai lần trong mũi. Các điểm dữ liệu thể hiện giá trị trung bình thu được từ các con vật riêng lẻ. Đường nằm ngang ở giữa tương ứng thể hiện các giá

trị trung bình của nhóm. Các đường nằm ngang trên và dưới tương ứng cho biết các độ lệch chuẩn. Giá trị p đối với các so sánh thống kê theo cặp của các nhóm được nêu dưới đây và được tính bằng kiểm định t bằng cách sử dụng kiểm định Mann-Whitney và GraphPad Prism® cho phần mềm Windows 7.02, GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA 92037, USA, bằng cách cài đặt các phần mềm chuẩn tương ứng.

Fig. 36: Các kết quả từ các thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (enzyme-linked immunosorbent assay - ELISA) đặc hiệu với globulin miễn dịch G (IgG) của lợn kháng kháng nguyên hemagglutinin H3 của IAV lợn được biểu hiện tái tổ hợp mà tương đồng với H3 được biểu hiện bởi chủng vacxin rEHV-1 RacH-SE_B. Với thử nghiệm này, mỗi lỗ được phủ bằng 100 ng H3 được biểu hiện tái tổ hợp. Các mẫu được đo theo cặp, giá trị trung bình của mẫu được tính từ các số đo theo cặp, và giá trị của nhóm được tính từ giá trị trung bình của mẫu tương ứng. chall. ctrl., nhóm đối chứng thử thách (dùng làm đối chứng âm); 2x IM, nhóm được chủng ngừa hai lần trong cơ; IN+IM, nhóm được chủng ngừa lần thứ nhất trong mũi và lần thứ hai trong cơ; 2X IN, nhóm được chủng ngừa hai lần trong mũi. Khoảng sai số thể hiện độ lệch chuẩn. Ngày nghiên cứu (Study days - SD) được nêu trong chú giải ở bên phải của đồ thị.

Fig. 37: Các kết quả từ các thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (enzyme-linked immunosorbent assay - ELISA) đặc hiệu với globulin miễn dịch G (IgG) của lợn kháng kháng nguyên hemagglutinin H3 của IAV lợn được biểu hiện tái tổ hợp mà tương đồng với H3 được biểu hiện bởi chủng vacxin rEHV-1 RacH-SE_B. Với thử nghiệm này, mỗi lỗ được phủ bằng 100 ng H3 được biểu hiện tái tổ hợp. Các mẫu được đo theo cặp, giá trị trung bình của mẫu được tính từ các số đo theo cặp, và giá trị của nhóm được tính từ giá trị trung bình của mẫu tương ứng. chall. ctrl., nhóm đối chứng thử thách (dùng làm đối chứng âm); 2x IM, nhóm được chủng ngừa hai lần trong cơ; IN+IM, nhóm được chủng ngừa lần thứ nhất trong mũi và lần thứ hai trong cơ; 2X IN, nhóm được chủng ngừa hai lần trong mũi. Khoảng sai số thể hiện độ lệch chuẩn. Ngày nghiên cứu (Study days - SD) được nêu trong chú giải ở bên phải của đồ thị.

Fig. 38: Các kết quả từ thử nghiệm điểm hấp thụ miễn dịch được liên kết enzym

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

Fig. 39: Các kết quả từ thử nghiệm đốm hấp thụ miễn dịch được liên kết enzym đặc hiệu interferon gamma (IFN γ ELISpot). Tế bào đơn nhân máu ngoại vi (Peripheral blood mononuclear các tế bào PBMCs) được tinh chế từ máu được lấy từ động vật thử nghiệm vào ngày nghiên cứu 28 (SD28). Sau đó PBMC được kích thích lại bằng chủng thử thách IAV lợn H3N2 R452-14 ở tỷ lệ gây nhiễm là 1 (H3N2 MOI 1) hoặc bằng kháng nguyên H3 IAV lợn được biểu hiện tái tổ hợp mà tương đồng với H3 được biểu hiện bởi chủng vaccin rEHV-1 RacH-SE_B ở nồng độ là 1 μ g/ml (rH3 1 μ g/ml). Bằng cách sử dụng PBMC kích thích lại, thử nghiệm đốm hấp thụ miễn dịch được liên kết enzym đặc hiệu interferon gamma (IFN γ ELISpot) được thực hiện, và các giá trị thu được được chuẩn hóa với 10⁶ tế bào và được tính là giá trị trung bình tương ứng của từng nhóm. chall. ctrl., Nhóm đối chứng lây nhiễm (được sử dụng làm đối chứng âm); 2x IM, nhóm được chủng ngừa hai lần trong cơ; IN+IM, nhóm được chủng ngừa lần thứ nhất trong mũi và lần thứ hai trong cơ ; 2X IN, nhóm được chủng ngừa hai lần trong mũi. Khoảng sai số thể hiện độ lệch chuẩn.

Mô tả chi tiết sáng chế

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

Nhìn chung, sáng chế đề xuất trình tự khởi đầu/ trình tự axit nucleic điều hòa chứa 4pgG600 (SEQ ID No. 1) hoặc 4pMCP600 (SEQ ID No. 2) hoặc trình tự nucleotit hỗ trợ của nó hoặc mảnh chức năng hoặc dẫn xuất chức năng của nó hoặc trình tự nucleotit hỗ trợ của nó, trong đó trình tự khởi đầu đã nêu dẫn đến sự biểu hiện của trình tự nucleotit quan tâm, tốt hơn là gen quan tâm, tốt hơn nữa là trình tự mã hóa kháng nguyên.

Theo một khía cạnh cụ thể, mảnh chức năng hoặc dẫn xuất có chiều dài là 550 nucleotit, tốt hơn là 500, 490, 480, 470, 460, 455, 450, 445, 440, 435, 434, 433, 432, 431, 430 nucleotit, tốt nhất là 455 hoặc 430 nucleotit. Theo một khía cạnh khác mảnh chức năng hoặc dẫn xuất có chiều dài nằm trong khoảng từ 430 đến 550 nucleotit, 430 đến 500 nucleotit, hoặc 430 đến 480 nucleotit. Tốt hơn là mảnh chức năng có độ đồng nhất và/hoặc độ tương đồng về mặt trình tự hoặc độ đồng nhất về mặt trình tự là 70%, 80%, 85%, tốt hơn là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, tốt hơn nữa là 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%. Theo một khía cạnh cụ thể sự biểu hiện gia tăng.

Theo một khía cạnh cụ thể mảnh chức năng là phần cắt cụt của 4pgG600 (SEQ ID No. 1) hoặc trình tự nucleotit hỗ trợ của nó, tốt hơn là độ đồng nhất về mặt trình tự (ít nhất) là 72% trên toàn bộ chiều dài (hoặc cao hơn). Tốt hơn là, mảnh chức năng của 4pgG600 (SEQ ID No. 1) là mảnh có tên gọi p430 (SEQ ID NO:3). Theo một khía cạnh khác độ đồng nhất trình tự là (ít nhất là) 70%, 80%, 85%, tốt hơn là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, tốt hơn nữa là 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%.

Theo một khía cạnh cụ thể khác mảnh chức năng là đoạn cắt cụt của 4pMCP600 (SEQ ID No. 2) hoặc trình tự nucleotit hỗ trợ của nó, tốt hơn là độ đồng nhất về mặt trình tự (ít nhất) là 78% trên toàn bộ chiều dài (hoặc cao hơn). Tốt hơn là, mảnh chức năng của 4pMCP600 (SEQ ID No. 2) là mảnh có tên gọi p455 (SEQ ID NO:4). Theo một khía cạnh khác độ đồng nhất trình tự là (ít nhất là) 70%, 80%, 85%, tốt hơn là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, tốt hơn nữa là 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%.

Sáng chế cũng đề xuất trình tự khởi đầu/ trình tự axit nucleic điều hòa chứa p430

(SEQ ID No. 3) hoặc p455 (SEQ ID No. 4) hoặc trình tự nucleotit bổ trợ của nó hoặc mảnh chức năng hoặc dẫn xuất chức năng của nó hoặc trình tự nucleotit bổ trợ của nó, trong đó trình tự khởi đầu đã nêu dẫn đến sự biểu hiện của trình tự nucleotit quan tâm, tốt hơn là gen quan tâm, tốt hơn nữa là trình tự mã hóa kháng nguyên. Tốt hơn là mảnh chức năng có độ tương đồng về mặt trình tự hoặc độ đồng nhất về mặt trình tự là 70%, 80%, 85%, tốt hơn là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, tốt hơn nữa là 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%. Theo một khía cạnh cụ thể sự biểu hiện gia tăng.

Sáng chế cũng liên quan đến cat-xet biểu hiện chứa trình tự khởi đầu / trình tự axit nucleic điều hòa được chọn từ nhóm gồm: 4pgG600 (SEQ ID No. 1) và 4pMCP600 (SEQ ID No. 2) và trình tự nucleotit bổ trợ của nó và mảnh chức năng và dẫn xuất chức năng của nó và trình tự nucleotit bổ trợ của nó, và p430 (SEQ ID No. 3) và p455 (SEQ ID No. 4) và trình tự nucleotit bổ trợ của nó và mảnh chức năng của nó, và dẫn xuất chức năng của nó, và trình tự nucleotit bổ trợ của nó,

trong đó trình tự khởi đầu được liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự quan tâm, tốt hơn là gen quan tâm hoặc trình tự mã hóa kháng nguyên, tốt hơn nữa là trình tự quan tâm khác loài và/hoặc ngoại sinh, gen quan tâm hoặc trình tự mã hóa kháng nguyên,

trong đó trình tự khởi đầu / trình tự axit nucleic điều hòa dẫn đến sự biểu hiện của trình tự nucleotit quan tâm, tốt hơn là gen quan tâm, tốt hơn nữa là trình tự mã hóa kháng nguyên,

do đó trình tự khởi đầu này tốt hơn là trình tự khởi đầu / trình tự axit nucleic điều hòa khác loài, tốt hơn nữa là trình tự khởi đầu / trình tự axit nucleic điều hòa ngoại sinh. Theo một khía cạnh cụ thể sự biểu hiện gia tăng.

Theo một khía cạnh cụ thể cat-xet biểu hiện là cat-xet biểu hiện tái tổ hợp, khác loài và/hoặc ngoại sinh. Theo một khía cạnh cụ thể khác trình tự khởi đầu / trình tự axit nucleic điều hòa là trình tự khởi đầu / trình tự axit nucleic điều hòa tái tổ hợp, khác loài và/hoặc ngoại sinh.

Sáng chế cũng liên quan đến vector như vector virus hoặc cấu trúc virus chứa cat-

xet biểu hiện theo sáng chế. Tốt hơn là vectơ này hữu hiệu để sản xuất chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin.

Theo một khía cạnh khác sáng chế liên quan đến vectơ như vectơ virus hoặc cấu trúc virus chứa cat-xet biểu hiện chứa trình tự khởi đầu / trình tự axit nucleic điều hòa được chọn từ nhóm gồm: 4pgG600 (SEQ ID No. 1) và 4pMCP600 (SEQ ID No. 2) và trình tự nucleotit bổ trợ của nó và mảnh chức năng và dẫn xuất chức năng của nó và trình tự nucleotit bổ trợ của nó, và p430 (SEQ ID No. 3) và p455 (SEQ ID No. 4) và trình tự nucleotit bổ trợ của nó và mảnh chức năng của nó, và dẫn xuất chức năng của nó, và trình tự nucleotit bổ trợ của nó,

trong đó trình tự khởi đầu được liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự quan tâm, tốt hơn là gen quan tâm hoặc trình tự mã hóa kháng nguyên, tốt hơn nữa là trình tự quan tâm khác loài và/hoặc ngoại sinh, gen quan tâm hoặc trình tự mã hóa kháng nguyên,

trong đó trình tự khởi đầu / trình tự axit nucleic điều hòa dẫn đến sự biểu hiện của trình tự nucleotit quan tâm, tốt hơn là gen quan tâm, tốt hơn nữa là trình tự mã hóa kháng nguyên,

do đó trình tự khởi đầu này tốt hơn là trình tự khởi đầu / trình tự axit nucleic điều hòa khác loài, tốt hơn nữa là trình tự khởi đầu / trình tự axit nucleic điều hòa ngoại sinh. Theo một khía cạnh cụ thể sự biểu hiện gia tăng. Tốt hơn là vectơ này hữu hiệu để sản xuất chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin.

Sáng chế cũng liên quan đến vectơ (biểu hiện) khác loài như vectơ virus hoặc plasmit để chủng ngừa ADN chứa axit nucleic điều hòa/ trình tự khởi đầu chứa 4pgG600 (SEQ ID No. 1) và/hoặc 4pMCP600 (SEQ ID No. 2) hoặc trình tự nucleotit bổ trợ của nó hoặc mảnh chức năng hoặc dẫn xuất chức năng của nó hoặc trình tự nucleotit bổ trợ của nó, hoặc p430 (SEQ ID No. 3) và/hoặc p455 (SEQ ID No. 4) hoặc trình tự nucleotit bổ trợ của nó hoặc mảnh chức năng của nó, hoặc dẫn xuất chức năng của nó, hoặc trình tự nucleotit bổ trợ của nó, trong đó axit nucleic điều hòa/ trình tự khởi đầu này dẫn đến sự phiên mã hoặc sự biểu hiện của trình tự quan tâm, gen quan tâm, hoặc trình tự mã hóa kháng nguyên. Theo một khía cạnh cụ thể sự phiên mã hoặc sự biểu hiện của trình

tự quan tâm, gen quan tâm, hoặc trình tự mã hóa kháng nguyên là tăng. Tốt hơn là vector này hữu hiệu để sản xuất chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin.

Theo một khía cạnh cụ thể, vector này là vector tái tổ hợp, khác loài và/hoặc ngoại sinh. Theo một khía cạnh cụ thể khác trình tự khởi đầu / trình tự axit nucleic điều hòa là trình tự khởi đầu / trình tự axit nucleic điều hòa tái tổ hợp, khác loài và/hoặc ngoại sinh.

Theo một khía cạnh cụ thể của cat-xet biểu hiện theo sáng chế và/hoặc của vector theo sáng chế, mảnh chức năng hoặc dẫn xuất (của trình tự khởi đầu / trình tự axit nucleic điều hòa) có độ tương đồng về mặt trình tự hoặc độ đồng nhất về mặt trình tự là 70%, 80%, 85%, tốt hơn là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, tốt hơn nữa là 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%.

Theo một khía cạnh cụ thể khác của cat-xet biểu hiện theo sáng chế và/hoặc của vector theo sáng chế, mảnh chức năng hoặc dẫn xuất (của trình tự khởi đầu / trình tự axit nucleic điều hòa) có chiều dài là 550 nucleotit, tốt hơn là 500, 490, 480, 470, 460, 455, 450, 445, 440, 435, 434, 433, 432, 431, 430 nucleotit, tốt nhất là 455 hoặc 430 nucleotit. Theo một khía cạnh cụ thể khác của cat-xet biểu hiện theo sáng chế và/hoặc của vector theo sáng chế, mảnh chức năng hoặc dẫn xuất (của trình tự khởi đầu / trình tự axit nucleic điều hòa) có chiều dài nằm trong khoảng từ 430 đến 550 nucleotit, 430 đến 500 nucleotit, hoặc 430 đến 480 nucleotit. Theo một khía cạnh cụ thể khác nữa của cat-xet biểu hiện theo sáng chế và/hoặc của vector theo sáng chế, mảnh chức năng hoặc dẫn xuất (của trình tự khởi đầu / trình tự axit nucleic điều hòa) có độ tương đồng về mặt trình tự hoặc độ đồng nhất về mặt trình tự là 70%, 80%, 85%, tốt hơn là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, tốt hơn nữa là 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%.

Theo một khía cạnh cụ thể khác của cat-xet biểu hiện theo sáng chế và/hoặc của vector theo sáng chế, mảnh chức năng hoặc dẫn xuất (của trình tự khởi đầu / trình tự axit nucleic điều hòa) là đoạn cắt cụt của 4pgG600 (SEQ ID No. 1) hoặc trình tự nucleotit bổ trợ của nó, tốt hơn là độ đồng nhất về mặt trình tự là (ít nhất là) 72% trên toàn bộ chiều dài (hoặc cao hơn). Tốt hơn là, mảnh chức năng của 4pgG600 (SEQ ID No. 1) là mảnh có tên gọi p430 (SEQ ID NO:3).

Theo một khía cạnh cụ thể khác của cat-xet biểu hiện theo sáng chế và/hoặc của vectơ theo sáng chế, mảnh chức năng hoặc dẫn xuất (của trình tự khởi đầu / trình tự axit nucleic điều hòa) là đoạn cắt cụt của 4pMCP600 (SEQ ID No. 2) hoặc trình tự nucleotit bổ trợ của nó, tốt hơn là độ đồng nhất về mặt trình tự là (ít nhất là) 78% trên toàn bộ chiều dài (hoặc cao hơn). Tốt hơn là, mảnh chức năng của 4pMCP600 (SEQ ID No. 2) là mảnh có tên gọi p455 (SEQ ID NO:4).

Theo một khía cạnh cụ thể khác của cat-xet biểu hiện theo sáng chế và/hoặc của vectơ theo sáng chế, cat-xet biểu hiện và/hoặc vectơ này bao gồm một hoặc nhiều trình tự điều hòa khác như tín hiệu kết thúc, tín hiệu polyadenyl hóa hoặc yếu tố điều hòa như IRES và/hoặc peptit 2a.

Theo một khía cạnh cụ thể vectơ theo sáng chế là vectơ khác loài và/hoặc ngoại sinh.

Theo một khía cạnh cụ thể khác của sáng chế vectơ theo sáng chế là vectơ virus, tốt hơn là được chọn từ nhóm gồm herpes viridae như Equid Alphaherpesvirus 1 (EHV-1), Equid Alphaherpesvirus 4 (EHV-4) và các Varicellovirus khác như Suid Alphaherpesvirus 1 (virus Pseudorabies, PrV) và Bovine Alphaherpesvirus 1 (Bovine Herpesvirus 1, BHV-1), Adenoviridae (AdV) như CAdV (Canine Adenovirus), viridae có liên quan đến Adeno, Baculoviridae, Lentiviridae như Retroviruses, và Poxviridae. Theo một khía cạnh cụ thể hơn vectơ virus này là thành phần thuộc họ Herpesviridae, tốt hơn là thuộc chi Alphaherpesvirinae, tốt hơn nữa là thuộc phân chi Varicellovirus, tốt nhất là vectơ này là Equid Alphaherpesvirus 1 (EHV-1).

Sáng chế cũng liên quan đến phương pháp sản xuất vectơ, tốt hơn là vectơ virus, bao gồm các bước:

- a. Tạo ra trình tự khởi đầu và/hoặc trình tự axit nucleic điều hòa theo sáng chế,
- b. Hợp nhất trình tự khởi đầu đã nêu ở bước a) vào bộ khung vectơ có nguồn gốc từ virus, mà được chọn từ nhóm gồm: *Herpesviridae* như EHV-1, EHV-4, Varicelloviruses như Suid Alphaherpesvirus 1 (Pseudorabies virus, PrV) và Bovine Alphaherpesvirus 1 (Bovine Herpesvirus 1, BHV-1), *Adenoviridae* (AdV) như CAdV

(Canine Adenovirus), Parvoviridae như virus có liên quan đến Adeno, *Baculoviridae*, *Retroviridae*, và *Poxviridae*, tốt hơn là bộ khung vector này có nguồn gốc từ virus herpes, tốt hơn nữa là bộ khung vector này là EHV-1 hoặc EHV-4.

Sáng chế cũng liên quan đến dòng tế bào chủ sinh vật nhân chuẩn, đặc trưng ở chỗ nó cho phép sự sao chép của vector theo sáng chế, tốt hơn là dòng tế bào chủ này là dòng tế bào động vật có vú hoặc dòng tế bào côn trùng, tốt nhất là dòng tế bào chủ này là dòng tế bào PK/WRL, dòng tế bào RK13, dòng tế bào MDBK, dòng tế bào ST, dòng tế bào AI-ST, dòng tế bào VERO, dòng tế bào Sf9, Sf21, dòng tế bào Sf plus, dòng tế bào MDCK, và/hoặc dẫn xuất của nó.

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

- a. Gây nhiễm dòng tế bào chủ sinh vật nhân chuẩn theo điểm 21 bằng vector theo các điểm từ 9 đến 19,
- b. nuôi cấy tế bào đã gây nhiễm trong điều kiện thích hợp,
- c. tùy ý thu nhận tế bào chủ nêu trên.

Các dòng tế bào chủ động vật có vú như được liệt kê trên đây thường được nuôi cấy trong bình nuôi cấy mô bằng nhựa được nhúng chìm trong môi trường để nuôi cấy tế bào động vật có vú như môi trường thiết yếu tối thiểu (Minimal Essential Medium - MEM) được bổ sung với muối của Earle và huyết thanh bào thai bò. Các dòng tế bào động vật có vú được giữ trong tủ ủ ở 37°C trong môi trường khí quyển thông thường được bổ sung với 5% CO₂ và độ ẩm khoảng 80%. Dòng tế bào côn trùng được nuôi cấy trong bình nuôi cấy mô bằng nhựa được nhúng chìm trong môi trường nuôi cấy tế bào côn trùng và được giữ ở 27°C trong môi trường khí quyển thông thường trong tủ ủ”.

Sáng chế cũng liên quan đến việc sử dụng trình tự axit nucleic chứa 4pgG600 (SEQ ID No. 1) hoặc 4pMCP600 (SEQ ID No. 2) hoặc trình tự nucleotit bổ trợ của nó hoặc mảnh chức năng hoặc dẫn xuất chức năng của nó hoặc trình tự nucleotit bổ trợ của nó, làm trình tự khởi đầu, trong đó trình tự axit nucleic này dẫn đến sự biểu hiện của trình tự nucleotit quan tâm, tốt hơn là gen quan tâm, tốt hơn nữa là trình tự mã hóa kháng nguyên. Theo một khía cạnh cụ thể sự biểu hiện gia tăng.

Sáng chế cũng liên quan đến việc sử dụng trình tự axit nucleic chứa 4pgG600 (SEQ ID No. 1) hoặc 4pMCP600 (SEQ ID No. 2) hoặc trình tự nucleotit bổ trợ của nó hoặc mảnh chức năng hoặc dẫn xuất chức năng của nó hoặc trình tự nucleotit bổ trợ của nó, làm trình tự axit nucleic điều hòa, trong đó trình tự axit nucleic này dẫn đến sự biểu hiện của trình tự nucleotit quan tâm, tốt hơn là gen quan tâm, tốt hơn nữa là trình tự mã hóa kháng nguyên. Theo một khía cạnh cụ thể sự biểu hiện gia tăng.

Sáng chế cũng liên quan đến việc sử dụng trình tự axit nucleic chứa p430 (SEQ ID No. 3) hoặc p455 (SEQ ID No. 4) hoặc trình tự nucleotit bổ trợ của nó hoặc mảnh chức năng hoặc dẫn xuất chức năng của nó hoặc trình tự nucleotit bổ trợ của nó, làm trình tự khởi đầu, trong đó trình tự axit nucleic này dẫn đến sự biểu hiện của trình tự nucleotit quan tâm, tốt hơn là gen quan tâm, tốt hơn nữa là trình tự mã hóa kháng nguyên. Theo một khía cạnh cụ thể sự biểu hiện gia tăng.

Sáng chế cũng liên quan đến việc sử dụng trình tự axit nucleic chứa p430 (SEQ ID No. 3) hoặc p455 (SEQ ID No. 4) hoặc trình tự nucleotit bổ trợ của nó hoặc mảnh chức năng hoặc dẫn xuất chức năng của nó hoặc trình tự nucleotit bổ trợ của nó, làm trình tự axit nucleic điều hòa, trong đó trình tự axit nucleic này dẫn đến sự biểu hiện của trình tự nucleotit quan tâm, tốt hơn là gen quan tâm, tốt hơn nữa là trình tự mã hóa kháng nguyên. Theo một khía cạnh cụ thể sự biểu hiện gia tăng.

Sáng chế cũng liên quan đến kit chứa vector theo sáng chế, (các) tế bào chủ, tùy ý (các) tác nhân chuyển nhiễm, và tờ hướng dẫn sử dụng.

Sáng chế cũng liên quan đến việc sử dụng vector theo sáng chế hoặc dòng tế bào chủ sinh vật nhân chuẩn theo sáng chế hoặc tế bào chủ sinh vật nhân chuẩn theo sáng chế để sản xuất chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vacxin, tùy ý bằng cách sử dụng M.O.I. bằng từ 0,01 đến 0,001.

Đặc biệt là, để sử dụng vector virus, dòng tế bào chủ động vật có vú thường được nuôi cấy và được sinh trưởng để hợp dòng hoặc hợp dòng phụ tùy thuộc vào dòng tế bào. Vector virus được kết hợp với lượng thích hợp môi trường nuôi cấy sạch và được pha loãng để tạo ra tỷ lệ gây nhiễm (multiplicity of infection - m.o.i.) từ 0,001 đến 0,01. Môi trường nuôi cấy tế bào được loại bỏ từ các tế bào chủ và được thay bằng môi trường chứa vector virus đã pha loãng. Dịch nuôi cấy tế bào đã chủng này được ủ ở 37°C/5%

CO₂ trong khoảng 2 đến 4 ngày tùy thuộc vào dòng tế bào. Sự sao chép của vectơ virus trong các tế bào tạo ra tác động gây bệnh tế bào (cytopathic effect - CPE) và cuối cùng phá hủy và làm chết các tế bào. Nguyên liệu được thu hồi và được bảo quản ở -80°C. Độ chuẩn virus được xác định.

Sáng chế cũng liên quan đến chế phẩm sinh miễn dịch chứa

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

Theo một khía cạnh cụ thể chế phẩm sinh miễn dịch này chứa virus. Theo một khía cạnh cụ thể khác chế phẩm sinh miễn dịch này chứa virus lây nhiễm.

Sáng chế cũng liên quan đến vacxin hoặc được phẩm chứa

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

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

- a. gây nhiễm dòng tế bào chủ động vật có nhân chuẩn theo sáng chế bằng vectơ theo sáng chế,
- b. nuôi cấy tế bào đã gây nhiễm trong điều kiện thích hợp,
- c. thu nhận tế bào đã gây nhiễm và/hoặc vectơ và/hoặc các thành phần virus,
- d. tùy ý tinh chế phần đã thu nhận ở bước c)
- e. trộn lẫn phần đã thu nhận này với chất mang được dụng.

Phương pháp điều trị

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

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp gây miễn dịch cho động vật như động vật sản xuất thực phẩm bao gồm việc cho động vật sản xuất thực phẩm này dùng chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin như được mô tả trong bản mô tả này.

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

Theo một khía cạnh cụ thể, việc gây miễn dịch dẫn đến làm giảm tỷ lệ mắc phải sự nhiễm virus đặc thù trong đàn hoặc dẫn đến làm giảm mức độ nghiêm trọng của các dấu hiệu lâm sàng gây ra bởi hoặc có liên quan đến nhiễm virus đặc thù.

Ngoài ra, việc gây miễn dịch cho động vật sản xuất thực phẩm có nhu cầu bằng chế phẩm sinh miễn dịch như được đề cập ở đây, dẫn đến việc phòng ngừa sự lây nhiễm virus cho động vật sản xuất thực phẩm. Thậm chí tốt hơn nữa là, việc gây miễn dịch dẫn đến đáp ứng miễn dịch hiệu quả, kéo dài, chống lại sự nhiễm virus đã nêu. Sẽ được hiểu rằng, quãng thời gian nêu trên sẽ kéo dài trên 2 tháng, tốt hơn trên 3 tháng, tốt hơn nữa trên 4 tháng, tốt hơn nữa trên 5 tháng, tốt hơn nữa trên 6 tháng. Cần hiểu rằng, việc gây miễn dịch không thể có hiệu quả ở tất cả các động vật / đối tượng gây miễn dịch. Tuy nhiên, thuật ngữ này đòi hỏi rằng một phần đáng kể động vật/đối tượng trong đàn được gây miễn dịch một cách hiệu quả.

Sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa các triệu chứng lâm sàng gây ra bởi virus ở động vật như động vật sản xuất thực phẩm cần điều trị hoặc phòng ngừa, phương pháp này bao gồm bước cho động vật dùng lượng có tác dụng điều trị bệnh của chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vacxin như được mô tả trong bản mô tả này.

Tốt hơn là, các triệu chứng lâm sàng được giảm ít nhất là 50%, còn tốt hơn nữa là khoảng ít nhất là 60%, còn tốt hơn nữa là ít nhất là 70%, còn tốt hơn nữa là ít nhất là 80%, còn tốt hơn nữa là ít nhất là 90%, vẫn còn tốt hơn nữa là ít nhất là 95% tốt nhất là 100% so với động vật không được điều trị (không được chủng ngừa) nhưng sau đó bị nhiễm virus cúm A đặc thù ở lợn.

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

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

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

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

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

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

Các định nghĩa sinh học phân tử

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

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

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

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

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

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

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

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

Theo khía cạnh cụ thể của sáng chế, thuật ngữ “vector virus” hoặc theo cách khác là “cấu trúc virus” đề cập đến cấu trúc virus tái tổ hợp thu được từ virus, mà được chọn từ các họ *Herpesviridae* như EHV-1, EHV-4 hoặc Suid Alphaherpesvirus 1 giống Varicellovirus (Pseudorabies virus, PrV) và Bovine Alphaherpesvirus 1 (Bovine Herpesvirus 1, BHV-1), *Adenoviridae* (AdV) như CAdV (Canine Adenovirus, van Regenmortel et al.), virus có liên quan đến Adeno giống Parvoviridae, *Baculoviridae*, *Retroviridae*, hoặc *Poxviridae*. (<http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp> Virus Taxonomy: 2015 Release EC 47, London, UK, July 2015; Email ratification 2016 (MSL #30). Các vector virus được ưu tiên bao gồm vector virus herpes như thu được từ EHV-1 hoặc EHV-4 hoặc các Varicellovirus khác như PrV (virus Pseudorabies) hoặc BHV-1 (Bovine Alphaherpesvirus 1).

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

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

Thuật ngữ “plasmid” đề cập đến ADN tế bào chất mà sao chép độc lập với nhiễm sắc thể vi khuẩn trong tế bào chủ vi khuẩn. Theo một khía cạnh cụ thể của sáng chế thuật ngữ “plasmid” và/hoặc “plasmid chuyển” đề cập đến thành phần của kỹ thuật ADN tái tổ hợp có thể sử dụng để tạo cấu trúc ví dụ cat-xet biểu hiện để cài xen vào trong vector virus. Theo khía cạnh cụ thể khác thuật ngữ “plasmid” có thể được sử dụng để chỉ plasmid có thể sử dụng cho mục đích chủng ngừa ADN.

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

Thuật ngữ “axit nucleic”, “trình tự axit nucleic”, “trình tự nucleotit”, “polynucleotit”, “trình tự polynucleotit”, “trình tự ARN”, hoặc “trình tự ADN” như được sử dụng trong bản mô tả này đề cập đến oligonucleotit, nucleotit hoặc

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

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

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

"Vị trí nội nhập ribosom bên trong" hoặc "IRES" mô tả trình tự có chức năng thúc đẩy sự khởi đầu dịch mã độc lập với đầu 5' của gen của IRES và cho phép hai xistron (khung đọc mở) được dịch mã từ một bản phiên mã trong tế bào động vật. IRES tạo ra vị trí nội nhập ribosom độc lập cho việc dịch mã của khung đọc mở ngay xuôi dòng của nó. Không giống như mARN vi khuẩn có thể là đa xistron, tức là mã hóa cho một vài polypeptit khác nhau mà được dịch mã lần lượt từ mARN, hầu hết các mARN của tế bào động vật là đơn xistron và mã hóa chỉ để tổng hợp một polypeptit. Với sản

phẩm phiên mã đa xistron trong tế bào nhân chuẩn, việc dịch mã bắt đầu từ điểm khởi đầu dịch mã ở đầu 5', kết thúc ở codon kết thúc thứ nhất, và sản phẩm phiên mã sẽ được giải phóng khỏi ribosom, dẫn đến việc dịch mã của polypeptit được mã hóa thứ nhất trong mARN. Trong tế bào nhân chuẩn, sản phẩm phiên mã đa xistron có IRES được liên kết theo kiểu hoạt động được với khung đọc mở thứ hai hoặc tiếp theo trong sản phẩm phiên mã cho phép việc dịch mã lần lượt của khung đọc mở xuôi dòng để tạo ra hai hay nhiều polypeptit được mã hóa bởi cùng một sản phẩm phiên mã. IRES có thể có chiều dài khác nhau và từ nhiều nguồn khác nhau, ví dụ virus Encephalomyocarditis (EMCV), picornavirus (ví dụ virus bệnh chân tay miệng, FMDV hoặc virus Polio (PV), hoặc virus viêm gan C (HCV). Các trình tự IRES khác nhau và việc sử dụng chúng trong tạo cấu trúc vectơ đã được mô tả và đã được biết rõ trong lĩnh vực này. Trình tự mã hóa xuôi chiều được liên kết theo kiểu hoạt động được với đầu 3' của IRES ở khoảng cách bất kỳ mà sẽ không gây ảnh hưởng bất lợi cho sự biểu hiện của gen xuôi chiều. Khoảng cách tối ưu hoặc cho phép giữa IRES và bắt đầu của gen xuôi dòng có thể được xác định dễ dàng bằng cách thay đổi khoảng cách và đo sự biểu hiện ở dạng hàm của khoảng cách.

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

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “trình tự khởi đầu” hoặc “trình tự khởi đầu” có nghĩa là trình tự nucleotit cho phép sự gắn kết của ARN polymeraza và dẫn hướng sự phiên mã của gen. Thông thường, trình tự khởi đầu được nằm trong vùng không mã hóa 5' của gen, gần với vị trí khởi đầu phiên mã của gen. Các trình tự thành phần trong trình tự khởi đầu mà có chức năng khởi đầu phiên mã thường được mô tả đặc điểm bằng trình tự nucleotit liên ứng. Các ví dụ về trình tự khởi đầu bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, trình tự khởi đầu từ vi khuẩn, nấm men, thực vật, virus, và động vật như động vật có vú (bao gồm ngựa, lợn, trâu bò và người), chim hoặc côn trùng.

trình tự khởi đầu có thể cảm ứng, kiểm chế và/hoặc mặc định. Trình tự khởi đầu cảm ứng bắt đầu tăng mức độ phiên mã từ ADN dưới sự kiểm soát của chúng để đáp ứng với một số thay đổi trong điều kiện nuôi cấy, như thay đổi nhiệt độ (Ptashne, 2014). Các ví dụ về trình tự khởi đầu đã được người có kỹ năng trung bình trong lĩnh vực này biết rõ là ví dụ gen cực sớm 1 SV40 lớn T, HCMV và MCMV, trình tự khởi đầu alpha yếu tố kéo dài của người, trình tự khởi đầu polyhedrin của baculovirus.

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

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

Thuật ngữ “yếu tố tăng cường” để chỉ trình tự polynucleotit mà ở vị trí *cis* tác động lên hoạt tính của trình tự khởi đầu và vì thế kích thích sự phiên mã của gen hoặc trình tự mã hóa được liên kết về mặt chức năng với trình tự khởi đầu. Không giống như trình tự khởi đầu, tác động của yếu tố tăng cường độc lập với vị trí và hướng vì thế chúng có thể nằm trước hoặc nằm sau đơn vị phiên mã, trong intron hoặc thậm chí trong vùng mã hóa. Yếu tố tăng cường có thể được đặt cả trong vùng ngay gần đơn vị phiên

mã và ở một khoảng cách đáng kể so với trình tự khởi đầu. Nó cũng có thể có các đoạn trùng lặp về mặt vật lý và chức năng với trình tự khởi đầu. Người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực sẽ biết được một số yếu tố tăng cường từ các nguồn khác nhau (và được nộp lưu trong kho dữ liệu như GenBank, ví dụ yếu tố tăng cường SV40, yếu tố tăng cường CMV, yếu tố tăng cường polyoma, yếu tố tăng cường adenovirut) có sẵn dưới dạng các yếu tố độc lập hoặc các yếu tố được tạo dòng trong các trình tự polynucleotit (ví dụ được nộp lưu ở ATCC hoặc từ các nguồn thương mại hoặc cá nhân). Nhiều trình tự khởi đầu cũng chứa trình tự tăng cường như trình tự khởi đầu CMV thường được sử dụng. Yếu tố tăng cường CMV của người là một trong các yếu tố tăng cường mạnh nhất được xác định cho đến nay. Một ví dụ về yếu tố tăng cường cảm ứng là yếu tố tăng cường metallothionein, mà có thể được kích thích bằng glucocorticoid hoặc kim loại nặng.

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

Các thuật ngữ “gen”, “gen quan tâm”, như được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa giống nhau và để chỉ trình tự polynucleotit có chiều dài bất kỳ mã hóa sản phẩm quan tâm. Gen có thể còn chứa trình tự điều hòa trước (trình tự 5' không mã hóa hoặc không dịch mã) và sau (trình tự 3' không mã hóa hoặc không dịch mã) trình tự mã hóa. Trình tự được chọn có thể có chiều dài đầy đủ hoặc bị cắt, dung hợp hoặc gen được gắn thể, và có thể là ADN bổ trợ, ADN hệ gen, hoặc mảnh ADN. Thường hiểu rằng ADN hệ gen mã hóa cho polypeptit hoặc ARN có thể bao gồm vùng không mã hóa (tức là intron) mà được cắt từ ARN thông tin trưởng thành (mARN) và vì thế không có mặt trong ADN bổ trợ mã hóa cho cùng polypeptit hoặc ARN. Nó có thể là trình tự tự nhiên, tức là (các) dạng xuất hiện trong tự nhiên, hoặc có thể bị đột biến, hoặc chứa các trình tự thu được từ các nguồn khác nhau hoặc được cải biến nếu muốn. Các cải biến bao gồm tối ưu hóa codon để tối ưu hóa việc sử dụng codon trong tế bào chủ được chọn

hoặc gắn thẻ. Ngoài ra chúng có thể bao gồm việc bớt hoặc thêm các vị trí tác động *cis* như vị trí cung cấp cắt nối (ấn), vị trí tiếp nhận và các điểm nhánh, tín hiệu polyadenyl hóa, hộp TATA, vị trí chi, vị trí nội nhập ribosom, trình tự lặp, cấu trúc bậc hai (ví dụ thân vòng), vị trí gắn kết cho yếu tố phiên mã hoặc các yếu tố điều hòa khác, vị trí enzyme giới hạn được nêu chỉ là một vài ví dụ không phải giới hạn. Trình tự được chọn có thể mã hóa polypeptit được tiết, tế bào chất, nhân, gắn kết màng hoặc bề mặt tế bào.

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

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

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

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

Thuật ngữ “cat-xet biểu hiện” hoặc “đơn vị phiên mã” hoặc “đơn vị biểu hiện” để chỉ vùng trong vectơ, cấu trúc hoặc trình tự polynucleotit chứa một hoặc nhiều gen

được dịch mã, trong đó các trình tự nucleotit mã hóa (các) gen được dịch mã cũng như các trình tự polynucleotit bao gồm yếu tố điều hòa được chứa trong cat-xet biểu hiện được liên kết theo kiểu hoạt động được với nhau. Chúng được dịch mã từ trình tự khởi đầu và quá trình phiên mã được kết thúc bằng ít nhất một tín hiệu polyadenyl hóa. Theo một khía cạnh cụ thể, chúng được dịch mã từ một trình tự khởi đầu đơn lẻ. Kết quả là các gen khác nhau được liên kết về mặt dịch mã. Nhiều hơn một protein hoặc sản phẩm có thể được dịch mã và được biểu hiện từ mỗi đơn vị phiên mã (đơn vị phiên mã nhiều xistron). Mỗi đơn vị phiên mã sẽ bao gồm yếu tố điều hòa cần cho quá trình phiên mã và dịch mã của trình tự được chọn bất kỳ mà được chứa trong đơn vị này. Và mỗi đơn vị phiên mã có thể chứa các yếu tố điều hòa giống hoặc khác nhau. Ví dụ, mỗi đơn vị phiên mã có thể chứa cùng yếu tố kết thúc, yếu tố IRES hoặc intron có thể được sử dụng cho việc liên kết về mặt chức năng của các gen trong đơn vị phiên mã. Vector hoặc trình tự polynucleotit có thể chứa nhiều hơn một đơn vị phiên mã.

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

Sự tăng biểu hiện, độ chuẩn hoặc năng suất có thể đạt được bằng cách sử dụng vectơ khác loại theo sáng chế. Việc này có thể được kết hợp với các phương pháp khác như chọn lọc FACS hỗ trợ tế bào chủ tái tổ hợp chứa, dưới dạng đầu chuẩn chọn lọc bổ sung, một hoặc nhiều protein huỳnh quang (ví dụ GFP) hoặc đầu chuẩn tế bào. Các phương pháp khác để đạt được sự biểu hiện tăng, và tổ hợp của các phương pháp khác nhau cũng có thể được sử dụng, được dựa trên ví dụ việc sử dụng yếu tố hoạt tính cis để thao tác cấu trúc chất nhiễm sắc (ví dụ LCR, UCOE, EASE, chất phân lập, S/MARs, các yếu tố STAR), việc sử dụng yếu tố phiên mã nhân tạo, xử lý tế bào bằng các chất tự nhiên hoặc tổng hợp để điều hòa tăng sự biểu hiện gen nội sinh hoặc khác loài và/hoặc ngoại sinh, cải thiện độ ổn định (thời gian bán hủy) của mRNA hoặc protein, cải thiện sự khởi đầu dịch mã mRNA, tăng liều lượng gen bằng việc sử dụng plasmid episom (dựa trên việc sử dụng trình tự virus làm trình tự khởi đầu sao chép, ví dụ SV40, polyoma, adenovirus, EBV hoặc BPV), việc sử dụng trình tự thúc đẩy khuếch đại hoặc hệ thống khuếch đại in vitro trên cơ sở các chuỗi khuôn ADN.

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

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

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

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

polyadenyl hóa.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

nếu nó được nằm ở đầu 3' của trình tự mã hóa theo cách mà sự phiên mã diễn ra suốt trình tự mã hóa thành tín hiệu polyadenyl hóa. Việc nối được thực hiện bằng phương pháp tái tổ hợp đã biết trong lĩnh vực, ví dụ bằng cách nối ở vị trí giới hạn thích hợp hoặc đầu tù hoặc bằng cách sử dụng phương pháp PCR dung hợp. Phần tử liên kết hoặc trình tự thích ứng oligonucleotit tổng hợp có thể được sử dụng theo thực hành thông thường nếu vị trí giới hạn thích hợp không có mặt.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Các trình tự protein hoặc các trình tự axit nucleic theo sáng chế còn có thể được sử dụng làm "trình tự truy vấn" để thực hiện tra cứu đối với các cơ sở dữ liệu công khai, ví dụ, để nhận diện các thành viên của họ khác hoặc các trình tự liên quan. Các tra cứu như vậy có thể được thực hiện nhờ sử dụng các chương trình BLASTN và BLASTP (version 2.0) của tác giả Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. Tra cứu protein BLAST có thể được thực hiện bằng chương trình BLASTP, điểm ghi = 50, độ dài từ = 3 để thu được các trình tự axit amin tương đồng với các phân tử protein theo sáng chế. Để thu được sự sắp xếp thẳng hàng có khoảng hở cho các mục đích so sánh, chương trình Gapped BLAST có thể được sử dụng như được mô tả trong tài liệu của tác giả Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25(17): 3389-3402. Khi sử dụng các chương

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

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

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

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

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

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

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

Thuật ngữ “CAV” hoặc “CAV2” hoặc “CAV-2” dùng để chỉ adenovirus typ 2 ở chó, thành phần thuộc chi *Mastadenovirus* thuộc họ *Adenoviridae*. Trước đây, thuật ngữ Canine adenovirus 1 (CAV-1 hoặc CAV1) và Canine adenovirus 2 (CAV-2 hoặc CAV2) được sử dụng để chỉ 2 loài *Mastadenoviruses* khác nhau. Tuy nhiên, theo nguyên tắc phân loại mới nhất

(<http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp> Virus Taxonomy: 2015 Release EC 47, London, UK, July 2015; Email ratification 2016 (MSL #30) thuật ngữ Canine adenovirus (CAV) hiện bao hàm cả các loài CAV-2 và CAV-1.

Thuật ngữ “được cài xen vào trong ORF70” có nghĩa là mảnh ADN được cài xen vào trong ADN hệ gen ở vị trí mã hóa khung đọc mở 70 của Equid herpesvirus 1. Theo một khía cạnh cụ thể của sáng chế, việc cài xen đề cập đến việc dẫn đến việc xóa 801 cặp bazơ ở đầu 5’ của ORF70 để lại 423 bp còn lại của đầu 3’ nguyên vẹn nhưng làm mất sự biểu hiện của sản phẩm gen orf70 glycoprotein G. Glycoprotein G của một vài Alphaherpesviruses bao gồm EHV-1 đã thể hiện là được tiết ra từ tế bào bị nhiễm và có chức năng làm protein điều biến miễn dịch bằng cách gắn kết xytokin tiền viêm. Việc làm mất sự biểu hiện của nó trong vector virus có thể làm tăng tính sinh miễn dịch của việc nhiễm virus so với EHV-1 kiểu đại có sự biểu hiện glycoprotein G nguyên vẹn.

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

Các định nghĩa vaccin

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

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

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

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

Thuật ngữ “vacxin” như được sử dụng trong bản mô tả này đề cập đến được phẩm chứa ít nhất một thành phần có hoạt tính miễn dịch mà cảm ứng đáp ứng miễn dịch ở động vật và có thể nhưng không nhất thiết một hoặc nhiều thành phần bổ sung mà tăng cường hoạt tính miễn dịch của thành phần hoạt tính. Vacxin có thể còn chứa các thành phần khác thường có trong dược phẩm. Bằng cách phân biệt thành phần có hoạt tính miễn dịch của vacxin có thể chứa các hạt virus hoàn chỉnh ở dạng ban đầu của chúng hoặc là các hạt bị giảm độc lực được gọi là vacxin sống được cải biến (MLV) hoặc các hạt bị bất hoạt bằng các phương pháp thích hợp trong vacxin chết (KV). Ở dạng khác thành phần có hoạt tính miễn dịch của vacxin có thể bao gồm các yếu tố thích hợp của sinh vật (vacxin dưới đơn vị) nhờ đó các yếu tố này được tạo ra bằng cách phân hủy hạt hoàn chỉnh hoặc môi trường tăng trưởng chứa các hạt này và tùy ý các bước tinh chế lần lượt thu được (các) cấu trúc mong muốn, hoặc bằng các quy trình tổng hợp bao gồm thao tác thích hợp bằng cách sử dụng hệ thống thích hợp trên cơ sở, ví dụ, vi khuẩn, côn trùng, động vật có vú, hoặc các loài khác cộng với các quy trình tách và tinh chế tiếp theo tùy ý, hoặc bằng cách cảm ứng quá trình tổng hợp ở động vật cần vacxin bằng cách kết hợp trực tiếp vật liệu di truyền bằng cách sử dụng dược phẩm thích hợp (chủng ngừa polynucleotit). Vacxin có thể bao gồm một hoặc đồng thời nhiều hơn một trong các yếu tố được mô tả ở trên. Như được sử dụng trong các khía cạnh cụ thể của sáng chế “vacxin” đề cập đến vacxin sống hoặc virus sống, còn gọi là vacxin tái tổ hợp. Theo một khía cạnh cụ thể khác của sáng chế “vacxin” đề cập đến virus bất hoạt hoặc chết bao gồm các hạt giống virus (virus like particle - VLP). Vì thế, vacxin có thể là vacxin dưới đơn vị hoặc vacxin chết (KV) hoặc bất hoạt.

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

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

Đã biết các phương pháp vật lý và hóa học khác nhau để bất hoạt trong lĩnh vực này. Thuật ngữ “đã bất hoạt” chỉ virus hoặc vi khuẩn có độc tính hoặc không có độc tính

trước đó mà đã được chiếu xạ (cực tím (UV), tia X, chùm tia điện tử hoặc bức xạ gama), gia nhiệt, hoặc xử lý hóa học để bất hoạt hoặc tiêu diệt virus hoặc vi khuẩn này, trong khi vẫn giữ được tính sinh miễn dịch của nó. Các tác nhân bất hoạt thích hợp bao gồm beta-propiolacton, binary hoặc beta- hoặc axetyl-etylenimin, gluteraldehyt, ozon, và formalin (formaldehyt).

Để bất hoạt bằng formalin hay formaldehyt, formaldehyt thường được trộn với nước và rượu metylic để tạo ra formalin. Việc bổ sung rượu metylic ngăn chặn sự thoái hóa hoặc phản ứng chéo trong quá trình hoạt hóa. Một phương án sử dụng khoảng 0,1 đến 1% của dung dịch formaldehyt 37% để bất hoạt virus hoặc vi khuẩn. Điều quan trọng là phải điều chỉnh lượng formalin để đảm bảo vật liệu bị bất hoạt nhưng không nhiều đến mức xảy ra các tác dụng phụ do liều lượng cao.

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

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

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

"Dược phẩm" về cơ bản chứa một hoặc nhiều thành phần có khả năng cải biến các chức năng sinh lý ví dụ chức năng miễn dịch, của sinh vật nó được dùng cho, hoặc của sinh vật sống trong hoặc trên sinh vật này. Thuật ngữ bao gồm, nhưng không giới hạn, chất kháng sinh hoặc chất chống ký sinh trùng, cũng như các thành phần khác thường được sử dụng để đạt được các mục đích nhất định khác như, nhưng không giới hạn ở, các đặc điểm xử lý, độ vô trùng, độ ổn định, độ tiện lợi cho đối tượng dùng chế

phẩm qua đường ruột hoặc ngoài đường tiêu hóa như đường miệng, trong mũi, trong tĩnh mạch, trong cơ, dưới da, trong da, hoặc các đường dùng thích hợp khác, dung nạp sau khi dùng, hoặc đặc tính được giải phóng có kiểm soát. Một ví dụ không nhằm mục đích giới hạn về dược phẩm như vậy, chỉ nêu nhằm mục đích chứng minh, có thể được bào chế như sau: dịch nổi môi trường nuôi cấy tế bào của môi trường nuôi cấy tế bào bị nhiễm được trộn với chất làm ổn định (ví dụ, spermidin và/hoặc albumin huyết thanh bò (BSA) và hỗn hợp sau đó đông khô hoặc khử nước bằng các phương pháp khác. Trước khi chủng ngừa, sau đó hỗn hợp được hydrat lại trong nước (ví dụ dung dịch nước muối, dung dịch muối đệm phosphat (PBS) hoặc dung dịch không chứa nước (ví dụ, nhũ tương dầu, tá dược trên cơ sở alumin).

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

Theo một số phương án, chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế chứa chất phụ gia. “Tá dược” như được sử dụng ở đây, có thể bao gồm nhôm hydroxit và nhôm phosphat, saponin chẳng hạn, Quil A, QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA), GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, AL), nhũ tương nước trong dầu, nhũ tương dầu trong nước, nhũ tương nước trong dầu trong nước. Cụ thể, nhũ tương có thể dựa trên cơ sở dầu parafin lỏng nhẹ (loại trong Dược điển châu Âu); dầu isoprenoit như squalan hoặc squalen; dầu thu được từ quá trình oligome hóa các alken, cụ thể là isobuten hoặc dextrin; các este của axit hoặc rượu chứa nhóm alkyl mạch thẳng, cụ thể hơn là dầu thực vật, etyl oleat, propylen glycol di-(caprylat/caprat), glyxeryl tri-(caprylat/caprat) hoặc propylen glycol dioleat; các este của axit béo hoặc rượu béo phân nhánh, cụ thể là este của axit isostearic. Dầu được sử dụng kết hợp với chất nhũ hóa để tạo thành nhũ tương. Chất nhũ hóa tốt hơn là chất hoạt động bề mặt không ion, cụ thể là este của sorbitan, este của manit (chẳng hạn anhyđromanitol oleat),

este của glycol, este của polyglyxerol, este của propylen glycol và este của axit oleic, isostearic, rixinoleic hoặc hydroxystearic, tùy ý được etoxyl hóa, và các copolyme khối polyoxypropylen-polyoxyetylen, cụ thể là các sản phẩm Pluronic, đặc biệt là L121. Xem Hunter et al., *The Theory and Practical Application of Adjuvants* (Ed. Stewart-Tull, D. E. S.), John Wiley and Sons, NY, pp51-94 (1995) và Todd et al., *Vaccine* 15:564-570 (1997). Tá được được nêu làm ví dụ là nhũ tương SPT được mô tả ở trang 147 trong tài liệu “*vacxin Design, The Subunit and Adjuvant Approach*” được biên tập bởi tác giả M. Powell và M. Newman, Plenum Press, 1995, và nhũ tương MF59 được mô tả ở trang 183 của cùng tài liệu này.

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

Các tá được thích hợp khác bao gồm, nhưng không giới hạn ở, hệ tá được RIBI

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

Hy vọng rằng, chất phụ gia có thể được bổ sung với lượng nằm trong khoảng từ 100µg đến 10mg mỗi liều, tốt hơn với lượng nằm trong khoảng từ 100µg đến 10mg mỗi liều, tốt hơn nữa với lượng nằm trong khoảng từ 500µg đến 5mg mỗi liều, thậm chí tốt hơn nữa với lượng nằm trong khoảng từ 750µg đến 2,5mg mỗi liều và tốt nhất với lượng khoảng 1mg mỗi liều. Theo cách khác, tá dược có thể có mặt ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,01 đến 50%, tốt hơn ở nồng độ nằm trong khoảng từ 2% đến 30%, tốt hơn nữa ở nồng độ nằm trong khoảng từ 5% đến 25%, thậm chí tốt hơn nữa ở nồng độ nằm trong khoảng từ 7% đến 22% và tốt nhất ở nồng độ nằm trong khoảng từ 10% đến 20% tính theo thể tích của sản phẩm cuối cùng.

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

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

“Làm giảm độc lực” có nghĩa là làm giảm độc lực của mầm bệnh. Trong sáng chế này “sự giảm độc lực” đồng nghĩa với “không có tính độc”. Trong sáng chế này, virus được giảm độc lực là virus trong đó tính độc được giảm đến mức không gây ra triệu chứng lâm sàng của việc lây nhiễm nhưng có khả năng tạo ra đáp ứng miễn dịch ở động vật đích, nhưng có thể cũng có nghĩa là triệu chứng lâm sàng được giảm cả về

tỷ lệ mắc phải và mức độ nghiêm trọng ở động vật bị nhiễm virus được giảm độc lực đặc biệt là vector virus EHV-1 RacH theo sáng chế, so với “nhóm đối chứng” gồm các động vật bị nhiễm virus không được giảm độc lực hoặc mầm bệnh và không nhận virus được giảm độc lực. Trong ngữ cảnh này, thuật ngữ “giảm/được giảm” có nghĩa là giảm ít nhất 10%, tốt hơn là 25%, thậm chí tốt hơn nữa là 50%, cũng tốt hơn nữa là 60%, thậm chí tốt hơn nữa là 70%, cũng tốt hơn nữa là 80%, thậm chí tốt hơn nữa là 90% và tốt nhất là 100% so với nhóm đối chứng như được xác định trên đây. Vì thế, mầm bệnh được làm giảm độc lực, không độc như ví dụ vector virus được làm giảm độc lực theo sáng chế, đặc biệt là vector virus EHV-1 (tốt hơn là RacH) theo sáng chế, thích hợp để tạo ra vắc xin sống được cải biến (MLV) hoặc chế phẩm sinh miễn dịch sống được cải biến.

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

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

“Đáp ứng miễn dịch” hoặc “đáp ứng về miễn dịch” có nghĩa là, nhưng không bị giới hạn bởi, sự phát triển đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào và/hoặc kháng thể đối với chế phẩm (sinh miễn dịch) hoặc vắc xin mong muốn. Thông thường, “đáp ứng miễn dịch” hoặc “đáp ứng về miễn dịch” bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, một hoặc

nhieu tác dụng sau: sản sinh hoặc hoạt hóa kháng thể, tế bào B, tế bào T hỗ trợ, tế bào T ức chế, và/hoặc tế bào T gây độc tế bào, hướng cụ thể đến kháng nguyên hoặc các kháng nguyên được chứa trong chế phẩm hoặc vacxin quan tâm. Tốt hơn là, vật chủ sẽ thể hiện đáp ứng (trí nhớ) miễn dịch điều trị hoặc bảo vệ, sao cho khả năng kháng lại nhiễm trùng mới sẽ được tăng lên và/hoặc mức độ nghiêm trọng về mặt lâm sàng của bệnh được giảm xuống. Việc bảo vệ này sẽ được chứng minh bằng sự giảm về số lượng triệu chứng, mức độ nghiêm trọng của triệu chứng, hoặc không bị một hoặc nhiều triệu chứng kết hợp với nhiễm trùng của tác nhân gây bệnh, làm chậm sự xâm nhập của virus vào trong máu, giảm sự tồn tại của virus, giảm tải lượng virus toàn bộ và/hoặc giảm sự tiết virus.

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

Ở đây, “việc làm giảm tỷ lệ mắc và/hoặc mức độ trầm trọng của các dấu hiệu lâm sàng” hoặc “làm giảm các triệu chứng lâm sàng” có nghĩa là, nhưng không bị giới hạn bởi, làm giảm số lượng đối tượng bị nhiễm trong nhóm, làm giảm hoặc loại bỏ số lượng đối tượng biểu hiện các dấu hiệu lâm sàng về nhiễm trùng hoặc làm giảm mức độ trầm trọng của dấu hiệu lâm sàng bất kỳ có mặt ở một hoặc nhiều đối tượng, so với nhiễm trùng kiểu tự nhiên. Ví dụ, thuật ngữ này đề cập đến bất kỳ sự giảm thiểu nào về tải lượng mầm bệnh, sự thải loại mầm bệnh, làm giảm về sự lan truyền mầm bệnh hoặc sự giảm về triệu chứng lâm sàng bất kỳ thuộc triệu chứng của bệnh sốt rét. Tốt hơn các

dấu hiệu lâm sàng này được giảm ở một hoặc nhiều đối tượng tiếp nhận chế phẩm trị liệu theo sáng chế ít nhất 10% so với các đối tượng không được tiếp nhận chế phẩm và trở nên bị nhiễm trùng. Tốt hơn nữa các dấu hiệu lâm sàng được giảm ở đối tượng tiếp nhận chế phẩm theo sáng chế ít nhất 20%, tốt hơn ít nhất 30%, tốt hơn nữa ít nhất 40% và thậm chí tốt hơn nữa ít nhất 50%.

Thuật ngữ “bảo vệ tăng cường” ở đây có nghĩa là, nhưng không chỉ giới hạn ở, làm giảm có ý nghĩa thống kê về một hoặc nhiều triệu chứng lâm sàng có liên quan đến sự nhiễm tác nhân lây nhiễm ở nhóm đối tượng được chủng ngừa so với nhóm đối tượng không được chủng ngừa. Thuật ngữ “làm giảm có ý nghĩa thống kê về các triệu chứng lâm sàng” có nghĩa là, nhưng không chỉ giới hạn ở, tần suất về tỷ lệ mắc ít nhất một triệu chứng lâm sàng ở nhóm đối tượng được chủng ngừa thấp hơn ít nhất là 10%, tốt hơn là 20%, tốt hơn nữa là 30%, thậm chí tốt hơn nữa là 50%, và thậm chí tốt hơn nữa là 70% so với nhóm đối chứng không được chủng ngừa sau khi thử thách bởi tác nhân lây nhiễm.

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

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

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

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

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

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

Chế phẩm phối chế

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

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

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

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

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

Các trình tự:

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

Trình tự khởi đầu:

SEQ ID NO: 1	trình tự axit desoxyribonucleic 600bp	EHV-4 4pgG600
SEQ ID NO: 2	trình tự axit desoxyribonucleic 600bp	EHV-4 4pMCP600
SEQ ID NO: 3	trình tự axit desoxyribonucleic 430bp	EHV-4 pG430
SEQ ID NO: 4	trình tự axit desoxyribonucleic 449bp	EHV-4 p455
SEQ ID NO: 5	đoạn mở đầu số 1130 đặc hiệu đối với orf72	

SEQ ID NO: 6 đoạn môi số 1131 đặc hiệu đối với orf72

SEQ ID NO: 7 đoạn môi số 1079 đặc hiệu đối với mCherry

SEQ ID NO: 8 đoạn môi số 1080 đặc hiệu đối với mCherry

Vị trí cài xen:

SEQ ID NO: 9 đoạn môi PCR axit nucleic trình tự nhân tạo 1017 cho vùng cài xen orf70

SEQ ID NO: 10 đoạn môi PCR axit nucleic trình tự nhân tạo 1018 cho vùng cài xen orf70

SEQ ID NO: 11 đoạn môi PCR axit nucleic trình tự nhân tạo 1007 cho vùng cài xen orf1/3

SEQ ID NO: 12 đoạn môi PCR axit nucleic trình tự nhân tạo 1008 cho vùng cài xen orf1/3

SEQ ID NO: 13 vùng kẹp sườn trái (Up70) (417 bp)

SEQ ID NO: 14 vùng kẹp sườn phải (Up71) (431 bp)

SEQ ID NO: 15 phần bên trái vùng kẹp sườn (đến orf70) trong chủng EHV-1 kiểu đại ab4 (số truy cập Genbank AY665713.1), nằm ở nucleotit 127264 – 127680

SEQ ID NO: 16 phần bên phải vùng kẹp sườn (đến orf71) trong chủng EHV-1 kiểu đại ab4 (số truy cập Genbank AY665713.1), nằm ở nucleotit 128484 – 128913

SEQ ID NO: 17 vùng kẹp sườn bị cắt cụt trong hệ RED: vùng kẹp sườn trái (Up70) (283 bp) = giống với 283 bp ở đầu 3' của vùng kẹp sườn “cổ điển” 417 bp

SEQ ID NO: 18 vùng kẹp sườn bị cắt cụt trong hệ RED: vùng kẹp sườn phải (Up71) (144 bp) = giống với 144 bp đầu 5' của vùng kẹp sườn “cổ điển” 431 bp

SEQ ID NO: 19 phần bị xóa trong trình tự hệ gen ab4 kiểu đại (mã số truy cập Genbank AY665713.1), nt 127681 - 128482

SEQ ID NO: 20 phần bị xóa trong trình tự hệ gen RacH (không có số nt do trình tự hệ gen hoàn chỉnh không được thể hiện)

Trình tự plasmit/vector:

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

SEQ ID NO.: 22 trình tự nucleotit của vector chuyển pU70-p455-71K71

SEQ ID NO.: 23 trình tự nucleotit của plasmit chuyển pU70-p455-H3-71K71

SEQ ID NO.: 24 trình tự nucleotit của vector chuyển pU-1-3-p430-BGHKBGH

SEQ ID NO.: 25 trình tự nucleotit của plasmit chuyển pU1-3-p430-H1av-BGHKBGH

Trình tự hemagglutinin

SEQ ID NO:26 hemagglutinin [virut cúm A (A/swine/Italy/116114/2010(H1N2))] GenBank: ADR01746.1 H1pdm

SEQ ID NO:27 hemagglutinin [virut cúm A (A/swine/Italy/7680/2001(H3N2))] GenBank: ABS50302.2 H3:

SEQ ID NO:28 hemagglutinin [virut cúm A (A/swine/Gent/132/2005(H1N1))] GenBank: AFR76623.1 H1av:

SEQ ID NO:29 hemagglutinin [virut cúm A (A/swine/Italy/4675/2003(H1N2))] GenBank: ADK98476.1* H1hu

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

Các trình tự cấu trúc SBV

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

SEQ ID NO: 31 trình tự ADN tổng hợp chứa các vị trí giới hạn để tạo dòng phụ

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

SEQ ID NO:33 đoạn môi up70 F

SEQ ID NO:34 đoạn môi up71 R

SEQ ID NO:35 đoạn môi seq455-F1
 SEQ ID NO:36 đoạn môi SBV Gc F1
 SEQ ID NO:37 đoạn môi SBV Gc R1

Ví dụ thực hiện sáng chế

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

Ví dụ 1: Nhận biết và tạo cấu trúc các trình tự khởi đầu mới

Quy trình nhận biết các trình tự khởi đầu thích hợp như sau: Mảnh 600 bp của trình tự EHV-4 ngược dòng của hai khung đọc mở đã biết được phân tích trước bằng cách sắp thẳng hàng chúng với mảnh trình tự tương ứng của hệ gen EHV-1. Các gen được chọn là orf42 mã hóa protein capsit chính (major capsid protein - MCP), và orf70 mã hóa glycoprotein G (gG). Protein capsit chính là một trong các thành phần phong phú nhất của virion và cần thiết cho việc lắp ráp các capsit trong nhân tế bào ngay khi ADN virus mới được tổng hợp đã sẵn sàng để đóng gói. Vì thế trình tự khởi đầu của nó được mong đợi là sẽ hoạt động trong các thời điểm sớm và muộn trong chu kỳ sao chép của virus. Đối với glycoprotein G người ta đã biết rằng gen (orf70) của nó hoạt động cả ở các thời điểm sớm và muộn trong chu kỳ sao chép (Colle et al. 1995, Drummer et al. 1998). Độ đồng nhất trình tự là 82,2% đối với trình tự khởi đầu MCP giả định và 82,3% đối với trình tự khởi đầu gG giả định. Một mặt, các khác biệt này được coi là đủ lớn để ngăn chặn việc tái tổ hợp tương đồng, và mặt khác đủ nhỏ để cho phép diễn ra hoạt động phiên mã trong quá trình sao chép EHV-1. Để thử nghiệm hoạt tính trình tự khởi đầu, các mảnh ADN 600bp 4pgG600

GCAGACTTTGGAGCAGCACAATTTCCGGTTGTGGACCCCATGGACC
 TTGGTTTGGCTGGTACCGTGGAACTAACGCTCCGGAAGTTTTGGCCAGA
 GCAAAATACAATTCGAAGGTAGACATATGGAGCGCCGGAATAGTTCTGTT
 TGAAATGCTCGCATATCCATCAACTCTATTTGAGGACCCGCCGAGTACCCC
 ACAAGAGTATGTAAAAAGCTGTCATTCTCAACTACTGAGAATAATATCAA
 AGCTAAAGATAAACCTGAGGAGTTTCCACGGGAACCAGAGTCTAGGCTC
 GTGCGCGGATACATCGAATACGCCAGCCTAGAGCGTAAGCCACATACGCG
 CTATCCTTGCTTCCAGCGCGTGAACCTACACATTGACGGGGAATTTTTGAT
 CCATAAAATGCTAGCGTTCAATGCTGCGATGCGCCCATCCGCAGAAGAGT
 TGTGTCTACCCAATGTTTATGAATCTGTAGGATGACTAACAGATTTGGG
 GTGGAGACGGCGTGGGCGATACTGTATAAAGTTGTACTACTTACCAGCCC
 AGTCAGTGTGCTGTAGTGCCACCACCTGTAAAGCTGTGATAAGCTGCAGTT
 (SEQ ID NO:1)

và 4pMCP600

AGCTGGGGGAGTTTGTACTATAGTGTATTACATGCGGCTTGCAATAA
 CTGCCTGGTTTATGTTTCGCAACATTCAAGCAGACATGCTACCGCTAAACA
 CTTTGCAACAATTTTTTATTGGGTGTTTGGCCTTTGGTAGAACTGTCGCGTT
 TTTGGTGGTAGCATATACTACCTTATTTATACGCTCCGAGCTGTTTTTCAGC
 ATGCTAGCACCCAACGCCGAGCGAGAGTATATAACTCCCATCATTGCCCA
 CAAGCTTATGCCACTTATTAGCGTCCGCTCTGCCGTTTGCTTAGTCATAAT
 ATCTACCGCCGTTTACGCAGCAGACGCTATCTGCGACACAATTGGATTTGC
 GATACCGCGCATGTGGATGTGTATTTTAATGAGATCAACCTCCATGAAGC
 GTAAGTAGGGGGCCTCCCACTGAGGCACTACCGGCTTAGCAGCTGACTAA
 CACAGTATAAAACGTGAGAAGAAATCAGTCTCATGCGCCATTAGCGCTAG
 GCTAGTTAGCGTGGAGGACCGGAGCGCTACCGCCAGCAGTTTCATCCGCC
 TGGTTACGGGTTTGTAAACACCTACCGGTGTTTTACCGCTACCATA (SEQ ID
 NO:2)

được tổng hợp và được tạo dòng ngược chiều của gen thông báo mã hóa protein tự phát huỳnh quang mCherry (Shaner et al., 2004). Do chức năng tín hiệu kết thúc phiên mã và chức năng làm ổn định mRNA trình tự polyadenyl hóa hormon tăng trưởng bò

(BGHpA; Goodwin & Rottman, 1992) được tạo dòng trực tiếp xuôi chiều đầu 3' của gen thông báo.

Để sử dụng làm đối chứng dương tính, trình tự khởi đầu CMV được khuếch đại từ plasmid pcDNA3.1 có bán trên thị trường (Invitrogen) và được tạo dòng ngược chiều gen thông báo mCherry, ở đây cả BGHpA cũng được thêm vào ở đầu 3' của gen thông báo. Các giống nuôi cấy tế bào được chuyển nhiễm bằng ba plasmid (pBlu-4pgGmCherry, pBlu-4pMCPmCherry, và pBlu-CMVmCherry) và được kiểm tra bởi hiển vi huỳnh quang đối với sự phát huỳnh quang mCherry. Hoạt tính mạnh của trình tự khởi đầu CMV là rõ ràng ở những thời điểm khác nhau sau khi chuyển nhiễm. Trình tự khởi đầu 4pgG600 cũng có hoạt tính sau khi chuyển nhiễm, hoạt tính của trình tự khởi đầu 4pMCP600 cũng được phát hiện, nhưng ít khi được so sánh với trình tự khởi đầu 4pgG600 và thậm chí nhiều hơn khi so sánh với trình tự khởi đầu CMV thậm chí ba ngày sau khi chuyển nhiễm.

Để điều kiểm tra hiệu quả của hoạt tính trình tự khởi đầu, giống nuôi cấy tế bào được chuyển nhiễm bằng pBlu-4pgG600-mCherry hoặc pBlu-4pMCP600-mCherry được nhiễm lần thứ hai một ngày sau khi chuyển nhiễm với EHV-1 RacHI-EF huỳnh quang xanh lá cây. Sản phẩm gen virus đã được hoạt chuyển trước đó trình tự khởi đầu 4pMCP600 đến mức hoạt tính cao hơn đáng kể trong trường hợp không diễn ra sự sao chép EHV-1 RacHI-EF. Tác dụng này cũng có trong giống nuôi cấy tế bào được chuyển nhiễm bằng pBlu-4pgG600-mCherry và bị nhiễm EHV-1 RacHI-EF lần hai, mặc dù không quá mạnh do hoạt tính ban đầu không diễn ra sự sao chép của virus cao hơn hoạt tính quan sát được với pBlu-4pMCP600-mCherry. Tuy nhiên, đối với các trình tự khởi đầu 600 bp, tác dụng chuyển hoạt sự sao chép của virus lên hoạt tính của chúng trong nuôi cấy tế bào đã được chứng tỏ.

Tác dụng này có thể được giải thích nếu trình tự 600bp chứa các yếu tố kìm hãm, mà thường nằm trước các yếu tố hoạt hóa. Do đó, trình tự khởi đầu ngắn hơn có thể hoạt động mạnh hơn trong trường hợp không có sản phẩm gen virus. Để kiểm tra điều này, các trình tự khởi đầu EHV-4 được cắt đến khoảng 75% chiều dài ban đầu của chúng và được kiểm tra lại.

Cụ thể, các trình tự khởi đầu 600 bp được cắt cụt đến 430 bp đối với 4pgG, có tên mới là: **p430**:

TCTATTTGAGGACCCGCCGAGTACCCACAAGAGTATGTAAAAAGCTGTC
ATTCTCAACTACTGAGAATAATATCAAAGCTAAAGATAAACCTGAGGAG
TTTCCACGGGAACCAGAGTCTAGGCTCGTGCGCGGATACATCGAATACGC
CAGCCTAGAGCGTAAGCCACATACGCGCTATCCTTGCTTCCAGCGCGTGA
ACCTACACATTGACGGGGAATTTTTGATCCATAAAATGCTAGCGTTCAATG
CTGCGATGCGCCCATCCGCAGAAGAGTTGTTGTCCTACCCAATGTTTATGA
ATCTGTAGGATGACTAACAGATTTGGGGTGGAGACGGCGTGGGCGATACT
GTATAAAGTTGTACTACTTACCAGCCCAGTCAGTGTGCTGTAGTGCCACCA
CCTGTAAAGCTGTGATAAGCTGCAGTT (SEQ ID NO:3)

và đến 449 bp đối với 4pMCP, có tên mới là: **p455**:

TTGGTGGTAGCATATACTACCTTATTTATACGCTCCGAGCTGTTTTTC
AGCATGCTAGCACCCAACGCCGAGCGAGAGTATATAACTCCCATCATTGC
CCACAAGCTTATGCCACTTATTAGCGTCCGCTCTGCCGTTTGCTTAGTCAT
AATATCTACCGCCGTTTACGCAGCAGACGCTATCTGCGACACAATTGGATT
TGCGATACCGCGCATGTGGATGTGTATTTAATGAGATCAACCTCCATGAA
GCGTAACTAGGGGGCCTCCCACTGAGGCACTACCGGCTTAGCAGCTGACT
AACACAGTATAAAACGTGAGAAGAAATCAGTCTCATGCGCCATTAGCGCT
AGGCTAGTTAGCGTGGAGGACCGGAGCGCTACCGCCAGCAGTTTCATCCG
CCTGGTTACGGGTTTGTTAACACCTACCGGTGTTTTACCGCTACCATA (SEQ
ID NO:4).

Plasmid thông báo mCherry chứa vùng khởi đầu ngắn hơn được chuyển nhiễm trong tất cả các giống nuôi cấy tế bào và được kiểm tra bằng hiển vi huỳnh quang. Trong khi hoạt tính p430 activity là có thể so sánh với hoạt tính của phiên bản 600 bp (4pgG600), hoạt tính của p455 tăng lên đáng kể so với hoạt tính của 4pMCP600. Kết quả này phù hợp với kết quả của các thử nghiệm chuyển nhiễm/nhiễm lần hai bằng cách sử dụng các phiên bản 600bp của hai trình tự khởi đầu, cụ thể là, sự có mặt của quá trình sao chép EHV-1 trong cùng tế bào đã cung cấp cơ chế chuyển hoạt của trình tự

khởi đầu 4pMCP600 làm tăng mạnh hoạt tính của nó trong khi việc chuyển hoạt trình từ khởi đầu 4pgG600 cũng quan sát thấy nhưng ít rõ rệt hơn.

Ngoài hai trình tự khởi đầu mới, trình tự polyA mới cũng cần cho việc biểu hiện từ vị trí cài xen orf70 mới. Yếu tố này được gọi là 71pA. Trình tự nucleotit của nó được tổng hợp và được tách dòng xuôi chiều mCherry orf trong plasmit chuyển chứa p455 được hướng đích cho vị trí cài xen orf70 trong pRacH-SE.

Tiếp theo, rEHV-1 RacH-SE được tạo ra để thử nghiệm hoạt tính trình tự khởi đầu dựa trên sự sao chép của virus (Bảng 1). Hai trình tự khởi đầu EHV-4 (p430 và p455), các trình tự khởi đầu CMV và trình tự khởi đầu IE1 của cytomegalovirus ở chuột nhất (MCMV) được sử dụng để dẫn hướng sự biểu hiện của mCherry kết hợp với tín hiệu BGH polyA để làm tăng độ ổn định của mARN. Trình tự khởi đầu MCMV IE1 (yếu tố tăng cường) như được mô tả bởi Dorsch-Häsler et al. (1985) được tổng hợp và được tách dòng trong vector plasmit từ đó nó được tạo dòng phụ vào plasmit chuyển. Ngoài ra, p455 cũng được tách dòng vào vị trí cài xen mới trong orf70 điều khiển sự biểu hiện của mCherry kết hợp với 71pA tín hiệu polyA mới. Với vai trò là đối chứng khác, rEHV-1 RacHmC70 được bao gồm trong các thử nghiệm này. Các tế bào bị nhiễm virus tái tổ hợp biểu hiện mCherry dưới sự kiểm soát của trình tự khởi đầu gG nội sinh (egGp) (Bảng 1).

Bảng 1

<i>tên</i>	Vị trí cài xen Orf1/3			Vị trí cài xen Orf70		
	<i>trình tự khởi đầu</i>	<i>trình tự thông báo</i>	<i>polyA</i>	<i>trình tự khởi đầu</i>	<i>trình tự thông báo</i>	<i>polyA</i>
1/3-CMV-mC	HCMV IE1	mCherry	BGH	không	không	không
1/3-MCMV-mC	MCMV IE1	mCherry	BGH	không	không	không
1/3-p455-mC	p455	mCherry	BGH	không	không	không
1/3-p430-mC	p430	mCherry	BGH	không	không	không
70-egGp-mC	không	không	không	gG nội sinh	mCherry	BGH
70-p455-mC	không	không	không	p455	mCherry	71pA

Các tế bào VERO hoặc PK/WRL bị nhiễm tất cả sáu virus biểu hiện mCherry ở m.o.i . bằng 1. Các tế bào bị nhiễm được thu gom lúc 0, 4, 8, và 12 giờ sau gây nhiễm (p.i.) và tổng ARN tổng được tạo ra. ADN bộ gen của virus và tế bào tạp nhiễm trong chế phẩm ARN được phân hủy bằng cách phân hủy nhờ ADNaza I. Tính nguyên vẹn của ARN và việc loại bỏ ADN virus đã được thể hiện bằng cách phiên mã ngược có hoặc không bổ sung enzym phiên mã ngược sau khi PCR với cặp mồi đặc hiệu đối với orf72 (đoạn mồi số 1130/1131, (TGTCTACCTTCAAGCTTATG (SEQ ID NO:5)/CTAGCGCAGTCGCGTTG (SEQ ID NO:6)) mã hóa glycoprotein D cấu trúc thiết yếu của EHV-1. Sản phẩm PCR 196bp được mong đợi được khuếch đại chỉ từ các mẫu phiên mã ngược (ADN bổ trợ) trong đó các enzym phiên mã ngược được bổ sung, cụ thể là các mẫu được tạo ra ở t1= 4h p.i., t2= 8h p.i., và t3= 12h p.i., không từ các mẫu được tạo ra lúc t0= 0 h p.i. Tất cả các mẫu mà enzym phiên mã ngược không được bổ sung vào phản ứng không tạo ra sản phẩm PCR bất kỳ như mong đợi. Vì thế nó đã được chỉ ra rằng các mẫu (ADN bổ trợ) mà sẽ được sử dụng làm khuôn cho qPCR không chứa ADN hệ gen virus.

Các ADN bổ trợ thu được từ quá trình phiên mã ngược được bổ sung enzym sau đó được phân tích bằng qPCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu đối với mCherry (đoạn mồi số 1079/1080, (GCGAGGAGGATAACATGG (SEQ ID NO:7)/ACCCTTGGTCACCTTCAG (SEQ ID NO:8)) và cặp mồi orf72 1130/1131 (TGTCTACCTTCAAGCTTATG (SEQ ID NO:5)/CTAGCGCAGTCGCGTTG (SEQ ID NO:6)). Các giá trị Ct cho orf72 qPCR được sử dụng để đánh giá khả năng so sánh của các lần nhiễm virus khác nhau được chạy song song và để chuẩn hóa các giá trị Ct cho mCherry qPCR. Vì vậy, quá trình phiên mã của mCherry được định lượng theo thời gian sau khi gây nhiễm và cho các virus khác nhau (Fig. 3).

Như được thể hiện trên đồ thị bên trái trên Fig. 3, các giá trị Ct đối với các sản phẩm phiên mã orf72 là gần như giống nhau đối với sáu virus khác nhau ở cả bốn thời điểm khác nhau sau khi nhiễm. Lý tưởng nhất là tất cả sáu virus sẽ tạo ra các giá trị giống hệt nhau tại các thời điểm được nghiên cứu và chỉ có một dòng sẽ hiển thị. Các dòng gần như giống hệt xác nhận thử nghiệm đạt chất lượng, đồng thời kết quả ở thời điểm 12 h sau gây nhiễm là hợp lệ do mức giảm so với thời điểm 8 h sau gây nhiễm chỉ

ra sự gia tăng hơn nữa số lượng sản phẩm phiên mã mà chỉ có thể có khi quá trình sao chép chưa vượt quá mức tối đa của nó. Trung bình thống kê của mỗi thời điểm p.i. đã được tính. Giá trị của mỗi loại virus tại một thời điểm nhất định được chia cho mức trung bình được tính cho thời điểm đó và được sử dụng làm hàm với các giá trị Ct của mCherry qPCR được chuẩn hóa để làm cho chúng có thể so sánh trực tiếp. Các giá trị Ct được chuẩn hóa của mCherry qPCR được thể hiện dưới dạng đồ thị trong đồ thị bên phải trên Fig. 3. Sự khác biệt của các dòng cho thấy sự khác biệt về số lượng của các sản phẩm phiên mã mCherry được tạo ra trong các tế bào bị nhiễm virus khác nhau.

Trong một loại đồ thị hai thử nghiệm khác, một sử dụng tế bào VERO-EU (V) và một sử dụng tế bào PK/WRL (P) được kết hợp (Fig. 4). Chất lượng của các sản phẩm ARN và sự sao chép của virus được khẳng định như được mô tả ở trên bằng phiên mã ngược có và không có enzym phiên mã ngược tiếp theo là PCR với đoạn mồi orf72. Các giá trị Ct của qPCR thu được cho mCherry được chuẩn hóa như đã mô tả ở trên trên cơ sở các giá trị Ct của qPCR cho orf72. Các giá trị Ct chuẩn hóa của t1=4h p.i.; t2=8h p.i., và t3=12h p.i. được trừ từ giá trị Ct đã chuẩn hóa lúc t0 (Ct được chuẩn hóa Delta) thu được mối tương quan dương với hoạt tính phiên mã.

Mặc dù hai thử nghiệm ở các tế bào VERO (V) hoặc PK/WRL (P) không thể trực tiếp so sánh, nhưng mức biểu hiện cao hơn ở các tế bào PK/WRL rất có thể phản ánh sự cho phép vượt trội của các tế bào PK/WRL đối với sự sao chép của EHV-1 mà thường dẫn đến nồng độ chuẩn của virus lây nhiễm cao hơn 10 lần.

Trong khi hoạt tính của trình tự khởi đầu thu được từ EHV p430, p455 và egGp gần như giống nhau ở các thời điểm p.i. tương ứng cho dòng tế bào đã sử dụng, không phân biệt vị trí cài xen của chúng hoặc poly A (BGH hoặc 71pA) đã sử dụng, hoạt tính của trình tự khởi đầu CMV- và MCMV cao hơn trong tế bào PK/WRL. Trong các tế bào VERO-EU, chỉ có trình tự khởi đầu MCMV đã thể hiện là có hoạt tính cao hơn, trình tự khởi đầu CMV không vượt trội so với trình tự khởi đầu EHV.

Từ các thử nghiệm này có thể kết luận rằng trình tự khởi đầu EHV-4 p430 và p455 là thích hợp để sử dụng trong khung EHV-1 RacH để điều khiển sự biểu hiện của gen chuyển được cài xen từ các vị trí cài xen orf1/3 và orf70.

Ví dụ 2: Sử dụng trình tự khởi đầu p455 trong vacxin vector EHV-1 tái tổ hợp và tạo cấu trúc virus tái tổ hợp

Trình tự khởi đầu p455:

Đối với thử nghiệm trên động vật thử nhất hemagglutinin virus cúm kiểu phụ H3 từ virus cúm A có nguồn gốc từ lợn (A/swine/Italy/7680/2001(H3N2), số truy cập GenBank: ABS50302.2) được sử dụng. Trình tự mã hóa của nó được tổng hợp và tạo dòng phụ tạo ra vector chuyển pU70-p455-H3-71K71, đặt H3 dưới sự kiểm soát của trình tự khởi đầu p455 và tín hiệu polyadenyl hóa mới 71pA và đóng khung cat-xet bằng các vùng tái tổ hợp để cài xen vào trong orf70 (Fig. 5).

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

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

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

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

Bằng thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang kép (dIFA) vết tan virut trong tế bào bị nhiễm P20 bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng kháng H3 và kháng huyết thanh ngựa kháng EHV, kết quả của thử nghiệm này đã khẳng định được rằng hầu như toàn bộ các vết tan được cảm ứng EHV-1 cũng biểu hiện H3 (không được thể hiện). Tất cả các thử nghiệm đã khẳng định độ ổn định của EHV-1 RacH-SE-70-p455-H3 tái tổ hợp. Ví dụ 3: Bằng chứng về khái niệm nghiên cứu trên động vật (POC I) bằng cách sử dụng trình tự khởi đầu p455 và đánh giá đáp ứng huyết thanh:

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

Năm nhóm gồm mười lợn con được sinh ra từ lợn mẹ không bị nhiễm cúm A được bao gồm trong thử nghiệm POC-I như được tóm tắt trong bảng 2.

Bảng 2

Nhóm	Điều trị bằng vaccin	Số con vật	Đường dùng	Liều
1	1x NaCl; 1x vaccin vectơ EHV1	10	trong cơ	2 ml NaCl; 2 ml EHV1, $1,00 \times 10^7$ TCID ₅₀
2	2x vaccin vectơ EHV1	10	trong cơ	2x 2 ml EHV1, $1,00 \times 10^7$ TCID ₅₀
3	2x NaCl	10	trong cơ	2x 2 ml NaCl

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

Liều gây nhiễm là 1×10^7 TCID₅₀ của rEHV-1 RacH-70-p455-H3 (EHV-1) được dùng một lần lúc năm tuần tuổi hoặc hai lần lúc hai và năm tuần tuổi. Để so sánh vaccin bất hoạt (Inact) có bán trên thị trường được dùng hai lần lúc hai và năm tuần tuổi. Tất cả các lợn con không có kháng thể có nguồn gốc từ mẹ để không loại trừ tác dụng của vaccin bất hoạt (Inact). Hai nhóm không được chủng ngừa nhưng được tiêm dung dịch natri clorua sinh lý (NaCl) để dùng làm đối chứng thử thách hoặc đối chứng âm tuyệt đối, tương ứng. 21 ngày sau khi chủng ngừa lần hai tất cả các nhóm ngoại trừ nhóm đối chứng âm tuyệt đối được thử thách bằng 1×10^7 TCID₅₀ của các chủng cúm A khác loại (IVA) (cúm A H3N2 từ lợn R452-14, thể phân lập thử thách do BI sở hữu). Trong khi nhóm đối chứng thử thách không được chủng ngừa (Chall ctrl) tất cả các con lợn có độ chuẩn virus cúm cao trong phổi vào một và ba ngày sau khi thử thách lây nhiễm, tất cả các con lợn trong nhóm đối chứng âm tuyệt đối (neg ctrl) và nhóm được chủng ngừa hai lần (EHV 2x) bằng rEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3 đều là âm tính đối với IAV ở cả hai ngày. Trong nhóm được chủng ngừa hai lần bằng vaccin đối chứng bất hoạt (Inact

2x), một trong năm con vật có độ chuẩn IVA thấp vào ngày thứ ba sau khi thử thách. Trong nhóm được chủng ngừa một lần (EHV 1x) vào 21 ngày trước khi thử thách bằng rEHV-1 RacH-SE-70-455-H3, hai trong năm con vật có độ chuẩn IVA thấp trong phổi lúc một ngày sau khi thử thách lây nhiễm và một trong năm con vật lúc ba ngày sau khi thử thách. (Fig. 9).

Hai lần chủng ngừa bằng 1×10^7 TCID₅₀ của rEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3 bảo vệ lợn một cách hoàn toàn chống lại lây nhiễm thử thách bằng IAV khác loại, kiểu phụ H3N2. Chứng tỏ được rằng vector EHV-1 RacH-SE thích hợp để chủng ngừa cho lợn và trình tự khởi đầu mới 455 có chức năng điều khiển sự biểu hiện sinh miễn dịch của hemagglutinin IAV ở lợn được chủng ngừa.

Ví dụ 4: Sử dụng trình tự khởi đầu p430 trong vacxin vector ehv-1 tái tổ hợp và tạo cấu trúc virus tái tổ hợp

Trình tự khởi đầu p430:

Trình tự khởi đầu p430 mới được xác định được sử dụng để điều khiển sự biểu hiện của hemagglutinin virus cúm khác từ virus H1N1 ((A/swine/Gent/132/2005(H1N1), số truy cập GenBank: AFR76623.1). Do gen hemagglutinin trong thể phân lập virus này là có nguồn gốc từ IAV gia cầm nên nó được gọi là H1av. H1av được tổng hợp và tạo dòng phụ trong vector chuyển đổi với vùng cài xen orf1/3 để tạo ra pU1/3-p430-H1av-BGH_K_BGH. Việc biểu hiện của H1av được đặt dưới sự kiểm soát của trình tự khởi đầu p430 và tín hiệu polyA hormon tăng trưởng bò (BGH) (Fig. 10).

Bằng cách gây đột biến en-passant bằng cách sử dụng hệ thống tái tổ hợp RED (Tischer et al. 2006) cat-xet biểu hiện p430-H1av-BGH được cài xen trong orf1/3 của pRacH-SE để tạo ra pRacH-SE1/3-p430-H1av (Fig. 11).

Tế bào PK/WRL được chuyển nhiễm với pRacH-SE1/3-p430-H1av, virus tái tổ hợp rEHV-1 RacH-SE1/3-p430-H1av được tách khỏi và được tinh chế vết tan hai lần. Việc cài xen chính xác cat-xet biểu hiện được xác nhận bằng cách giải trình tự sản phẩm PCR độ trung thực cao của vùng cài xen. Việc biểu hiện của gen chuyển trong tế bào bị nhiễm được phân tích bằng thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang gián tiếp (IFA) và thẩm

tách Western bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng và đa dòng có bán trên thị trường (Fig. 12). Việc khôi phục orf71 mã hóa EHV-1 gpII được xác nhận bằng IFA và thẩm tách Western bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng Ai2G7 (do BI sở hữu), (không được thể hiện). Việc xử lý chính xác và vận chuyển H1av và định vị trong màng sinh chất của tế bào bị nhiễm được thử nghiệm bằng thử nghiệm hấp phụ hem bằng cách sử dụng hồng cầu gà (không được thể hiện). Độ chuẩn cực đại được xác định là TCID₅₀/ml ở các tế bào PK/WRL là trong khoảng giống nhau như độ chuẩn của virus RacH-SE ban đầu mà chỉ ra rằng việc biểu hiện gen chuyển không gây ảnh hưởng bất lợi cho sự sao chép của virus (không được thể hiện).

Việc phát hiện đặc hiệu dải rộng và di chuyển ở 75 kDa bằng kháng thể PA-34929 phù hợp với sự xuất hiện của glycoprotein HA tái tổ hợp như được dự đoán từ trình tự của nó. Việc nhuộm rõ ràng màng tế bào bằng kháng thể đơn dòng C102 phù hợp với việc định vị dưới mức tế bào mong đợi (Fig. 12).

Để kiểm tra hemagglutinin tái tổ hợp được biểu hiện được xử lý và vận chuyển như mong đợi hay không, các tế bào VERO được cho nhiễm rEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1av, rEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3, rEHV-1 RacH-SE (ban đầu) ở giá trị m.o.i. bằng 0.01, hoặc không bị nhiễm. 24 h p.i. tế bào bị nhiễm sống và không bị nhiễm được ủ với thể huyền phù của hồng cầu gà trong PBS, được rửa bằng PBS và được nhuộm bằng thuốc nhuộm nhân Hoechst 33342 huỳnh quang. Do hồng cầu của gia cầm chứa nhân tế bào chúng có thể được nhuộm bằng Hoechst33342 và xuất hiện như những đốm nhỏ màu xanh bằng hiển vi huỳnh quang, so sánh với các tế bào bị nhiễm rEHV-1 RacH-SE không biểu hiện hemagglutinin, việc hấp phụ của hồng cầu gà tăng lên đáng kể trên các tế bào bị nhiễm rEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1av hoặc rEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3 (không được thể hiện). Từ đó có thể kết luận rằng hemagglutinin được dịch mã, xử lý và vận chuyển đến màng sinh chất của tế bào bị nhiễm virus vector theo cách như thể chúng được tạo ra bởi nhiễm virus cúm đích thực.

Kiểu hình rõ ràng của việc hấp phụ hem của tế bào bị nhiễm hỗ trợ cho phát hiện của các thử nghiệm thẩm tách Westerns và miễn dịch huỳnh quang thể hiện sự biểu hiện hiệu quả của protein chuyển gen và đề xuất việc hình thành trimer HA chức năng trên tế bào của tế bào bị nhiễm vector EHV-1.

Ví dụ 5: Sử dụng hai trình tự khởi đầu mới p455 và p430 trong vacxin vector EHV-1 tái tổ hợp trong hai vị trí cài xen song song

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

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

Bắt đầu bằng BAC pRacH-SE-70-p455-H3 tái tổ hợp, cat-xet biểu hiện p430-H1av-BGH khi được lắp ráp trong vector chuyển pU1/3-p430-H1av-BGH_K_BGH (Fig. 10) được cài xen vào trong vị trí cài xen orf1/3 bằng quy trình tái tổ hợp RED hai bước để tạo ra pRacH-SE-1/3-p430-H1av-70-p455-H3. Các tế bào PK/WRL được chuyển nhiễm với pRacH-SE1/3-p430-H1av-70-p455-H3, và virus tái tổ hợp rEHV-1 RacH-SE1/3-p430-H1av-70-p455-H3 được giải phóng và được tinh chế vết tan hai lần (Fig.13).

Tên gọi ngắn của virus tái tổ hợp này là rEHV-1 RacH-SE_B. Việc cài xen chính xác cat-xet biểu hiện được xác nhận bằng cách giải trình tự sản phẩm PCR độ trung thực cao của các vùng cài xen cùng với các trình tự kẹp sườn. Việc biểu hiện của gen chuyển trong tế bào bị nhiễm được phân tích bằng thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang gián tiếp (IFA, không được thể hiện) và thử nghiệm thẩm tách Western bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng và đa dòng có bán trên thị trường (Fig. 14). Việc khôi phục orf71 mã hóa EHV-1 gpII được khẳng định bằng IFA (không được thể hiện) và thẩm tách Western bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng Ai2G7 (sở hữu của BI), (Fig. 14).

Như được thể hiện trên Fig.14, cả hai gen chuyển H3 và H1av được biểu hiện song song trong môi trường nuôi cấy tế bào bị nhiễm rEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1av-70-p455-H3 (B) tái tổ hợp cài xen kép. Việc biểu hiện của gen chuyển là ổn định và không ảnh hưởng đến nồng độ chuẩn của virus được thử nghiệm cho đến lần cấy chuyển 11 trong tế bào PK/WRL (không được thể hiện).

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

Ví dụ 6: Vaccine vector RCAV-2 sử dụng trình tự khởi đầu p455 và p430 mới

Phương pháp

Các tế bào AI-ST 2015 được gây nhiễm với rCAV-2 sau đây

1.CAV-2 CMVie BRSV (đối chứng dương tính đối với kháng-CAV2; đối chứng âm tính đối với kháng-VP2)

2.CAV-2 p430 CPV VP2 (Despliced A1-2-1)

3.CAV-2 p430 CPV VP2 (Gen 0.95 D1-5-1)

4.CAV-2 p455 CPV VP2 (Gen0.95 E1-8-1)

5.CAV-2 p430 RabG (n)

6.CAV-2 p455 RabG (n)

Phân tích miễn dịch huỳnh quang (Immunofluorescence Analysis - IFA)

Các tế bào AI-ST 2015 được cố định với Cytofix/Cytoperm 72h sau nhiễm và được nhuộm với kháng-CPV VP2-FITC (mAb), kháng-RabG-FITC (mAb) và kháng-CAV-2-FITC (kháng huyết thanh lợn) (VMRD).

Đếm tế bào theo dòng (Flow cytometry - FC)

AI-ST 2015 các tế bào được cố định với Cytofix/Cytoperm 48 & 72h sau nhiễm và các tế bào được nhuộm với kháng-CAV-2-FITC, kháng-CPV VP2-FITC (VMRD), huyết thanh tăng miễn dịch của lợn đối với CPV (Benchmark) và kháng-RabG-FITC

(Novus).

Thẩm tách điểm đối với CPV VP2

Dịch nuôi cấy mô đã được làm trong (6000 x g, 5 phút) / dịch phân giải (lạnh đông/tan giá) từ các tế bào E1B MDCK đã được gây nhiễm (đối với rCAV-2) được pha loãng theo dãy nồng độ bằng PBS trước khi bổ sung vào thiết bị và được hấp phụ vào PVDF bằng cách hút. Các bước tiếp theo là cho tiếp xúc trong 30 phút với 5,0% BioRad Blotting Grade Blocker trong TBST, tiếp xúc trong 1,0h với kháng thể số 1, rửa ba lần bằng TBST, và tiếp xúc trong 1,0h với kháng thể số 2 được tiếp hợp với peroxidaza (kháng chuột và kháng lợn, Jackson ImmunoResearch) và cho hiện màu bằng TMB. Để định lượng, các điểm thẩm tách được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm ImageJ (Burger, W., Burge, M.J. (Eds.), 2008. Digital Image Processing: An algorithmic introduction using Java. Springer-Verlag, New York). Màu sắc của hình ảnh được đảo ngược để trừ đi nền và mật độ tích hợp của mỗi điểm được ghi. Các giá trị được gán các tên gọi + và - như sau: “++++” = >800000, “+++” = từ 500000 đến 800000, “++” = từ 300000 đến 499999, “+” = từ 120000 đến 299999, “+/-” = từ 80000 đến 119999 và “-” = <80000.

Cấu trúc CAV-2 VP2:

Sự tạo ra hạt giống virus (VLP) bằng tế bào bị nhiễm virus vaccine rCAV-2 có thể là yếu tố chủ chốt đối với hiệu lực vaccine canine adenovirus (CAV-2). Mặc dù rCAV-2 chứa cat-xet biểu hiện CPV VP2 được dẫn hướng bởi CMVie có thể được giải phóng, không thể đạt được sự biểu hiện đáng kể VP2 (để tạo ra VLP) trong tế bào bị nhiễm rCAV-2 CMVie CPV VP2 bằng cách sử dụng trình tự khởi đầu CMVie thông thường. Virus rCAV-2 VP2 chứa trình tự khởi đầu CMV5 có thể không được giải phóng.

Phương pháp IFA, đếm tế bào theo dòng và thẩm tách được sử dụng để đánh giá sự biểu hiện của CPV VP2 được dẫn hướng bởi trình tự khởi đầu EHV-4 ở các tế bào AI-ST 2015 đã gây nhiễm rCAV-2. Sự biểu hiện của protein CAV-2 được dò bằng kháng thể đa dòng ở lợn được tiếp hợp với kháng-CAV-2 FITC (VMRD). Sự biểu hiện của protein CPV VP2 được dò bằng đơn dòng ở chuột (VMRD) và huyết thanh tăng miễn dịch của lợn (Benchmark). Các protein CAV-2 và CPV VP2 dễ dàng được hiện màu bằng IFA và được phát hiện bằng FC ở phần lớn các tế bào AI-ST 2015 được gây

nhiễm rCAV-2 mang hai biến thể nucleotit khác nhau của CPV VP2 (Despl và Gen0.95, ở 48 và 72h sau nhiễm). Protein CPV VP2 với lượng đáng kể được nhận biết trong dịch nổi nuôi cấy mô/dịch phân giải (sau khi lạnh đông/tan giá) bằng phương pháp thấm điểm Dot Blot (và thể hiện rất giống sự có mặt của các VLP đã được lắp ghép).

Sự biểu hiện của CPV VP2 ở các tế bào AI-ST 2015 đã gây nhiễm dễ dàng được phát hiện bởi IFA (xem Fig. 19A). Sự biểu hiện của CPV VP2 được phát hiện ở ít hơn 3% tế bào bị gây nhiễm với rCAV-2 CMVie CPV VP2 ban đầu (xem Fig. 15). Vì vậy, rCAV-2 mang cat-xet biểu hiện CPV VP2 được dẫn hướng bởi trình tự khởi đầu p430 và p455 mới được dẫn xuất từ EHV4 được giải phóng và được kiểm tra để xác định xem liệu chúng có thể dẫn hướng một cách hiệu quả sự biểu hiện của CPV VP2 ở các tế bào bị nhiễm hay không. Bất ngờ là, sự biểu hiện của CPV VP2 được phát hiện ở 14% đến 36% tế bào đã gây nhiễm (xem Fig. 16). Ngoài ra, và trái ngược với rCAV-2 CMVie CPV VP2 ban đầu (ở đó phân tích thấm điểm cho thấy tín hiệu CPV VP2 được dẫn hướng bởi CMVie là ở mức hoặc dưới mức đường nền – so với dịch nổi/dịch phân giải từ CAV-2, tế bào bị nhiễm rCAV-2 CMVie BRSV F và dịch nổi nuôi cấy tế bào/dịch phân giải từ tế bào chưa bị nhiễm - dữ liệu không thể hiện), lượng dư CPV VP2 được phát hiện trong dịch nổi/dịch phân giải từ các tế bào AI-ST 2015 đã gây nhiễm (xem Fig. 17). Fig. 17 chỉ ra rằng protein VP2 có thể được nhận biết trong dịch nổi và, vì vậy, được mong đợi là ở cấu hình được đòi hỏi (VLP) để sinh miễn dịch. Quan trọng là, việc giải phóng CAV-2 tái tổ hợp không đạt được khi trình tự khởi đầu CAG hoặc CMV5 đều có mặt trong cat-xet biểu hiện được đặt trong vùng E3. Điều này dường như là đặc hiệu trình tự do kích thước của cat-xet biểu hiện không vượt quá giới hạn kích thước bộ gen thí nghiệm quan sát được. Vì vậy, trình tự khởi đầu mới bắt nguồn từ EHV-4 theo sáng chế như p430 và p455 không chỉ tạo điều kiện cho sự biểu hiện gen chuyển, mà còn trợ giúp cho bước giải phóng virus quyết định.

Cuối cùng, IFA, FC và Dot Blot chứng tỏ sự biểu hiện của gen chuyển CPV VP2 với cường độ mạnh được dẫn hướng bởi trình tự khởi đầu EHV-4 bởi rCAV-2 ở các tế bào đã được gây nhiễm AI ST 2015. Các kết quả này xác nhận tính hữu dụng của trình tự khởi đầu EHV-4 ở vectơ khác ngoài EHV-1.

Cấu trúc rCAV-2 RabG (n):

Cấu trúc CAV-2 thứ hai được tạo ra bằng cách sử dụng trình tự khởi đầu mới p455 được dẫn hướng bởi EHV-4 theo sáng chế. rCAV-2 RabG(n) được lựa chọn do không quan sát thấy sự biểu hiện bởi tế bào bị nhiễm bằng cách sử dụng trình tự khởi đầu CMVie thông thường.

Mục tiêu của thí nghiệm này là để xác nhận hoạt tính của trình tự khởi đầu EHV-4 mới trong trường hợp rCAV-2 với gen chuyển thứ hai, RabG (protein màng) bằng cách xác định mức biểu hiện protein RabG được dẫn hướng bởi trình tự khởi đầu EHV-4 bởi các tế bào AI-ST 2015 được gây nhiễm rCAV-2 p455 RabG (n).

Phương pháp IFA và đếm tế bào theo dòng được dùng để đánh giá mức biểu hiện của RabG được dẫn hướng bởi trình tự khởi đầu EHV-4 ở các tế bào AI-ST 2015 đã được gây nhiễm rCAV-2. Sự biểu hiện của protein CAV-2 được dò bằng kháng thể đa dòng ở lợn được tiếp hợp với kháng-CAV-2 FITC (VMRD). Sự biểu hiện của protein RabG được dò bằng kháng thể đơn dòng ở chuột (Novus). Các protein CAV-2 và RabG dễ dàng được hiện màu bởi IFA và được phát hiện bằng FC ở các tế bào AI-ST 2015 đã được gây nhiễm rCAV-2 mang RabG (n) (ở 72h sau nhiễm).

Kết quả: Trong khi RabG dễ dàng được phát hiện ở các tế bào được gây nhiễm với rCAV-2 p455 RabG (xem các Fig 19B và C), sự biểu hiện này được phát hiện ở < 2,0% tế bào được gây nhiễm với rCAV-2 CMVie RabG ban đầu (xem Fig. 18). Không nhận thấy tín hiệu nào hoặc nhận thấy tín hiệu rất yếu ở các tế bào đã gây nhiễm với rCAV-2 với gen chuyển không tương ứng (xem Fig. 19B, CPV VP2, mà không tương ứng với kháng thể kháng RabG). Như được nhận thấy trên Fig. 19C về việc nhuộm màu kép, nhiều tế bào dương tính CAV-2 cũng dương tính đối với RabG.

Kết quả là, dữ liệu IFA và FC chứng tỏ sự biểu hiện của gen chuyển RabG được dẫn hướng bởi trình tự khởi đầu EHV-4 bởi rCAV-2 bởi các tế bào đã gây nhiễm AI ST. Các kết quả này cũng xác nhận tính hữu dụng của trình tự khởi đầu EHV-4 theo sáng chế ở vectơ khác ngoài EHV-1.

Ví dụ 7: Tạo ra, mô tả đặc điểm in vitro và thử nghiệm in vivo vaccin virus cúm A được tạo vectơ EHV-1 đơn giá (vaccin H3) cho lợn

Hemagglutinin virus cúm IAV lợn có kiểu huyết thanh H3 (SEQ ID NO 27)

(A/swine/Italy/7680/2001(H3N2), số truy cập GenBank: ABS50302.2) được chọn làm kháng nguyên để thử nghiệm cho nghiên cứu chủng ngừa ở lợn. Vacxin mới kháng IAV lợn có đặc điểm DIVA, ví dụ bằng cách phát hiện kháng thể kháng protein NP hoặc NA của IAV lợn ở động vật bị nhiễm chủng thực địa IAV lợn nhưng ở động vật chỉ được chủng ngừa bằng vacxin được mô tả ở đây do nó chỉ biểu hiện một protein HA của IAV lợn. Trình tự mã hóa của nó được tổng hợp và tạo dòng phụ tạo ra vectơ chuyển pU70-p455-H3-71K71, đặt H3 dưới sự kiểm soát của trình tự khởi đầu p455 mới và tín hiệu polyadenyl hóa 71pA mới và đóng khung cassette bằng các vùng tái tổ hợp để cài xen vào trong orf70 (Fig. 1 và 5).

Bằng cách gây đột biến *en-passant* sử dụng hệ thống tái tổ hợp RED cat-xet biểu hiện p455-H3-71 được cài xen trong orf70 của pRacH-SE để tạo ra pRacH-SE70-p455-H3

Tế bào PK/WRL được chuyển nhiễm với pRacH-SE70-p455-H3, virus tái tổ hợp rEHV-1 RacH-SE70-p455-H3 được tách khỏi và được tinh chế vết tan hai lần. (Fig. 6).

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

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

và sự biểu hiện HA và độ ổn định di truyền của đoạn cài xen mã hóa HA cùng với trình tự khởi đầu và trình tự polyA được xác nhận.

Hai điểm được thể hiện trên Fig. 8 là các sản phẩm sao chép được ủ với kháng thể đơn dòng Ai2G7 (trái) phát hiện đặc hiệu glycoprotein EHV-1 II (gpII) hoặc với kháng thể đa dòng thương mại từ thỏ (PA5-34930) tạo ra kháng hemagglutinin virut cúm có kiểu phụ H3 (phải). gpII được phát hiện ở tất cả các giống nuôi cấy tế bào bị nhiễm EHV-1 tái tổ hợp như dự kiến. Chiều dài đầy đủ H3 được phát hiện trong tất cả các tế bào bị nhiễm bởi các lần cấy chuyển khác nhau của rEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3 như mong đợi. Tính đặc hiệu của kháng huyết thanh H3 cũng được thể hiện bằng thử nghiệm thấm tách Westerns đối với các tế bào bị nhiễm EHV-1 RacH SE tái tổ hợp khác biểu hiện hemagglutinin virut cúm từ virut kiểu phụ H1, Fig. 14.

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

Để kiểm tra đặc tính của nó để làm vaccin được tạo vector ở lợn con, rEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3 được thử nghiệm trong nghiên cứu thử thách chủng ngừa. Cụ thể, lợn con không có tính miễn dịch kháng IAV lợn mà có nguồn gốc từ mẹ (không có kháng thể từ mẹ) được chủng ngừa hai lần bằng RacH-SE-70-p455-H3 ở liều là 1×10^7 TCID₅₀ trong cơ ở độ tuổi hai và năm tuần (chủng ngừa hai mũi, 2x EHV-1), hoặc chỉ ở độ tuổi năm tuần tuổi (chủng ngừa một mũi, 1x EHV-1). Nhóm không được chủng ngừa được sử dụng làm đối chứng âm và nhóm động vật được chủng ngừa lúc hai và năm tuần tuổi bằng vaccin IAV lợn vô hoạt có bán trên thị trường theo hướng dẫn của nhà sản xuất (nhưng trong các thời điểm chủng ngừa) được sử dụng làm đối chứng dương (vaccin chết). Lúc 8 tuần tuổi, tất cả các động vật ngoài đối chứng âm được thử thách bằng liều được sử dụng trong khí quản là 1×10^7 TCID₅₀ của chủng thử thách IAV lợn H3N2 (thể phân lập virut thực địa châu Âu R452-14 mà H3 của nó khác loại với kháng nguyên vaccin H3 được sử dụng trong RacH-SE-70-p455-H3). Các động vật không được chủng ngừa và không thử thách được sử dụng làm đối chứng âm, trong khi

các động vật không được chủng ngừa ngoài các động vật thử thách được sử dụng làm đối chứng lây nhiễm. Tại thời điểm và sau khi chủng ngừa và trước và sau khi thử thách, thân nhiệt được đo và mẫu máu được lấy tại các thời điểm khác nhau. Một ngày sau khi thử thách, một nửa số động vật mỗi nhóm bị giết và phổi được tính điểm theo mức độ tổn thương thường thấy đối với nhiễm IAV lợn, ba mẫu phổi từ mỗi phổi trái và phải được lấy từ mỗi động vật, tương ứng, để xác định nồng độ IAV lợn chuẩn lây nhiễm trong chất đồng nhất phổi, và dịch rửa phế quản phế nang (bronchioalveolar lavage fluid - BALF) được lấy mẫu. Quy trình tương tự được thực hiện với nửa số động vật còn lại trong mỗi nhóm ba ngày sau khi thử thách.

Khi đánh giá thân nhiệt tăng sau sử dụng virus thử thách IAV lợn, động vật không được chủng ngừa thể hiện thân nhiệt tăng khoảng 1°C 1 ngày sau khi thử thách. Việc thân nhiệt tăng 1 ngày sau khi thử thách được ngăn chặn đối với nhóm được chủng ngừa hai lần bằng vaccin RacH-SE-70-p455-H3 (Fig. 20).

Việc đánh giá điểm số phổi từ các động vật bị giết vào 1 hoặc 3 ngày sau thử thách virus IAV lợn cho thấy rằng đối chứng âm thể hiện không có tổn thương phổi điển hình đối với lây nhiễm IAV lợn, đối chứng lây nhiễm thể hiện tổn thương phổi trong khoảng trung bình là 6-7%, và liên quan đến các giá trị trung bình nhóm điểm số tổn thương phổi được giảm mạnh xuống còn một đến nhỏ hơn 4% đối với nhóm được chủng ngừa hai lần bằng vaccin RacH-SE-70-p455-H3 (Fig. 21).

Độ chuẩn IAV lợn trong phổi trung bình từ các động vật bị giết lúc 1 hoặc 3 ngày sau khi sử dụng virus thử thách IAV lợn đã cho thấy rằng đối chứng âm cho thấy không có IAV lợn trong các mẫu phổi, trong khi đó đối chứng lây nhiễm thể hiện nồng độ virus chuẩn trong mỗi g mô phổi trong khoảng lớn hơn 5 (ngày 3) đến lớn 7 logs (ngày 1). Hoàn toàn trái ngược, giá trị trung bình nhóm giảm mạnh đến khoảng hai logs hoặc nhỏ hơn đối với nhóm được chủng ngừa một lần bằng vaccin RacH-SE-70-p455-H3 và giảm đến mức không phát hiện được đối với nhóm được chủng ngừa hai lần bằng vaccin RacH-SE-70-p455-H3 (Fig. 22).

Khi thử nghiệm việc cảm ứng kháng thể trung hòa IAV lợn sau khi chủng ngừa, huyết thanh từ động vật được chủng ngừa một lần bằng vaccin RacH-SE-70-p455-H3 đã thể hiện độ chuẩn trung hòa nghịch đảo trong khoảng từ khoảng 160 ba tuần sau lần

chủng ngừa thứ nhất và huyết thanh từ động vật được chủng ngừa hai lần bằng vaccin RacH-SE-70-p455-H3 đã cho thấy độ chuẩn trung hòa là khoảng 2560 ba tuần sau khi chủng ngừa lần hai, trong khi huyết thanh từ các nhóm không được chủng ngừa có mức kháng thể trung hòa IAV lợn không phát hiện được (Fig. 22).

Khi xác định lượng xytokin tiền viêm IL-1 β trong BALF từ các động vật vào 1 hoặc 3 ngày sau khi thử thách IAV lợn, mức IL-1 β lớn hơn 100 pg/ml đến 900 pg/ml được phát hiện thấy ở ba trong bốn động vật thử nghiệm vào ngày 1, trong khi đó các mức này được giảm xuống 100-300 pg/ml IL-1 β đối với BALF từ động vật được chủng ngừa một lần bằng vaccin RacH-SE-70-p455-H3 và thậm chí còn giảm thêm xuống mức bằng 0 đến nhỏ hơn 100 pg/ml IL-1 β đối với tất cả các động vật được chủng ngừa hai lần bằng vaccin RacH-SE-70-p455-H3 (Fig. 23). Điều này cho thấy rằng việc chủng ngừa bằng vaccin RacH-SE-70-p455-H3 đã ngăn chặn hữu hiệu việc cảm ứng xytokin tiền viêm IL-1 β sau khi nhiễm IAV lợn.

Khi thử nghiệm việc kích thích lại tế bào máu đơn nhân ngoại vi (PBMCs) được lấy mẫu vào ngày thử nghiệm cứu 28 và sử dụng các kích thích khác nhau, việc kích thích PBMCs từ động vật không được chủng ngừa cho thấy số lượng nhỏ hơn $75/1 \times 10^6$ trong IFN γ -ELISpot không phụ thuộc vào kích thích được sử dụng (Fig. 24 A). PBMC của các động vật được nhận vaccin bất hoạt hai lần (vaccin chết) đã thể hiện số lượng khoảng $150/1 \times 10^6$ khi chúng được kích thích lại bằng nucleoprotein NP IAV lợn tái tổ hợp và số lượng khoảng $3000/1 \times 10^6$ trong IFN γ -ELISpot khi chúng được kích thích lại bằng chủng thử thách IAV lợn H3N2 R452-14, nhưng thể hiện không kích thích lại PBMC (mức số lượng $75/1 \times 10^6$ hoặc thấp hơn) khi HA IAV lợn tái tổ hợp hoặc virus EHV-1 được sử dụng (Fig. 24 B). Ngược lại, động vật được chủng ngừa một lần hoặc hai lần bằng vaccin RacH-SE-70-p455-H3 cũng thể hiện số lượng khoảng 200 (1x EHV-1) đến 300 (2x EHV-1)/ 1×10^6 trong IFN γ -ELISpot khi chúng được kích thích lại bằng chủng thử thách IAV lợn H3N2 R452-14, nhưng không kích thích lại PBMCs (mức số lượng là $75/1 \times 10^6$ hoặc thấp hơn) khi NP IAV lợn tái tổ hợp được sử dụng (Fig. 24 C và D). Khi virus EHV-1 được sử dụng để kích thích lại, động vật được chủng ngừa một lần hoặc hai lần bằng vaccin RacH-SE-70-p455-H3 đã thể hiện số lượng khoảng $300/1 \times 10^6$ trong IFN γ -ELISpot khi chúng được kích thích lại bằng vaccin

EHV-1 trong RacH-SE, và giá trị này còn được tăng đến số lượng lớn hơn $400/1 \times 10^6$ khi vacxin RacH-SE-70-p455-H3 biểu hiện H3 IAV lợn được sử dụng, tương ứng (Fig. 24 C và D). Do đó, khi HA IAV lợn tái tổ hợp được sử dụng để kích thích lại, chỉ có động vật được chủng ngừa một lần hoặc hai lần bằng vacxin RacH-SE-70-p455-H3 thể hiện số lượng khoảng 100-150 ($1 \times \text{EHV-1}$) đến 150-200 ($2 \times \text{EHV-1}$)/ 1×10^6 trong IFN γ -ELISpot (Fig. 24 C và D).

Ví dụ 8: Tạo ra, mô tả đặc điểm in vitro và thử nghiệm in vivo vacxin virus cúm A được tạo vector EHV-1 tứ giá cho lợn

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

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

Trình tự khởi đầu p430 mới được xác định được sử dụng để điều khiển sự biểu hiện của H1N1 IAV lợn ((A/swine/Gent/132/2005(H1N1), số truy cập GenBank: AFR76623.1). Do gen hemagglutinin trong thể phân lập virus này là có nguồn gốc từ IAV gia cầm nên nó được gọi là H1av. H1av được tổng hợp và tạo dòng phụ trong vector chuyển đổi với vùng cài xen orf1/3 để tạo ra pU1/3-p430-H1av-BGHKBGH. Việc biểu hiện của H1av được đặt dưới sự kiểm soát của trình tự khởi đầu p430 và tín hiệu polyA hormon tăng trưởng bò (BGH) và được đóng khung bằng các vùng tái tổ hợp để cài xen vào trong orf1/3 (Fig. 10).

Bằng cách gây đột biến *en-passant* sử dụng hệ thống tái tổ hợp RED cat-xet biểu hiện p430-H1av-BGH được cài xen trong orf1/3 của pRacH-SE để tạo ra pRacH-SE1/3-p430-H1av). Các tế bào PK/WRL được chuyển nhiễm với pRacH-SE1/3-p430-H1av, virus tái tổ hợp rEHV-1 RacH-SE1/3-p430-H1av Fig. 11 được tách khỏi và được tinh chế vết tan hai lần. Việc cài xen chính xác cat-xet biểu hiện được xác nhận bằng cách

giải trình tự sản phẩm PCR độ trung thực cao của vùng cài xen. Việc biểu hiện của gen chuyển trong tế bào bị nhiễm được phân tích bằng thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang gián tiếp (IFA) và thẩm tách Western bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng và đa dòng có bán trên thị trường (Fig. 12). Việc khôi phục orf71 mã hóa EHV-1 gpII được xác nhận bằng IFA và thẩm tách Western bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng Ai2G7 (do BI sở hữu), (không được thể hiện). Việc xử lý chính xác và vận chuyển H1av và định vị trong màng sinh chất của tế bào bị nhiễm được thử nghiệm bằng thử nghiệm hấp phụ hem bằng cách sử dụng hồng cầu gà (không được thể hiện). Độ chuẩn cực đại được xác định là TCID₅₀/ml ở các tế bào PK/WRL là trong khoảng giống nhau như độ chuẩn của virus RacH-SE ban đầu mà chỉ ra rằng việc biểu hiện gen chuyển không gây ảnh hưởng bất lợi cho sự sao chép của virus (không được thể hiện).

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

Để kiểm tra hemagglutinin tái tổ hợp được biểu hiện được xử lý và vận chuyển như mong đợi hay không, các tế bào VERO được cho nhiễm rEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1av, rEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3, rEHV-1 RacH-SE (ban đầu) ở giá trị m.o.i. bằng 0.01, hoặc không bị nhiễm. 24 h p.i. tế bào bị nhiễm sống và không bị nhiễm được ủ với thể huyền phù của hồng cầu gà trong PBS, được rửa bằng PBS và được nhuộm bằng thuốc nhuộm nhân Hoechst 33342 huỳnh quang. Do hồng cầu của gia cầm chứa nhân tế bào nên chúng có thể được nhuộm bằng Hoechst33342 và xuất hiện như những đốm nhỏ màu xanh bằng hiển vi huỳnh quang, so sánh với các tế bào bị nhiễm rEHV-1 RacH-SE mà không biểu hiện hemagglutinin, việc hấp phụ của hồng cầu gà tăng lên đáng kể trên các tế bào bị nhiễm rEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1av hoặc rEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3 (không được thể hiện). Từ đó có thể kết luận rằng hemagglutinin được dịch mã, xử lý và vận chuyển đến màng sinh chất của tế bào bị nhiễm virus vector theo cách như thể chúng được tạo ra bằng việc sao chép nhiễm virus cúm đích thực. Kiểu hình rõ ràng của việc hấp phụ hem của tế bào bị nhiễm hỗ trợ cho phát hiện của các thử nghiệm thẩm tách Westerns và miễn dịch huỳnh quang (đối với H1av, Fig. 12)

thể hiện sự biểu hiện hiệu quả của protein chuyển gen và đề xuất việc hình thành trimer HA chức năng trên tế bào của tế bào bị nhiễm vectơ EHV-1.

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

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

Bắt đầu bằng BAC pRacH-SE-70-p455-H3 tái tổ hợp, cat-xet biểu hiện p430-H1av-BGH khi được lắp ráp trong vectơ chuyển pU1/3-p430-H1av-BGH_K_BGH (Fig. 10) được cài xen vào trong vị trí cài xen orf1/3 bằng tái tổ hợp RED hai bước để tạo ra pRacH-SE-1/3-p430-H1av-70-p455-H3. Các tế bào PK/WRL được chuyển nhiễm với pRacH-SE-1/3-p430-H1av-70-p455-H3, và virus tái tổ hợp rEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1av-70-p455-H3 được tách khỏi và được tinh chế vệt tan hai lần. Tên gọi ngắn của virus tái tổ hợp này là rEHV-1 RacH-SE_B (Fig. 13). Việc cài xen chính xác cat-xet biểu hiện được xác nhận bằng cách giải trình tự sản phẩm PCR độ trung thực cao của các vùng cài xen cùng với các trình tự kẹp sườn.

Việc biểu hiện của gen chuyển trong tế bào bị nhiễm được phân tích bằng thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang gián tiếp (IFA, không được thể hiện) và thử nghiệm thấm tách Western bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng và đa dòng có bán trên thị trường (Fig. 14). Việc khôi phục orf71 mã hóa EHV-1 gpII được khẳng định bằng IFA (không được thể hiện) và thấm tách Western bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng Ai2G7 (sở hữu của BI), (Fig. 14).

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

Vectơ EHV-1 được tăng cường với hai vị trí cài xen và hai vùng khởi đầu mới đã thể hiện là biểu hiện song song hai hemagglutinin virus cúm. Việc định vị dưới mức

tế bào như được xác định bằng IFA và khả năng di động trong SDS-PAGE như được xác định bằng thử nghiệm thấm tách Western tương ứng với hemagglutinin thực sự được biểu hiện ở tế bào bị nhiễm virus cúm A đã biết trong tài liệu.

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

Trình tự mã hóa của H1hu được tổng hợp và tạo dòng phụ trong vector chuyển cho vùng cài xen orf1/3 để tạo ra pU1/3-p430-H1hu-BGHKBGH. Việc biểu hiện của H1hu được đặt dưới sự kiểm soát của trình tự khởi đầu p430 và tín hiệu polyA hormon tăng trưởng bò (BGH) và được đóng khung bằng các vùng tái tổ hợp để cài xen vào trong orf1/3 (Fig. 25).

Trình tự mã hóa của H1pdm được tổng hợp và tạo dòng phụ tạo ra vector chuyển pU70-p455-H1pdm-71K71, đặt H1pdm dưới sự kiểm soát của trình tự khởi đầu mới p455 và tín hiệu polyadenyl hóa mới 71pA và đóng khung cat-xet bằng các vùng tái tổ hợp để cài xen vào trong orf70 (Fig. 26).

Tiếp theo, cat-xet biểu hiện p430-H1av-BGH và p455-H1pdm-71 được cài xen vào trong pRacH-SE bằng cách gây đột biến *en-passant* bằng cách sử dụng hệ thống tái tổ hợp RED, tạo rapRacH-SE-1/3-p430-H1hu thứ nhất. Bằng cách sử dụng BAC được cải biến làm đích, p455-H1pdm-71 được cài xen bằng cách gây đột biến *en-passant* sử dụng hệ thống tái tổ hợp RED, tạo ra pRacH-SE-1/3-p430-H1hu-70-p455-H1pdm. pRacH-SE-1/3-p430-H1hu-70-p455-H1pdm được chuyển nhiễm trong các tế bào PK/WRL và rEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1hu-70-p455-H1pdm được tách khỏi và được tinh chế vết tan ba lần. Tên gọi ngắn của virus vector tái tổ hợp là rEHV-1 RacH-SE_D (Fig. 27).

Việc biểu hiện của gen chuyển trong tế bào bị nhiễm được phân tích bằng thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang gián tiếp (IFA, không được thể hiện) và thử nghiệm thấm tách Western bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng và đa dòng có bán trên thị trường (Fig. 25). Việc khôi phục orf71 mã hóa EHV-1 gpII được khẳng định bằng IFA

(không được thể hiện) và thẩm tách Western bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng Ai2G7 (sở hữu của BI), (Fig. 28).

Độ ổn định di truyền và kiểu hình của rEHV-1 tái tổ hợp được thể hiện bằng cách cấy chuyển giống nuôi cấy tế bào, xác định nồng độ virus chuẩn mỗi 5 lần cấy chuyển. Các trình tự của các vùng cài xen được xác nhận mỗi lần cấy chuyển cũng như biểu hiện gen chuyển bằng thử nghiệm thẩm tách Western (không được thể hiện). Độ tin cậy biểu hiện được đánh giá bằng IFA kép các vết tan dưới việc xếp chồng methocel, các vết tan đếm được được nhuộm bằng kháng thể kháng EHV và kháng thể đặc hiệu gen chuyển (không được thể hiện).

Để nghiên cứu đặc tính của nó khi sử dụng làm vacxin được tạo vector ở lợn con non, vacxin IAV lợn tứ giá chứa rEHV-1 RacH-SE_B và rEHV-1 RacH-SE_D được thử nghiệm trong nghiên cứu thử thách chủng ngừa. Cụ thể, lợn con có tính miễn dịch có nguồn gốc từ mẹ kháng IAV lợn (dương tính với kháng thể từ mẹ) được chủng ngừa hai lần bằng rEHV-1 RacH-SE_B và rEHV-1 RacH-SE_D ở liều bằng 1×10^7 TCID₅₀ cho mỗi chủng vacxin trong cơ lúc một và bốn tuần tuổi (chủng ngừa hai mũi, 2x EHV-1) hoặc chỉ lúc bốn tuần tuổi (chủng ngừa một mũi, 1x EHV-1). Nhóm không được chủng ngừa dùng làm đối chứng âm. Lúc 11 tuần tuổi, tất cả các động vật ngoài đối chứng âm được thử thách bằng cách dùng trong khí quản liều lượng 1×10^6 TCID₅₀ của chủng thử thách IAV lợn H3N2 (thể phân lập virus thực địa châu Âu R452-14 mà H3 của nó khác loại với kháng nguyên vacxin H3 được sử dụng trong rEHV-1 RacH-SE_B). Các động vật không được chủng ngừa và không thử thách được sử dụng làm đối chứng âm, trong khi các động vật không được chủng ngừa ngoài các động vật thử thách được sử dụng làm đối chứng lây nhiễm. Tại thời điểm và sau khi chủng ngừa và trước và sau khi thử thách, thân nhiệt được đo và mẫu máu được lấy tại các thời điểm khác nhau. Một ngày sau khi thử thách, một nửa số động vật mỗi nhóm bị giết và phổi được tính điểm theo mức độ tổn thương thường thấy đối với nhiễm IAV lợn, ba mẫu phổi từ mỗi phổi trái và phải được lấy từ mỗi động vật, tương ứng, để xác định nồng độ IAV lợn chuẩn lây nhiễm trong chất đồng nhất phổi, và dịch rửa phế quản phế nang (bronchioalveolar lavage fluid - BALF) được lấy mẫu. Quy trình tương tự được thực hiện với nửa số động vật còn lại trong mỗi nhóm ba ngày sau khi thử thách. Nguyên

liệu mẫu và dữ liệu được thu thập được phân tích để xác định, trong số các thông số khác, sự thay đổi thân nhiệt sau khi thử thách, các triệu chứng lâm sàng sau khi nhiễm IAV lợn, điểm số phổi, độ chuẩn IAV lợn trong phổi, sự thay đổi mô học ở mô phổi, độ chuẩn trung hòa huyết thanh IAV lợn, mức xytokin trong BALF, việc kích thích lại PBMCS khi được đo bằng IFN γ -ELISpot, và hoạt hóa tế bào B.

Ví dụ 9: Cảm ứng đáp ứng kháng thể trung hòa kháng hai kháng nguyên ở chuột nhắt được chủng ngừa bằng vacxin vector rEHV-1 RacH nhị giá

rEHV-1 RacH SE B (rEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1av-7-p455-H3 xem Fig. 13) được sử dụng để gây miễn dịch cho chuột Balb/c để chứng tỏ rằng gen chuyển được biểu hiện sinh miễn dịch ở các loài khác lợn và kháng thể trung hòa được cảm ứng kháng một trong hai kháng nguyên bằng cách sử dụng trong mũi.

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

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

Các tế bào AI-ST được cho nhiễm ở tỷ lệ gây nhiễm (MOI) là 0,001 bằng rEHV-1 RacH-SE1212, virus được tách khỏi từ vector trống BAC pRacH-SE1.2. 24 giờ p.i. các mảng tan đặc biệt được quan sát và tế bào được xử lý cho thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang gián tiếp (IFA). Huyết thanh của cả ba nhóm máu cuối cùng (thu được 14 ngày sau khi chủng ngừa lần hai) được pha loãng 1:50 trong PBS được thử nghiệm. Để làm đối chứng dương huyết thanh từ ngựa được chủng ngừa EHV-1 được sử dụng với độ pha loãng là 1:500. Kháng thể thứ cấp có bán trên thị trường IgG thỏ được tiếp hợp FITC kháng chuột đối với huyết thanh chuột nhắt và IgG dê được tiếp hợp Cy5 kháng ngựa đối với huyết thanh ngựa và được sử dụng ở độ pha loãng là 1:200. Khả năng gắn kết kháng thể được đánh giá bằng hiển vi huỳnh quang. Tất cả các chuột được chủng

ngựa đã phát triển kháng thể phản ứng trong IFA với tế bào bị nhiễm rEHV-1 RacH-SE. Tế bào không bị nhiễm không được gắn kết bởi kháng nguyên thử nghiệm bất kỳ. Huyết thanh từ nhóm chuột đối chứng âm không thể hiện gắn kết đặc hiệu cả với tế bào bị nhiễm và tế bào không bị nhiễm. Dữ liệu được tóm tắt trong bảng dưới đây.

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

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

Kháng thể thứ cấp	Đặc hiệu đối với				
FITC-dê kháng-	chuột nhắt	23	1:200	âm tính	âm tính
Cy5 dê kháng-	ngựa	24	1:200	âm tính	âm tính

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

Thử nghiệm trung hòa virus (Virus neutralization tests - VNT)

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

Thử nghiệm trung hòa virus cúm A:

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

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

Huyết thanh được làm bất hoạt bằng nhiệt và tương ứng trong hai và ban thử nghiệm độc lập, được pha loãng theo chuỗi với tỷ lệ 1:2 bắt đầu từ 1:16 đến 1:4096. IAV được pha loãng đến khoảng 100 TCID₅₀/phản ứng trung hòa. Phản ứng trung hòa được ủ trong 2 giờ ở 37°C, 5% CO₂. Việc chuẩn độ ngược virus được sử dụng được thực hiện bốn lần giống nhau. Môi trường tăng trưởng được loại bỏ và các tế bào MDCK được rửa bằng môi trường chứa Gentamycin và trypsin trước khi bổ sung phản ứng trung hòa hoặc sản phẩm pha loãng virus của chuẩn độ ngược. VNT và các đĩa chuẩn độ được ủ ở 37°C /5% CO₂ trong 1 giờ sau khi bổ sung tương ứng phản ứng trung hòa hoặc sản phẩm pha loãng virus vào tế bào MDCK. Sau đó, dịch chủng ngừa được loại bỏ và các tế bào được phủ bằng môi trường mới chứa Gentamycin và trypsin. Năm ngày p.i. CPE được theo dõi và ghi nhận. Nồng độ virus chuẩn được sử dụng thực tế trong thử nghiệm được tính là TCID₅₀/ml theo Reed và Munch và độ pha loãng mà tại đó huyết thanh thử nghiệm đã ngăn chặn việc cảm ứng CPE điển hình virus cúm được thông báo, xem các bảng dưới đây.

Bảng 4: Kết quả của VNT cúm H1avN1

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

Vecto trống-1	n.d.	n/a	âm tính	n/a	âm tính	n/a	n/a	n/a
Vecto trống-2	n.d.	n/a	âm tính	n/a	âm tính	n/a	n/a	n/a
Vecto trống-3	n.d.	n/a	âm tính	n/a	âm tính	n/a	n/a	n/a
Vecto trống-4	âm tính	n/a	âm tính	n/a	âm tính	n/a	n/a	n/a
Vecto trống-5	n.d.	n/a	âm tính	n/a	âm tính	n/a	n/a	n/a
Huyết thanh lợn đối chứng dương tính	32	n/a	n.d	n/a	n.d	n/a	n/a	n/a

Bảng 5: Kết quả của VNT cúm H3N2

H3N2	VNT#1		VNT#2		VNT#3		Khả năng trung hòa trung bình	SD (độ lệch tiêu chuẩn)
	16 TCID50/lỗ	khả năng	24 TCID50/lỗ	khả năng	15 TCID50/lỗ	khả năng		
chuột nhất	Mức pha loãng trung hòa nghịch đảo		Mức pha loãng trung hòa nghịch đảo		Mức pha loãng trung hòa nghịch đảo			
rEHV- 1 RacH SE B - 1	4096	65536	1024	24576	2048	30720	40277	22089
rEHV- 1 RacH SE B - 2	1024	16384	512	12288	128	1920	10197	7455
rEHV- 1 RacH SE B - 3	1024	16384	512	12288	256	3840	10837	6397
rEHV- 1 RacH SE B - 4	256	4096	256	6144	64	960	3733	2611
rEHV- 1 RacH	256	4096	128	3072	64	960	2709	1599

SE B - 5								
Vector trống-1	âm tính	n/a	âm tính	n/a	âm tính	n/a	n/a	n/a
Vector trống-2	âm tính	n/a	âm tính	n/a	âm tính	n/a	n/a	n/a
Vector trống-3	âm tính	n/a	âm tính	n/a	âm tính	n/a	n/a	n/a

Để so sánh kết quả của các thử nghiệm độc lập khả năng trung hòa được tính bằng cách nhân độ pha loãng huyết thanh nghịch đảo và độ chuẩn tương ứng mà nó được trung hòa bởi huyết thanh này. Sau đó lấy giá trị trung bình của ba thử nghiệm chia cho 100 để phản ánh giá trị trung hòa của 100 TCID₅₀. (Các bảng 3, 4, và 5). Dữ liệu được tóm tắt và thể hiện dưới dạng đồ thị trong Fig. 29.

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

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

Ví dụ 10: Tạo ra, mô tả đặc điểm in vitro và thử nghiệm in vivo vacxin virut Schmallerberg (SBV) được tạo vector EHV-1 cho gia súc

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

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

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

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

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

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

GCGGCCGCATGAAGGCGATCCTGGTTGTGCTGCTGTACACCTTTGCC
 ACCGCCAACGCCGATACGCTGATCAACTGCAAGAACATCCAGAGCACCCA
 GCTGACAATCGAGCACCTGAGCAAGTGCATGGCCTTCTACCAGAACAAGA
 CCAGCAGCCCCGTCGTGATCAACGAGATCATCTCCGACGCCAGCGTGGAC
 GAACAGGAAGTATTAAAGTCTCTGAACCTGAACTGCAACGTGATCGACCG
 GTTCATCAGCGAGTCCAGCGTGATCGAGACACAGGTGTACTACGAGTATA
 TCAAGAGCCAGCTGTGTCCACTGCAAGTGCACGATATCTTCACCATCAAC
 AGCGCCAGCAACATCCAGTGGAAGGCCCTGGCCCGCAGCTTTACCCTGGG
 CGTGTGCAACACCAACCCCCACAAGCACATCTGCCGGTGCCTGGAATCCA
 TGCAGATGTGTACCAGCACCAAGACCGACCACGCCAGAGAGATGAGCATC
 TACTACGACGGCCACCCCGACAGATTCGAGCACGACATGAAGATTATCCT
 GAATATCATGCGGTACATCGTGCCCGGCCTGGGCAGAGTGCTGCTGGACC
 AGATCAAGCAGACCAAGGACTACCAGGCCCTGAGACACATCCAGGGCAA
 GCTGAGCCCCAAGTCCCAGAGCAACCTGCAGCTGAAGGGCTTCCTGGAAT
 TCGTGGACTTCATCCTGGGCGCCAACGTGACCATTGAGAAAACCCCCCAG
 ACCCTGACCACCCTGAGCCTGATTCATATGGGAGGTTCCGGAGGTGGAGG
 TTCCGGAGGTGGAGGTTCGGAGGTGGCACCATACTGGCCATTTACAGCA
 CAGTTGCGAGCAGCCTGGTCCTGATCGTGAGCCTGGGTGCTATATCATTCT
 GGATGTGCAGCAACGGCTCTCTCCAGTGCCGCATCTGTATCTGAGGTACC

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

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

T*CTAGACTCGAGCGCAAGCCCTACACGCGCTACCCCTGCTTTCAAC
 GCGTCAACCTGCACATTGACGGGGAGTTTCTGGTTCACAAGATGCTAGCG
 TTCAATGCCGCGATGCGCCCATCGGCCGAGGAGCTGCTGTCATACCCAAT
 GTTTGCTCAACTTTAGGATGACTAACCTGTTTCTGGGAGGAGACAGCGTGG
 GCGACGGTGTATAAAGTTGGTCTGCTTTCAAGCCCTGCCACTGCGCTACAG

TGCCACCAACTGTAAAGCGGTAGTAAGCTGCAGTGGTCGACTGGTGGTAG
CATATACTACCTTATTTATACGCTCCGAGCTGTTTTTCAGCATGCTAGCAC
CCAACGCCGAGCGAGAGTATATAACTCCCATCATTGCCCACAAGCTTATG
CCTTATTAGCGTCCGCTCTGCCGTTTGCTTAGTCATAATATCTACCGCC
GTTTACGCAGCAGACGCTATCTGCGACACAATTGGATTTGCGATACCGCG
CATGTGGATGTGTATTTTAATGAGATCAACCTCCATGAAGCGTAACTAGGG
GGCCTCCCCTGAGGCACTACCGGCTTAGCAGCTGACTAACACAGTATAA
AACGTGAGAAGAAATCAGTCTCATGCGCCATTAGCGCTAGGCTAGTTAGC
GTGGAGGACCGGAGCGCTACCGCCAGCAGTTTCATCCGCCTGGTTACGGG
TTTGTTAACACCTACCGGTGTTTTACCGCTACCATAGGATCCGATCCATGG
GCGGCCGCATGAAGGCGATCCTGGTTGTGCTGCTGTACACCTTTGCCACCG
CCAACGCCGATACGCTGATCAACTGCAAGAACATCCAGAGCACCCAGCTG
ACAATCGAGCACCTGAGCAAGTGCATGGCCTTCTACCAGAACAAGACCAG
CAGCCCCGTCGTGATCAACGAGATCATCTCCGACGCCAGCGTGGACGAAC
AGGAACTGATTAAGTCTCTGAACCTGAACTGCAACGTGATCGACCGGTTT
ATCAGCGAGTCCAGCGTGATCGAGACACAGGTGTACTACGAGTATATCAA
GAGCCAGCTGTGTCCACTGCAAGTGCACGATATCTTCACCATCAACAGCG
CCAGCAACATCCAGTGGAAGGCCCTGGCCCGCAGCTTTACCCTGGGGCGTG
TGCAACACCAACCCCCACAAGCACATCTGCCGGTGCCTGGAATCCATGCA
GATGTGTACCAGCACCAAGACCGACCACGCCAGAGAGATGAGCATCTACT
ACGACGGCCACCCCGACAGATTCGAGCACGACATGAAGATTATCCTGAAT
ATCATGCGGTACATCGTGCCCGGCCTGGGCAGAGTGCTGCTGGACCAGAT
CAAGCAGACCAAGGACTACCAGGCCCTGAGACACATCCAGGGCAAGCTG
AGCCCCAAGTCCCAGAGCAACCTGCAGCTGAAGGGCTTCCTGGAATTCGT
GGACTTCATCCTGGGGCGCCAACGTGACCATTGAGAAAACCCCCCAGACCC
TGACCACCCTGAGCCTGATTCATATGGGAGGTTCCGGAGGTGGAGGTTCC
GGAGGTGGAGGTTCCGGAGGTGGCACCATACTGGCCATTTACAGCACAGT
TGCGAGCAGCCTGGTCCTGATCGTGAGCCTGGGTGCTATATCATTCTGGAT
GTGCAGCAACGGCTCTCTCCAGTGCCGCATCTGTATCTGAGGTACCAATAA
ACGCGGTATGTCTACCTTCAAGCCTATGATGAACGGATGTTTGGTGTTCG
GGCTATTATAACGCTCTTGAGTTTTATGCTATCTCTGGGAACATGCGAAAA

TTACAGGCGTGTGGTTCGGGATCCTAGGGATAACAGGGTAATCGATTTATT
 CAACAAAGCCACGTTGTGTCTCAAAATCTCTGATGTTACATTGCACAAGAT
 AAAAATATATCATCATGAACAATAAACTGTCTGCTTACATAAACAGTAA
 TACAAGGGGTGTTATGAGCCATATTCAACGGGAAACGTCTTGCTCGAGGC
 CGCGATTAAATTCCAACATGGATGCTGATTTATATGGGTATAAATGGGCTC
 GCGATAATGTCGGGCAATCAGGTGCGACAATCTATCGATTGTATGGGAAG
 CCCGATGCGCCAGAGTTGTTTCTGAAACATGGCAAAGGTAGCGTTGCCAA
 TGATGTTACAGATGAGATGGTCAGACTAAACTGGCTGACGGAATTTATGC
 CTCTTCCGACCATCAAGCATTTTATCCGTACTCCTGATGATGCATGGTTAC
 TCACCACTGCGATCCCCGGGAAAACAGCATTCCAGGTATTAGAAGAATAT
 CCTGATTCAGGTGAAAATATTGTTGATGCGCTGGCAGTGTTCTGCGCCGG
 TTGCATTTCGATTCCTGTTTGTAATTGTCCTTTTAACAGCGATCGCGTATTTT
 GTCTCGCTCAGGCGCAATCACGAATGAATAACGGTTTGGTTGATGCGAGT
 GATTTTGTATGACGAGCGTAATGGCTGGCCTGTTGAACAAGTCTGGAAAGA
 AATGCATAAGCTTTTGCCATTCTCACCGGATTCAGTCGTCACCTCATGGTGA
 TTTCTCACTTGATAACCTTATTTTTGACGAGGGGAAATTAATAGGTTGTAT
 TGATGTTGGACGAGTCGGAATCGCAGACCGATAACCAGGATCTTGCCATCC
 TATGGAAGTGCCTCGGTGAGTTTTCTCCTTCATTACAGAAACGGCTTTTTT
 AAAAATATGGTATTGATAATCCTGATATGAATAAATTGCAGTTTCATTTGA
 TGCTCGATGAGTTTTTCTAAAATAAACGCGGTATGTCTACCTTCAAGCCTA
 TGATGAACGGATGTTTGGTGTGTTGCGGCTATTATAACGCTCTTGAGTTT
 TGCTATCTCTGGGAACATGCGAAAATTACAGGCGTGTGGTTCGGGATCCG
 ACCCTGTTGGTGGGTGCGGTTGGACTCAGAATCTTGGCGCAGGCATGGAA
 GTTTGTCGGTGACGAAACATACGACACCATCCGCGCAGAAGCAAAGAATT
 TAGAGACCCACGTACCCTCAAGTGCTGCAGAGTCGT*CTAGA

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

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

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

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

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

bán rắn chứa 0,5% Methocel (Methyl cellulose Ph.Eur., Fluka 64632-500G) và 5%FBS (MEM-Methocel). Sau khi ủ ở 37°C/5%CO₂ trong hai đến ba ngày (cấy chuyển lần 1), các vết tan riêng rẽ, nếu có thể, nằm ở xa các vết tan lân cận được hút với thể tích 10 µl và được nuôi cấy trong môi trường tế bào AI-ST mới trong các đĩa 6 lỗ. Các tế bào bị nhiễm được ủ trong hai đến ba ngày cho đến khi thấy có CPE lớn (lần cấy chuyển 2). Các tế bào được súc rửa vào môi trường và thu gom để lưu trữ ở -80°C. Quy trình tinh chế vết tan này được lặp lại hai lần. Các tế bào AI-ST bị nhiễm virus được tinh chế vết tan ba lần được xử lý để lần lượt dùng cho thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang gián tiếp (IFA) hoặc thâm tách Western.

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

Thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang gián tiếp

Các tế bào AI-ST trong các đĩa 24 lỗ (Corning Incorporated – Life Sciences, One Becton Circle, Durham, NC 27712, USA; REF 353047) được nhiễm virus tinh chế vết tan ba lần mà đã được pha loãng theo chuỗi trong MEM. Môi trường sinh trưởng được hút ra khỏi các tế bào và các tế bào được phủ bằng 250 µL virus pha loãng (mức độ pha loãng là 10⁻² đến 10⁻⁷). Các tế bào được ủ trong 1 giờ ở 37°C/5%CO₂ để hấp thụ virus, sau đó dịch chủng ngừa được loại bỏ và các tế bào được phủ bằng 1000µL MEM-Methocel/lỗ và được ủ ở 37°C/5%CO₂ trong 2 ngày. Khi sự tạo thành vết tan được quan sát bằng kính hiển vi, các tế bào được xử lý để IFA. Môi trường được hút ra và các tế bào được rửa một lần bằng 1ml PBS (Gibco Life Technologies, Paisley PA49RF, UK, DPBS (1x) REF 14190-136) /lỗ. PBS được loại bỏ và các tế bào được cố định bằng cách bổ sung vào mỗi lỗ 1ml etanol lạnh ở -20°C (Carl Roth GmbH, Schoemperlenstr. 3-5, D-76185 Karlsruhe, Art. Nr. 5054.1) và ủ trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng. Etanol được hút ra và các tế bào được làm khô bằng không khí. Sau khi tái hydrat hóa các tế bào bằng 1ml PBS/lỗ trong 10 phút ở nhiệt độ trong phòng, các kháng thể sơ cấp được pha loãng trong PBS được bổ sung (150 µl/lỗ) và ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Các kháng thể sơ cấp được loại bỏ và tế bào được rửa ba lần trong 2 phút bằng

1ml PBS/lỗ trước khi bổ sung dịch pha loãng kháng thể thứ cấp (150 μ l/lỗ). Sau 1 giờ ủ ở nhiệt độ trong phòng được bảo vệ tránh ánh sáng, các dịch pha loãng kháng thể thứ cấp được loại bỏ và tế bào được rửa ba lần trong 2 phút bằng 1ml PBS/lỗ và cuối cùng được phủ 500 μ l PBS/lỗ để kiểm tra bằng kính hiển vi huỳnh quang. Các kháng thể được sử dụng được liệt kê trong bảng 7.

Bảng 7

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

Thẩm tách Western

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

2. Chuẩn bị sản phẩm phân giải: Dung dịch đệm RIPA được bổ sung hỗn hợp chất ức chế proteaza (RIPA+PI) được chuẩn bị như sau: 0,7ml 10x dung dịch đệm phân giải RIPA Millipore Cat#20-188 được bổ sung vào 6,3ml H₂O, Fisher Scientific Cat# BP2470-1, và 1 viên nén hỗn hợp chất ức chế Mini Protease CompleteTM (Roche cat#11836 153 001) được hòa tan trong 7 ml dung dịch đệm 1xRIPA. Đối chứng không bị nhiễm được loại bỏ vào môi trường và huyền phù từ ba lỗ sao chép được gộp lại trong các ống ly tâm dung tích 15ml và được đặt trên đá. Các tế bào bị nhiễm được súc rửa trong môi trường và huyền phù từ ba lỗ bản sao được gộp lại vào

trong ống ly tâm dung tích 15 ml và đặt trên đá. Các tế bào được lắng đọng bằng cách ly tâm ở tốc độ 1000xg ở 4°C trong 5 phút. Dịch nổi được cẩn thận hút ra và viên kết tế bào được tái tạo huyền phù trong RIPA +PI (các tế bào không bị nhiễm trong 300 µl, các tế bào bị nhiễm trong 150 µl). Các huyền phù được ủ trên đá trong 30 phút và xoáy mạnh mỗi 10 phút. Các huyền phù được chuyển vào các ống ly tâm dung tích 1,5 ml và vật liệu không được hòa tan được lắng đọng bằng cách ly tâm ở tốc độ 15000 vòng/phút, 4°C, trong 10 phút trong máy vi ly tâm. Dịch nổi tế bào được chuyển vào các ống ly tâm dung tích 1,5 ml mới và được lưu trữ ở -80°C cho đến khi sử dụng.

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

Ủ và phát hiện kháng thể

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

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

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

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

Chuẩn độ virus

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

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

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

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

Động vật và thiết kế thử nghiệm

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

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

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

Phương thức thử nghiệm đã được xem xét kỹ bởi ủy ban nguyên tắc xử thế quốc gia và được phê chuẩn bởi cơ quan có thẩm quyền (Cơ quan nông nghiệp, an toàn thực phẩm và thủy sản của Mecklenburg-Vorpommern, Rostock, Germany, ref. LALLF M-VTSD/7221.3-1.1-004/12).

Quan sát trên lâm sàng và phát hiện ARN virus

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

Bắt đầu từ ngày một hoặc ngày hai sau lây nhiễm thử thách, ARN virus có thể phát hiện được trong các mẫu huyết thanh của mỗi con vật đối chứng không được chủng ngừa trong bốn ngày liên tiếp. Tất cả các con vật được chủng ngừa từ nhóm rEHV-SBV-Gc đều thể hiện nồng độ ARN virus giảm bằng RT-PCR định lượng (fig. 31A) trong suốt toàn bộ thời gian lấy mẫu. Hai con vật của nhóm rEHV-SBV-Gc được kiểm

tra hoàn toàn âm tính bởi RT-PCR định lượng (fig. 31A) trong suốt toàn bộ thời gian lấy mẫu. Ở hai con vật được gây miễn dịch bằng rEHV-SBV-Gc, hệ gen SBV được phát hiện ở mức giảm trong lần lượt ba hoặc năm ngày.

Đáp ứng kháng thể

Ở các con vật đối chứng không được chủng ngừa, không phát hiện thấy kháng thể đặc hiệu với SBV trong thử nghiệm trung hòa huyết thanh trước khi thử thách gây nhiễm. Từ một hoặc hai tuần sau khi gây nhiễm trở đi, độ chuẩn cao của các kháng thể trung hòa được phát hiện trên tất cả các con vật không được chủng ngừa (fig. 31B).

Ngược lại với nhóm đối chứng không được chủng ngừa, các kháng thể trung hòa đặc hiệu với SBV có thể phát hiện được vào ngày thử thách gây nhiễm ở hai trong số bốn con gia súc được gây miễn dịch bằng rEHV-SBV-Gc. Ở hai con vật còn lại trong nhóm này, không phát hiện được kháng thể trung hòa đặc hiệu với SBV trước khi thử thách gây nhiễm, nhưng từ hai tuần sau khi gây nhiễm, các kháng thể trung hòa lại có mặt (fig. 31B). Độ chuẩn của các kháng thể trung hòa đặc hiệu với SBV ở tất cả bốn con vật được chủng ngừa là thấp hơn ở đối chứng thử thách, điều này chỉ ra rằng sự sao chép virus của virus thử thách là kém hiệu quả hơn, và do đó hỗ trợ số liệu RT-PCR định lượng.

Thử nghiệm trung hòa EHV

Các dịch pha loãng hai lần của huyết thanh được chuẩn bị trong MEM, bắt đầu ở tỷ lệ 1:5. Năm mươi µl MEM chứa 100 TCID₅₀ của SBV và 50 µl huyết thanh đã pha loãng được ủ trong các đĩa nuôi cấy tế bào 96 lỗ trong 2 giờ. Sau đó, 100 µl huyền phù mới được chuẩn bị của tế bào BHK (trong MEM chứa 10% huyết thanh thai bò) được bổ sung và các đĩa nuôi cấy được ủ trong 3–4 ngày ở 37°C/5%CO₂. Tác động gây bệnh tế bào được đánh giá bằng hiển vi quang học. Tất cả các huyết thanh được thử nghiệm với hai bản sao giống nhau, và độ chuẩn kháng thể được tính dưới dạng ND₅₀ theo Kaerber (1931) như được cải biến bởi Behrens (truyền thông cá nhân). Các kết quả như được thể hiện trên Fig. 32 chỉ ra rằng việc chủng ngừa gia súc bằng rEHV-1 RacH-SE-70-455-SBVGc dẫn đến sự sao chép virus vector đủ hiệu quả để gây cảm ứng đáp

ứng miễn dịch đặc hiệu. Ở một trong số bốn con vật EHV-1, độ chuẩn kháng thể trung hòa rất thấp (1:4) có thể phát hiện được ba tuần sau khi chủng ngựa lần đầu. Sau hai lần chủng ngựa, ba tuần sau khi chủng ngựa lần hai, tất cả bốn con gia súc đều sản sinh kháng thể trung hòa ở độ chuẩn 1:128. Từ kết quả này, có thể kết luận rằng, EHV-1 RacH cũng có thể có chức năng như là vaccin vector trên gia súc.

Ví dụ 11: Hiệu quả của vaccin IAV lợn tứ giá chứa rEHV-1 RacH-SE_B và rEHV-1 RacH-SE_D kháng thử thách IAV lợn H3N2 ở lợn con

Để kiểm tra đặc điểm của nó khi làm vaccin được tạo vector ở lợn con non, vaccin IAV lợn tứ giá chứa rEHV-1 RacH-SE_B (rEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1av-70-p455-H3 xem Fig. 13) và rEHV-1 RacH-SE_D (rEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1hu-70-p455-H1pdm xem Fig. 27) được thử nghiệm trong nghiên cứu thử thách chủng ngựa thứ hai.

Trong nghiên cứu thứ hai này, lợn con từ lợn nái không được chủng ngựa và được thử nghiệm về mặt huyết thanh âm tính với kháng thể đặc hiệu IAV lợn bằng cách sử dụng ELISA đặc hiệu H3 (Fig. 36) và bằng thử nghiệm trung hòa virus (dữ liệu không được thể hiện) ở thời điểm chủng ngựa lần thứ nhất được chủng ngựa hai lần bằng vaccin tứ giá chứa rEHV-1 RacH-SE_B và rEHV-1 RacH-SE_D. Động vật được chủng ngựa lần thứ nhất trong tuần tuổi đầu tiên của nó (ngày nghiên cứu 0, SD0) và lần hai trong tuần tuổi thứ tư của nó (ngày nghiên cứu 21, SD21), tương ứng, trong cơ và sau đó trong cơ (2X IM), hoặc lần thứ nhất trong mũi và sau đó trong cơ (IN+IM), hoặc hai lần trong mũi (2X IN), ở liều là 1×10^7 TCID₅₀ trong liều 2 ml cho mỗi chủng vaccin, động vật, và chủng ngựa, tương ứng. Nhóm không được chủng ngựa dùng làm đối chứng âm và nhóm không được chủng ngựa khác dùng làm đối chứng thử thách ở tuần thứ bảy (các ngày nghiên cứu 69 hoặc 70, SD42/43), tất cả các con vật ngoài các con vật đối chứng âm được thử thách bằng cách dùng trong khí quản liều 2×10^7 TCID₅₀ của chủng thử thách IAV lợn H3N2 (thể phân lập virus thực địa châu Âu R452-14 mà H3 của nó khác loại với kháng nguyên vaccin H3 được sử dụng trong rEHV-1 RacH-SE_B). Các động vật không được chủng ngựa và không thử thách được sử dụng làm đối chứng âm (neg. ctrl.), trong khi các động vật không được chủng ngựa ngoài các

động vật thử thách được sử dụng làm đối chứng lây nhiễm (chall. ctrl.). Tại thời điểm và sau khi chủng ngừa và trước thử thách, mẫu máu được lấy ở các thời điểm khác nhau.

Một ngày sau khi thử thách, một nửa số động vật mỗi nhóm bị giết và ba mẫu phổi từ mỗi phổi trái và mỗi phổi phải tương ứng được lấy từ mỗi động vật. Sau đó, nồng độ IAV lợn chuẩn lây nhiễm cho mỗi gam chất đồng nhất phổi được xác định cho mỗi động vật là giá trị trung bình của các phổi trái và phải cho mỗi động vật mà mỗi mẫu thu được từ các chất đồng nhất của ba mẫu được cộng gộp từ mỗi phổi trái hoặc phải và được chuẩn hóa thành tổng khối lượng của ba mẫu của phổi trái hoặc phải tương ứng. Quy trình tương tự được thực hiện với nửa số động vật còn lại trong mỗi nhóm ba ngày sau khi thử thách. Đối với tất cả các nhóm được chủng ngừa, giá trị trung bình của nồng độ chuẩn của IAV lợn lây nhiễm thu được từ các động vật riêng rẽ trong nhóm được giảm đáng kể về mặt thống kê đối với các mẫu được lấy vào ngày một sau khi thử thách (CH+1) khi được so sánh với nhóm đối chứng âm lây nhiễm, trong khi tất cả các động vật từ nhóm đối chứng âm đã thể hiện không có nồng độ virus IAV lợn chuẩn lây nhiễm trong chất đồng nhất phổi (Fig. 33). Ngoài ra, đối với tất cả các nhóm được chủng ngừa, giá trị trung bình của nồng độ chuẩn của IAV lợn lây nhiễm thu được từ các động vật riêng rẽ trong nhóm được giảm đáng kể về mặt thống kê đối với các mẫu được lấy vào ngày ba sau khi thử thách (CH+3) khi được so sánh với nhóm đối chứng âm lây nhiễm, trong khi tất cả các động vật từ nhóm đối chứng âm đã thể hiện không có nồng độ virus IAV lợn chuẩn lây nhiễm trong chất đồng nhất phổi (Fig. 34). Vì thế, việc chủng ngừa bằng vaccin IAV lợn tứ giá chứa rEHV-1 RacH-SE_B và rEHV-1 RacH-SE_D đã giảm đáng kể về mặt thống kê tải lượng IAV lợn trong phổi ở thời điểm tương ứng là một và ba ngày sau khi thử thách bằng chủng IAV lợn H3N2 khác loại ở lợn con. Vì vậy, vaccin được mô tả ở đây có hiệu quả kháng IAV lợn ở lợn.

Hơn nữa, huyết thanh được lấy từ động vật thử nghiệm ở ngày nghiên cứu 0 (SD0, trước khi chủng ngừa lần thứ nhất), ở ngày nghiên cứu 21 (SD21, trước khi chủng ngừa lần hai), và ở các ngày nghiên cứu 42 hoặc 43 (SD42/43, trước khi dùng vật liệu thử thách) được phân tích bằng thử nghiệm hấp thụ miễn dịch được liên kết enzym (ELISA) đặc hiệu đối với globulin miễn dịch G (IgG) của lợn được dẫn hướng kháng được kháng nguyên H3 của IAV lợn biểu hiện tái tổ hợp mà tương đồng với H3 được

biểu hiện bởi chủng vaccin rEHV-1 RacH-SE_B. Trong khi các giá trị OD trung bình của huyết thanh từ nhóm đối chứng âm chỉ đưa ra các giá trị rất thấp đối với các thời điểm được đo, huyết thanh từ các nhóm được chủng ngừa đã chứng tỏ việc tăng mạnh các giá trị OD sau hai lần dùng trong cơ (2X IM; SD21 và SD42/43), sau khi dùng trong mũi lần thứ nhất và sau đó dùng trong cơ (IN+IM; SD42/43), và sau đó dùng trong mũi hai lần (2X IN; SD42/43); Fig. 36. Vì thế, việc chủng ngừa bằng vaccin IAV lợn tứ giá chứa rEHV-1 RacH-SE_B và rEHV-1 RacH-SE_D gây ra đáp ứng miễn dịch về mặt huyết thanh ở lợn con kháng hemagglutinin H3 IAV lợn được biểu hiện bởi chủng vaccin rEHV-1 RacH-SE_B, tương ứng.

Ngoài ra, tế bào đơn nhân máu ngoại vi (Peripheral blood mononuclear cells - PBMCs) được tinh chế từ máu được lấy từ động vật thử nghiệm vào ngày nghiên cứu 28 (SD28). Sau đó PBMC được kích thích lại bằng chủng thử thách IAV lợn H3N2 R452-14 ở tỷ lệ gây nhiễm là 1 (H3N2 MOI 1) hoặc bằng kháng nguyên H3 IAV lợn được biểu hiện tái tổ hợp mà tương đồng với H3 được biểu hiện bởi chủng vaccin rEHV-1 RacH-SE_B ở nồng độ là 1 µg/ml (rH3 1 µg/ml). Bằng cách sử dụng PBMC được kích thích lại, thử nghiệm đốm hấp thụ miễn dịch được liên kết enzym đặc hiệu interferon gamma (IFN γ ELISpot) được thực hiện, và các giá trị thu được được chuẩn hóa đến 10⁶ tế bào và được tính là giá trị trung bình cho mỗi nhóm, tương ứng (Fig. 38). Trong khi PBMC được kích thích lại từ nhóm đối chứng lây nhiễm (được sử dụng làm đối chứng âm cho thử nghiệm này, động vật không được chủng ngừa) đã thể hiện các đốm trung bình cho nhóm nhỏ hơn 45 sau khi kích thích lại, PBMC kích thích lại từ động vật được chủng ngừa thể hiện các đốm trung bình cho mỗi nhóm trên 85 sau hai lần dùng trong cơ, lớn hơn 100 đốm sau khi dùng trong mũi lần thứ nhất và sau đó dùng trong cơ (IN+IM), và lớn hơn 150 đốm sau 2 lần dùng trong mũi (2X IN), và sau khi kích thích lại, tương ứng (Fig. 38). Vì thế, việc chủng ngừa bằng vaccin IAV lợn tứ giá chứa rEHV-1 RacH-SE_B và rEHV-1 RacH-SE_D gây ra đáp ứng miễn dịch tế bào ở lợn con kháng hemagglutinin H3 IAV lợn được biểu hiện bởi chủng vaccin rEHV-1 RacH-SE_B và kháng IAV lợn H3N2 R452-14 được sử dụng để lây nhiễm virus thử thách khác loài, tương ứng.

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

Ví dụ 12: Hiệu quả của vaccin iav lợn tứ giá chứa rEHV-1 RacH-SE_B và rEHV-1 RacH-SE_D kháng thử thách IAV lợn H3N2 ở lợn con có kháng thể thu được từ mẹ

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

Trong nghiên cứu thứ ba này, lợn con sinh ra được ăn sữa non và sữa của lợn nái mà được chủng ngừa hai lần trong khi mang thai bằng vaccin bất hoạt có bán trên thị trường kháng IAV lợn được sử dụng. Lợn con được thử nghiệm về mặt huyết thanh dương tính với kháng thể đặc hiệu IAV lợn bằng cách sử dụng ELISA đặc hiệu H3 (Fig. 37) và bằng cách sử dụng ELISA kháng thể đặc hiệu IAV lợn có bán trên thị trường (*IDEXX Influenza A (Virus Antibody Test)*®; IDEXX, Westbrook, Maine 04092, USA) theo hướng dẫn thử nghiệm của nhà sản xuất (data không được thể hiện) tại thời điểm chủng ngừa lần thứ nhất được chủng ngừa hai lần bằng vaccin tứ giá chứa rEHV-1 RacH-SE_B và rEHV-1 RacH-SE_D. Động vật được chủng ngừa lần thứ nhất trong tuần tuổi đầu tiên của nó (ngày nghiên cứu 0, SD0) và lần hai trong tuần tuổi thứ tư của nó (ngày nghiên cứu 21, SD21), tương ứng, trong cơ và sau đó trong cơ (2X IM), hoặc lần thứ nhất trong mũi và sau đó trong cơ (IN+IM), hoặc hai lần trong mũi (2X IN), ở liều là 1×10^7 TCID50 trong liều 2 ml cho mỗi chủng vaccin, động vật, và chủng ngừa, tương ứng. Nhóm không được chủng ngừa được sử dụng làm đối chứng âm và nhóm không được chủng ngừa khác được sử dụng làm đối chứng lây nhiễm. Trong tuần tuổi thứ mười một (các ngày nghiên cứu 69 hoặc 70, SD69/70), tất cả các động vật ngoài đối chứng âm được thử thách bằng cách dùng trong khí quản liều 2×10^7 TCID50 của chủng thử thách IAV lợn H3N2 (thể phân lập virus thực địa châu Âu R452-14 mà H3 của nó khác loài với kháng nguyên vaccin H3 được sử dụng trong rEHV-1 RacH-

SE_B). Các động vật không được chủng ngừa và không thử thách được sử dụng làm đối chứng âm (neg. ctrl.), trong khi các động vật không được chủng ngừa ngoài các động vật thử thách được sử dụng làm đối chứng lây nhiễm (chall. ctrl.). Tại thời điểm và sau khi chủng ngừa và trước thử thách, mẫu máu được lấy ở các thời điểm khác nhau.

Năm ngày sau khi thử thách động vật bị giết và ba mẫu phổi từ mỗi phổi trái và phổi phải được lấy từ mỗi động vật, tương ứng. Sau đó, nồng độ IAV lợn chuẩn lây nhiễm cho mỗi gam chất đồng nhất phổi được xác định cho mỗi động vật là giá trị trung bình của các phổi trái và phải cho mỗi động vật mà mỗi mẫu thu được từ các chất đồng nhất của ba mẫu được cộng gộp từ mỗi phổi trái hoặc phải và được chuẩn hóa thành tổng khối lượng của ba mẫu của phổi trái hoặc phải tương ứng. Đối với tất cả các nhóm được chủng ngừa, giá trị trung bình của nồng độ chuẩn của IAV lợn lây nhiễm thu được từ các động vật riêng rẽ trong nhóm được giảm đáng kể về mặt thống kê đối với các mẫu được lấy vào ngày năm sau khi thử thách (CH+5) khi được so sánh với nhóm đối chứng âm lây nhiễm, trong khi tất cả các động vật từ nhóm đối chứng âm đã thể hiện không có nồng độ virus IAV lợn chuẩn lây nhiễm trong chất đồng nhất phổi (Fig. 35). Vì thế, việc chủng ngừa bằng vacxin IAV lợn tứ giá chứa rEHV-1 RacH-SE_B và rEHV-1 RacH-SE_D đã giảm đáng kể tải lượng IAV lợn trong phổi lúc năm ngày sau khi thử thách bằng chủng IAV lợn H3N2 khác loài ở lợn con, tương ứng. Vì vậy, vacxin được mô tả ở đây có hiệu quả kháng IAV lợn ở lợn.

Hơn nữa, huyết thanh được lấy từ động vật thử nghiệm ở ngày nghiên cứu 0 (SD0, trước khi chủng ngừa lần thứ nhất), ở ngày nghiên cứu 21 (SD21, trước khi chủng ngừa lần hai), và ở các ngày nghiên cứu 35 (SD35, hai tuần sau khi chủng ngừa lần hai) được phân tích bằng thử nghiệm hấp thụ miễn dịch được liên kết enzym (ELISA) đặc hiệu đối với globulin miễn dịch G (IgG) của lợn được dẫn hướng kháng được kháng nguyên H3 của IAV lợn biểu hiện tái tổ hợp mà tương đồng với H3 được biểu hiện bởi chủng vacxin rEHV-1 RacH-SE_B. Trong khi các giá trị OD của huyết thanh từ nhóm đối chứng âm chỉ cho các giá trị rất thấp đối với SD21 và SD35, huyết thanh từ các nhóm được chủng ngừa đã chứng tỏ việc tăng mạnh các giá trị OD sau hai lần dùng trong cơ (2X IM; SD35), sau khi dùng trong mũi lần thứ nhất và sau đó dùng trong cơ (IN+IM; SD35), và sau hai lần dùng trong mũi (2X IN; SD35); Fig. 37. Vì thế, việc

chủng ngừa bằng vaccin IAV lợn tứ giá chứa rEHV-1 RacH-SE_B và rEHV-1 RacH-SE_D gây ra đáp ứng miễn dịch về mặt huyết thanh ở lợn con kháng hemagglutinin H3 IAV lợn được biểu hiện bởi chủng vaccin rEHV-1 RacH-SE_B, tương ứng.

Ngoài ra, tế bào đơn nhân máu ngoại vi (Peripheral blood mononuclear cells - PBMCs) được tinh chế từ máu được lấy từ động vật thử nghiệm vào ngày nghiên cứu 28 (SD28). Sau đó PBMC được kích thích lại bằng chủng thử thách IAV lợn H3N2 R452-14 ở tỷ lệ gây nhiễm là 1 (H3N2 MOI 1) hoặc bằng kháng nguyên H3 IAV lợn được biểu hiện tái tổ hợp mà tương đồng với H3 được biểu hiện bởi chủng vaccin rEHV-1 RacH-SE_B ở nồng độ là 1 µg/ml (rH3 1 µg/ml). Bằng cách sử dụng PBMC được kích thích lại, thử nghiệm đốm hấp thụ miễn dịch được liên kết enzym đặc hiệu interferon gamma (IFN γ ELISpot) được thực hiện, và các giá trị thu được được chuẩn hóa đến 10⁶ tế bào và được tính là giá trị trung bình cho mỗi nhóm, tương ứng (Fig. 39). Trong khi PBMC được kích thích lại từ nhóm đối chứng lây nhiễm (được sử dụng làm đối chứng âm cho thử nghiệm này, động vật không được chủng ngừa) đã thể hiện các đốm trung bình cho nhóm nhỏ hơn 15 sau khi kích thích lại, PBMC kích thích lại từ động vật được chủng ngừa thể hiện các đốm trung bình cho mỗi nhóm trên 30 sau hai lần dùng trong cơ, lớn hơn 55 đốm sau khi dùng trong mũi lần thứ nhất và sau đó dùng trong cơ (IN+IM), và lớn hơn 65 đốm sau 2 lần dùng trong mũi (2X IN), và sau khi kích thích lại, tương ứng (Fig. 39). Vì thế, việc chủng ngừa bằng vaccin IAV lợn tứ giá chứa rEHV-1 RacH-SE_B và rEHV-1 RacH-SE_D gây ra đáp ứng miễn dịch tế bào ở lợn con kháng hemagglutinin H3 IAV lợn được biểu hiện bởi chủng vaccin rEHV-1 RacH-SE_B và kháng IAV lợn H3N2 R452-14 được sử dụng để lây nhiễm virus thử thách khác loài, tương ứng.

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

Tất cả các chế phẩm và phương pháp được bộc lộ và yêu cầu bảo hộ ở đây có thể được tiến hành và thực hiện không cần thực nghiệm quá mức khi xem xét bộc lộ này. Trong khi chế phẩm và phương pháp theo sáng chế đã được mô tả liên quan đến các phương án ưu tiên, người có kỹ năng trong lĩnh vực sẽ hiểu rõ rằng, một số thay đổi có thể được áp dụng đối với chế phẩm và phương pháp và về các bước hoặc trình tự các bước của phương pháp được mô tả ở đây mà không đi chệch khỏi quan niệm, tinh thần và phạm vi bảo hộ của sáng chế. Cụ thể hơn nữa, rõ ràng là, một số tác nhân mà chúng có quan hệ cả về mặt hóa học và về mặt sinh lý có thể được thay thế cho các tác nhân được mô tả ở đây trong khi vẫn đạt được các kết quả tương tự hoặc giống hệt. Tất cả các thay thế và cải biến như vậy là hiển nhiên đối với người có kỹ năng trong lĩnh vực hình như nằm trong quan niệm, tinh thần và phạm vi của sáng chế như được xác định trong phần yêu cầu bảo hộ sau đây.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

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

1. Allwinn R, Geiler J, Berger A, Cinatl J, Doerr HW. 2010. Determination of serum antibodies against swine-origin influenza A virus H1N1/09 by immunofluorescence, haemagglutination inhibition, and by neutralization tests: how is the prevalence rate of protecting antibodies in humans? Med Microbiol Immunol. 199(2):117-21. doi: 10.1007/s00430-010-0143-4. Epub 2010 Feb 17.
2. Anonymous (2013). VMD authorizes SBV vaccine for use in the UK. The Veterinary record 172, 543
3. Anonymous (2015). Schmallerberg virus vaccine. The Veterinary record 177, 321
4. Bilk S, Schulze C, Fischer M, Beer M, Hlinak A, Hoffmann B (2012). Organ distribution of Schmallerberg virus RNA in malformed newborns. Veterinary microbiology 159, 236-238
5. Boshart M, Weber F, Jahn G, Dorsch-Häsler K, Fleckenstein B, Schaffner W. 1985. A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. Cell 41(2):521-30.
6. Bustin, S. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. Journal of Molecular Endocrinology 25(2): 169-193.
7. Charoensawan, V., Wilson, D., Teichmann, S.A. 2010. Genomic repertoires of DNA-binding transcription factors across the tree of life. Nucleic Acids Res. 38(21):7364-77
8. Colle, C.F. 3rd, O'Callaghan, D.J. 1995. Transcriptional analyses of the unique short segment of EHV-1 strain Kentucky A. Virus Genes;9(3):257-68.

9. Dorsch-Häsler, K., Keil, G.M., Weber, F., Jasin, M. Schaffner, W., and Koszinowski, U.H. 1985. A long and complex enhancer activates transcription of the gene coding for the highly abundant immediate early mRNA in murine cytomegalovirus. PNAS Vol. 82: 8325-8329.
10. Drummer, H.E., Studdert, M.J., Crabb, B.S. 1998. Equine herpesvirus-4 glycoprotein G is secreted as a disulphide-linked homodimer and is present as two homodimeric species in the virion. J. Gen. Virol. 79: 1205 -1213
11. Fields, B, Knipe, D.M.; and Howley, P.M. 2013. Virology. 6th ed. Philadelphia; Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams&Wilkins
12. Foecking, M.K., Hofstetter, H. 1986. Powerful and versatile enhancer-promoter unit for mammalian expression vectors. Gene 45(1):101-5.
13. Goodwin, E.C. & Rottman, F.M. 1992. The 3'flanking sequence of the bovine growth hormone gene contains novel elements required for efficient and accurate polyadenylation. J.Biol.Chem. 267: 16330-16334.
14. Hübner, P. H., Birkenmaier, S., Rziha, H.-J. and Osterrieder, N. (1996), Alterations in the Equine Herpesvirus Type-1 (EHV-1) Strain RacH During Attenuation. Journal of Veterinary Medicine, Series B, 43: 1–14. doi:10.1111/j.1439-0450.1996.tb00282.x
15. Kärber, G (1931) Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. Archiv f experiment Pathol u Pharmakol.;162:480–483
16. Kim, D.W., Uetsuki, T., Kaziro, Y., Yamaguchi, N., Sugano, S. 1990. Use of the human elongation factor 1 alpha promoter as a versatile and efficient expression system. Gene 16;91(2):217-23.
17. Kraatz F, Wernike K, Hechinger S, König P, Granzow H, Reimann I, Beer, M (2015). Deletion mutants of Schmallenberg virus are avirulent and protect from virus challenge. J Virol 89, 1825-1837
18. Luke, GA and Ryan, MD. 2013. The protein coexpression problem in biotechnology and biomedicine: virus 2A and 2A-like sequences provide a solution.Future Virology, Vol. 8, No. 10, Pages 983-996.

19. Ma, G., Eschbaumer, M., Said, A., Hoffmann, B., Beer, M., Osterrieder, N. 2012. An equine herpesvirus type 1 (EHV-1) expressing VP2 and VP5 of serotype 8 bluetongue virus (BTV-8) induces protection in a murine infection model. PLoS One. 2012;7(4):e34425. doi: 10.1371/journal.pone.0034425. Epub 2012 Apr 12.
20. Ma, G., Azab, W., Osterrieder, N. 2013. Equine herpesvirus type 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4)--masters of co-evolution and a constant threat to equids and beyond. Vet Microbiol. 167(1-2):123-34.
21. Nolan, T. Rebecca E Hands, R.E., and Bustin S.A. 2006. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR Nature Protocols 1: 1559 -1582
22. Osterrieder, N., Neubauer, A., Brandmüller, C., Kaaden, O.R., and O'Callaghan, D.J. 1996. The equine herpesvirus 1 IR6 protein influences virus growth at elevated temperature and is a major determinant of virulence. Virology 226:243-251.
23. Ptashne, M. 2014. *The Chemistry of Regulation of Genes and Other Things* The Journal of Biological Chemistry Vol. 289, (9) 5417–5435. Reed, L.J., and Muench, H. 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. Am. J. Hyg. (27) 3; 493-497.
24. Reed LJ and Muench H (1938). A simple method estimating fifty percent endpoints. The American Journal of Hygiene 27(3) 493-497
25. Rosas, C.T., König, P., Beer, M., Dubovi, E.J., Tischer, B.K., Osterrieder, N., 2007a. Evaluation of the vaccine potential of an equine herpesvirus type 1 vector expressing bovine viral diarrhoea virus structural proteins. J. Gen. Virol. 88 (3), 748–757.
26. Rosas, C.T., B.K. Tischer, G.A. Perkins, B. Wagner, L.B. Goodman, N. Osterrieder. 2007b . Live-attenuated recombinant equine herpesvirus type 1 (EHV-1) induces a neutralizing antibody response against West Nile virus (WNV) Virus Research, 125 , pp. 69–78.
27. Rosas, C.T., Van de Walle, G.R., Metzger, S.M., Loelzer, K., Dubovi, E.J., Kim, S.G., Parrish, C.R., Osterrieder, N., 2008. Evaluation of a vectored equine herpesvirus

type 1 (EHV-1) vaccine expressing H3 haemagglutinin in the protection of dogs against canine influenza. *vacxin* 26 (19), 2335–3234.

28. Said, A., Elke Lange, E., Beer, M. Damiani, A., Osterrieder, N. **2013**. Recombinant equine herpesvirus 1 (EHV-1) vaccine protects pigs against challenge with influenza A(H1N1)pmd09 *Virus Research* 173: 371– 376

29. **Sambrook J** and Russell DW (2001). *Molecular Cloning*, 3rd ed. Cold Spring harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; ISBN 978-087969-577-4

30. Shaner, N.C., Campbell, R.E., Steinbach, P.A., Giepmans, B.N., Palmer, A.E., Tsien, R.Y. **2004**. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol.* Dec;22(12):1567-72. Epub 2004 Nov 21.

31. Tischer, B.K., von Einem, J., Kaufer, B., Osterrieder, N., **2006**. Two-step red-mediated recombination for versatile high-efficiency markerless DNA manipulation in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Tech.* 40, 191-197.

32. Tischer, B.K., Kaufer, B.B., Sommer, M., Wussow, F., Arvin, A., and Osterrieder, N. A Self-Excisable Infectious Bacterial Artificial Chromosome Clone of Varicella-Zoster Virus Allows Analysis of the Essential Tegument Protein Encoded by *ORF9*, *J. Virol.* 81 (23), **2007**, 13200–13208.

33. Tischer, B.K, Smith, G.A.,and Osterrieder, N. in: Jeff Braman (ed.), *In Vitro Mutagenesis Protocols: Third Edition*, Methods in Molecular Biology, vol. 634, DOI 10.1007/978-1-60761-652-8_30, © Springer Science+Business Media, LLC **2010**, Chapter 30: *En Passant* Mutagenesis: A Two Step Markerless Red Recombination System.

34. Thompson, S.R. **2012**. Tricks an IRES uses to enslave ribosomes. *Trends Microbiol.* Nov;20(11):558-66.

35. Trapp, S., von Einem, J., Hofmann, H., Kostler, J., Wild, J., Wagner, R., Beer, M., Osterrieder, N., **2005**. Potential of equine herpesvirus 1 as a vector for immunization. *J. Virol.* 79, 5445-5454.

36. Trombetta CM, Perini D, Mather S, Temperton N, Montomoli E. **2014**. Overview of Serological Techniques for Influenza Vaccine Evaluation: Past, Present and Future. *Vaccines (Basel)* 13;2(4):707-34. doi: 10.3390/vacxin2040707.
37. Wellington, J.E., Allen, G.P., Gooley, A.A., Love, D.N., Packer, N.H., Yan, J.X., Whalley, J.M. **1996**. The highly O-glycosylated glycoprotein gp2 of equine herpesvirus 1 is encoded by gene 71. *J Virol.* 70(11):8195-8.
38. **Wernike** K, Aebischer A, Roman-Sosa G, Beer M, (2017). The N-terminal domain of Schmallenberg virus envelope protein Gc is highly immunogenic and can provide protection from infection. *Scientific reports*.2017 Feb 13;7:42500.
39. **Wernike** K, Eschbaumer M, Breithaupt A, Hoffmann B, Beer M (2012). Schmallenberg virus challenge models in cattle: infectious serum or culture-grown virus? *Veterinary research* 43, 84
40. **Wernike** K, Eschbaumer M, Schirrmeier H, Blohm U, Breithaupt A, Hoffmann B, Beer M, (2013a). Oral exposure, reinfection and cellular immunity to Schmallenberg virus in cattle. *Veterinary microbiology* 165, 155-159
41. **Wernike** K, Nikolin VM, Hechinger S, Hoffmann B, Beer M (2013b). Inactivated Schmallenberg virus prototype vaccines. *Vaccine* 31, 3558-3563

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Trình tự khởi đầu chứa trình tự có độ đồng nhất và/hoặc tương đồng về mặt trình tự ít nhất là 95% với SEQ ID NO: 1 (4pgG600), SEQ ID NO. 2 (4pMCP600), SEQ ID NO. 3 (p430), SEQ ID NO: 4 (p455), hoặc trình tự nucleotit bổ trợ của nó, trong đó trình tự khởi đầu này được liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự nucleotit khác loài quan tâm, gen quan tâm, và/hoặc trình tự mã hóa kháng nguyên quan tâm.
2. Trình tự khởi đầu theo điểm 1, trong đó trình tự khởi đầu được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, và trình tự nucleotit bổ trợ của nó.
3. Cat-xet biểu hiện chứa trình tự khởi đầu được chọn từ nhóm gồm các trình tự có độ đồng nhất và/hoặc tương đồng về mặt trình tự ít nhất là 95% với SEQ ID NO. 1 (4pgG600), SEQ ID NO. 2 (4pMCP600), SEQ ID NO. 3 (p430), SEQ ID NO: 4 (p455), và trình tự nucleotit bổ trợ của nó,
trong đó trình tự khởi đầu được liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự nucleotit quan tâm,
trong đó trình tự khởi đầu dẫn đến sự biểu hiện của trình tự nucleotit quan tâm,
nhờ đó trình tự khởi đầu đã nêu là trình tự khởi đầu khác loài, và/hoặc trình tự khởi đầu ngoại sinh.
4. Cat-xet biểu hiện theo điểm 3, trong đó trình tự khởi đầu được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, và trình tự nucleotit bổ trợ của nó.
5. Vector chứa cat-xet biểu hiện theo điểm 3.
6. Vector theo điểm 5, nhờ đó vector đã nêu là vector tái tổ hợp, và/hoặc vector khác loài, và/hoặc vector ngoại sinh.
7. Vector theo điểm 5, nhờ đó vector đã nêu là vector virus, được chọn từ nhóm gồm: Herpesviridae, Varicelloviruses, Adenoviridae (AdV), viridae có liên quan đến Adena, Baculoviridae, Lentiviridae.
8. Vector theo điểm 5, nhờ đó vector virus này là thành phần thuộc họ Herpesviridae, và/hoặc thuộc chi Alphaherpesvirinae, và/hoặc thuộc phân chi Varicellovirus, và/hoặc là Equid Alphaherpesvirus 1 (EHV-1).

9. Vector theo điểm 5, nhờ đó vector đã nêu chứa một hoặc nhiều trình tự điều hòa khác, tín hiệu polyadenyl hóa, yếu tố điều hòa IRES, và/hoặc yếu tố điều hòa peptit 2a.

10. Dòng tế bào chủ sinh vật nhân chuẩn chứa vector bao gồm trình tự khởi đầu được chọn từ nhóm gồm các trình tự có độ đồng nhất và/hoặc tương đồng về mặt trình tự ít nhất là 95% với SEQ ID NO. 1 (4pgG600), SEQ ID NO. 2 (4pMCP600), SEQ ID NO. 3 (p430), SEQ ID NO: 4 (p455), và trình tự nucleotit bổ trợ của nó,

trong đó trình tự khởi đầu được liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự nucleotit quan tâm, được chọn từ nhóm gồm: gen quan tâm, trình tự khác loài và/hoặc ngoại sinh quan tâm, hoặc trình tự mã hóa kháng nguyên quan tâm,

trong đó trình tự khởi đầu dẫn đến sự biểu hiện của trình tự nucleotit quan tâm,

nhờ đó trình tự khởi đầu này là trình tự khởi đầu khác loài, và/hoặc trình tự khởi đầu ngoại sinh,

trong đó dòng tế bào chủ đã nêu là dòng tế bào động vật có vú hoặc dòng tế bào côn trùng, được chọn từ nhóm gồm: dòng tế bào PK/WRL, dòng tế bào RK13, dòng tế bào MDBK, dòng tế bào ST, dòng tế bào AI-ST, dòng tế bào VERO, dòng tế bào Sf9, Sf21, dòng tế bào Sf plus, dòng tế bào MDCK, và/hoặc các dẫn xuất của nó.

11. Kit bao gồm

a. (các) tế bào chủ,

b. tùy ý (các) tác nhân chuyển nhiễm,

c. tờ hướng dẫn sử dụng, và

d. vector chứa trình tự khởi đầu được chọn từ nhóm gồm các trình tự có độ đồng nhất và/hoặc tương đồng về mặt trình tự ít nhất là 95% với SEQ ID NO. 1 (4pgG600), SEQ ID NO. 2 (4pMCP600), SEQ ID NO. 3 (p430), SEQ ID NO: 4 (p455), và trình tự nucleotit bổ trợ của nó,

trong đó trình tự khởi đầu được liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự nucleotit quan tâm, được chọn từ nhóm gồm: gen quan tâm, trình tự khác loài và/hoặc trình tự ngoại sinh quan tâm, hoặc trình tự mã hóa kháng nguyên quan tâm,

trong đó trình tự khởi đầu dẫn đến sự biểu hiện của trình tự nucleotit quan tâm,

nhờ đó trình tự khởi đầu là trình tự khởi đầu khác loại, và/hoặc trình tự khởi đầu ngoại sinh.

12. Phương pháp sản xuất vector, bao gồm các bước:

a. tạo ra trình tự khởi đầu chứa SEQ ID NO: 1 (4pgG600), SEQ ID NO. 2 (4pMCP600), SEQ ID NO. 3 (p430), SEQ ID NO: 4 (p455), hoặc trình tự nucleotit bổ trợ của nó, trong đó trình tự khởi đầu đã nêu dẫn đến sự biểu hiện của trình tự nucleotit quan tâm, và/hoặc trình tự mã hóa kháng nguyên quan tâm,

b. hợp nhất trình tự khởi đầu đã nêu ở bước a) vào bộ khung vector có nguồn gốc từ virut, được chọn từ nhóm gồm: Herpesviridae, varicelloviruses, Adenoviridae (AdV), Parvoviridae như virut có liên quan đến Adena, Baculoviridae, Retroviridae, và Poxviridae.

13. Phương pháp tạo ra tế bào chủ, bao gồm các bước:

a) gây nhiễm dòng tế bào chủ sinh vật nhân chuẩn tùy ý với vector chứa trình tự khởi đầu được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 1 (4pgG600), SEQ ID NO: 2 (4pMCP600), SEQ ID NO: 3 (p430), SEQ ID NO: 4 (p455), và trình tự nucleotit bổ trợ của nó và trình tự chức năng và các trình tự nucleotit bổ trợ của nó,

trong đó trình tự khởi đầu được liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự nucleotit quan tâm, được chọn từ nhóm gồm: gen quan tâm, trình tự khác loài và/hoặc ngoại sinh quan tâm, hoặc trình tự mã hóa kháng nguyên quan tâm,

trong đó trình tự khởi đầu này dẫn đến sự biểu hiện của trình tự nucleotit quan tâm, nhờ đó trình tự khởi đầu đã nêu là trình tự khởi đầu khác loài, và/hoặc trình tự khởi đầu ngoại sinh,

b) nuôi cấy các tế bào đã chuyển nhiễm ở bước a) trong các điều kiện thích hợp, và

c) tùy ý thu nhận tế bào chủ đã nêu.

14. Phương pháp điều chế chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vacxin để làm giảm tỷ lệ mắc phải hoặc mức độ nghiêm trọng của một hoặc nhiều dấu hiệu lâm sàng có liên quan đến hoặc được gây ra bởi sự nhiễm, bao gồm các bước sau:

a) gây nhiễm dòng tế bào chủ sinh vật nhân chuẩn tùy ý với vector chứa trình tự khởi đầu được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 1 (4pgG600), SEQ ID NO. 2 (4pMCP600), SEQ ID NO. 3 (p430), SEQ ID NO: 4 (p455), và trình tự nucleotit bổ trợ của nó và trình tự chức năng và trình tự nucleotit bổ trợ của nó,

trong đó trình tự khởi đầu được liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự nucleotit quan tâm, được chọn từ nhóm gồm: gen quan tâm, trình tự khác loài và/hoặc trình tự ngoại sinh quan tâm, hoặc trình tự mã hóa kháng nguyên quan tâm,

trong đó trình tự khởi đầu dẫn đến sự biểu hiện của trình tự nucleotit quan tâm,

nhờ đó trình tự khởi đầu đã nêu là trình tự khởi đầu khác loài, và/hoặc trình tự khởi đầu ngoại sinh,

b) nuôi cấy tế bào đã gây nhiễm ở bước a) trong các điều kiện thích hợp,

c) thu nhận tế bào quan tâm ở bước b) và/hoặc vector và/hoặc các hợp phần virus,

d) tùy ý tinh chế phần đã thu nhận ở bước c), và

e) trộn phần đã thu nhận này với chất mang được dùng.

Fig. 1

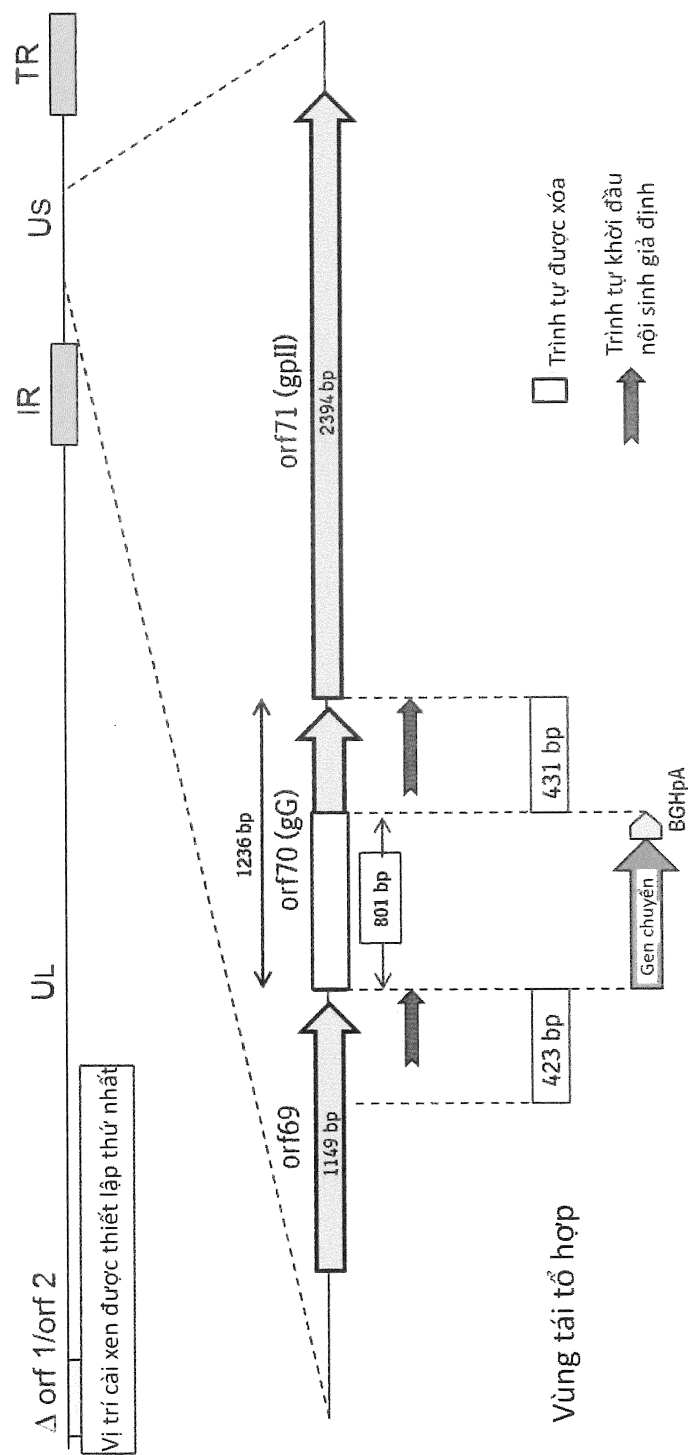


Fig. 2

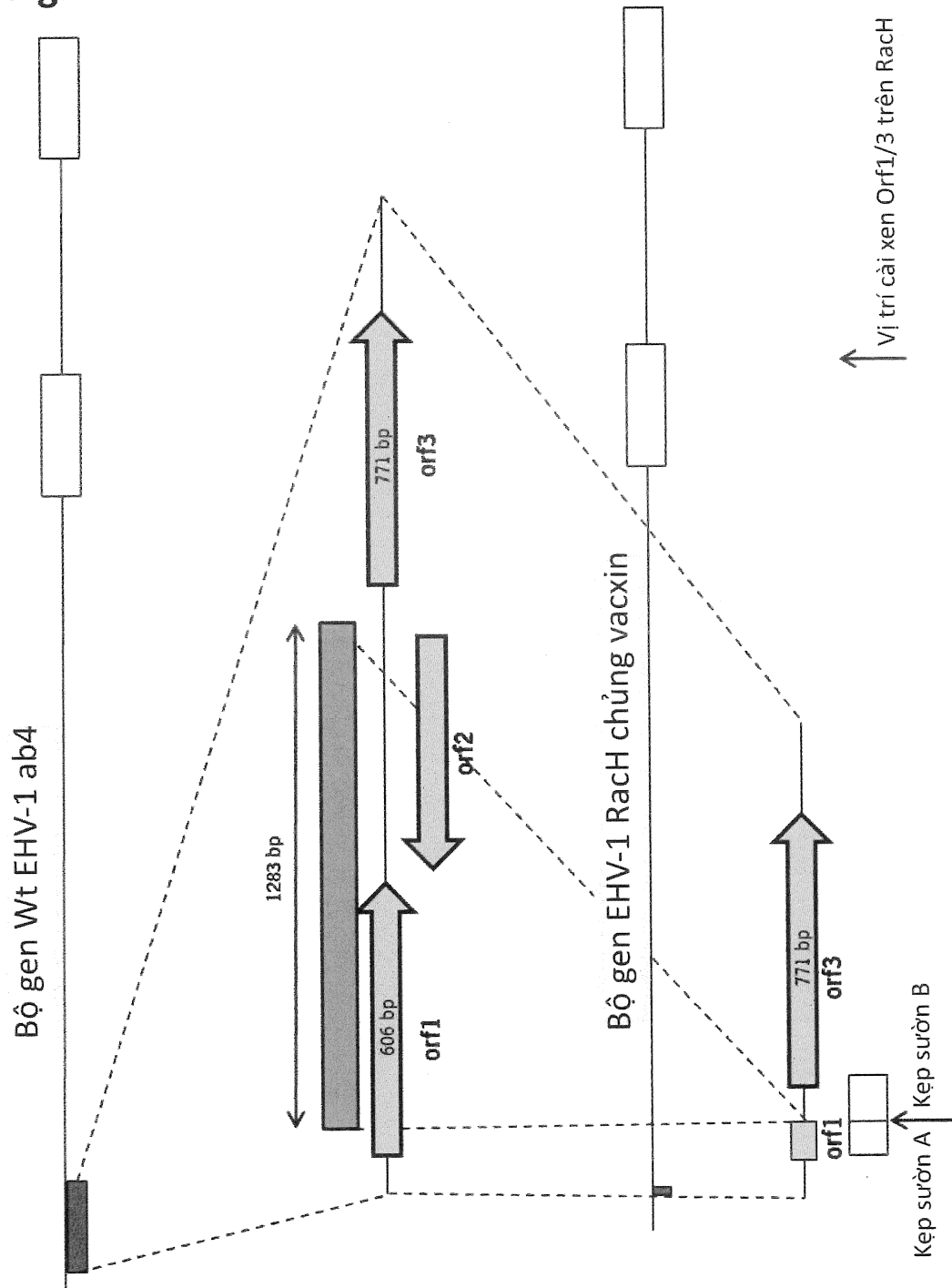


Fig. 3a

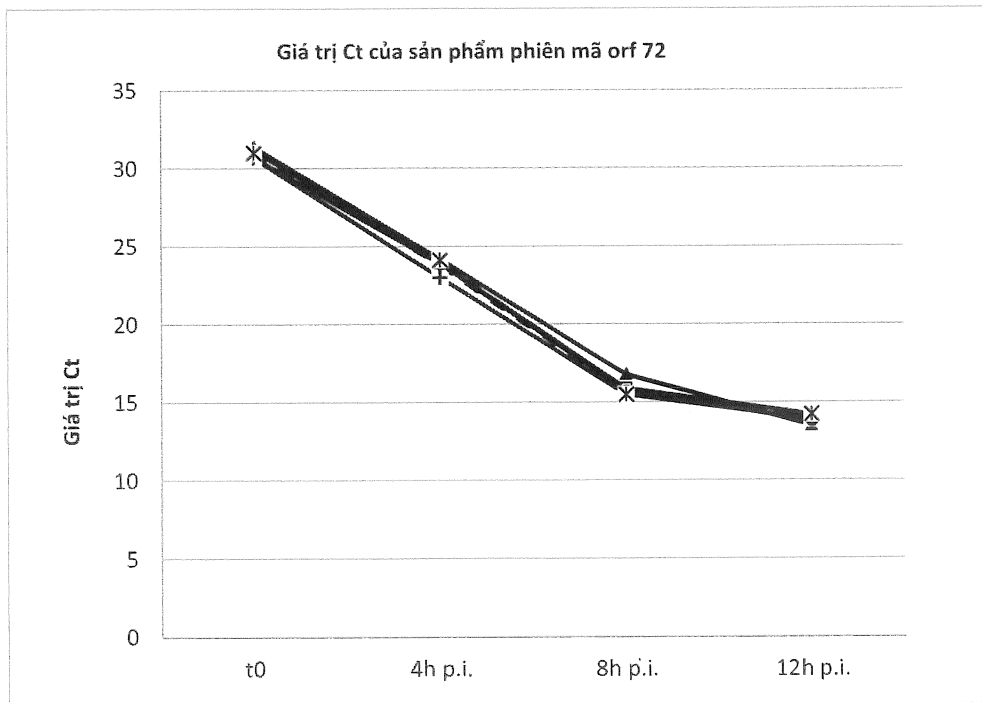


Fig. 3b

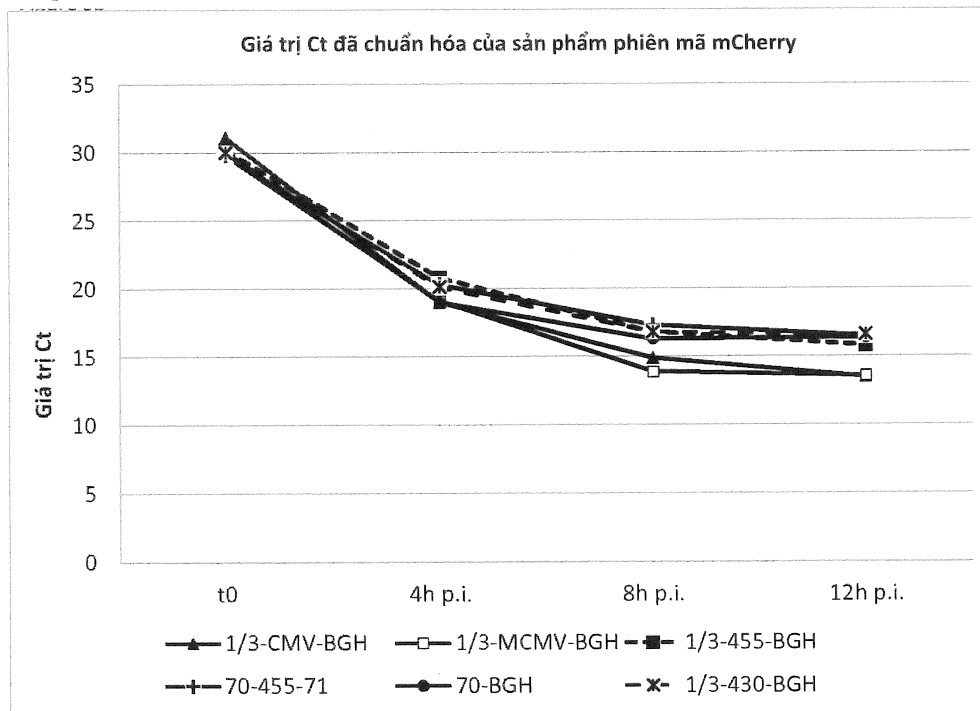


Fig. 4

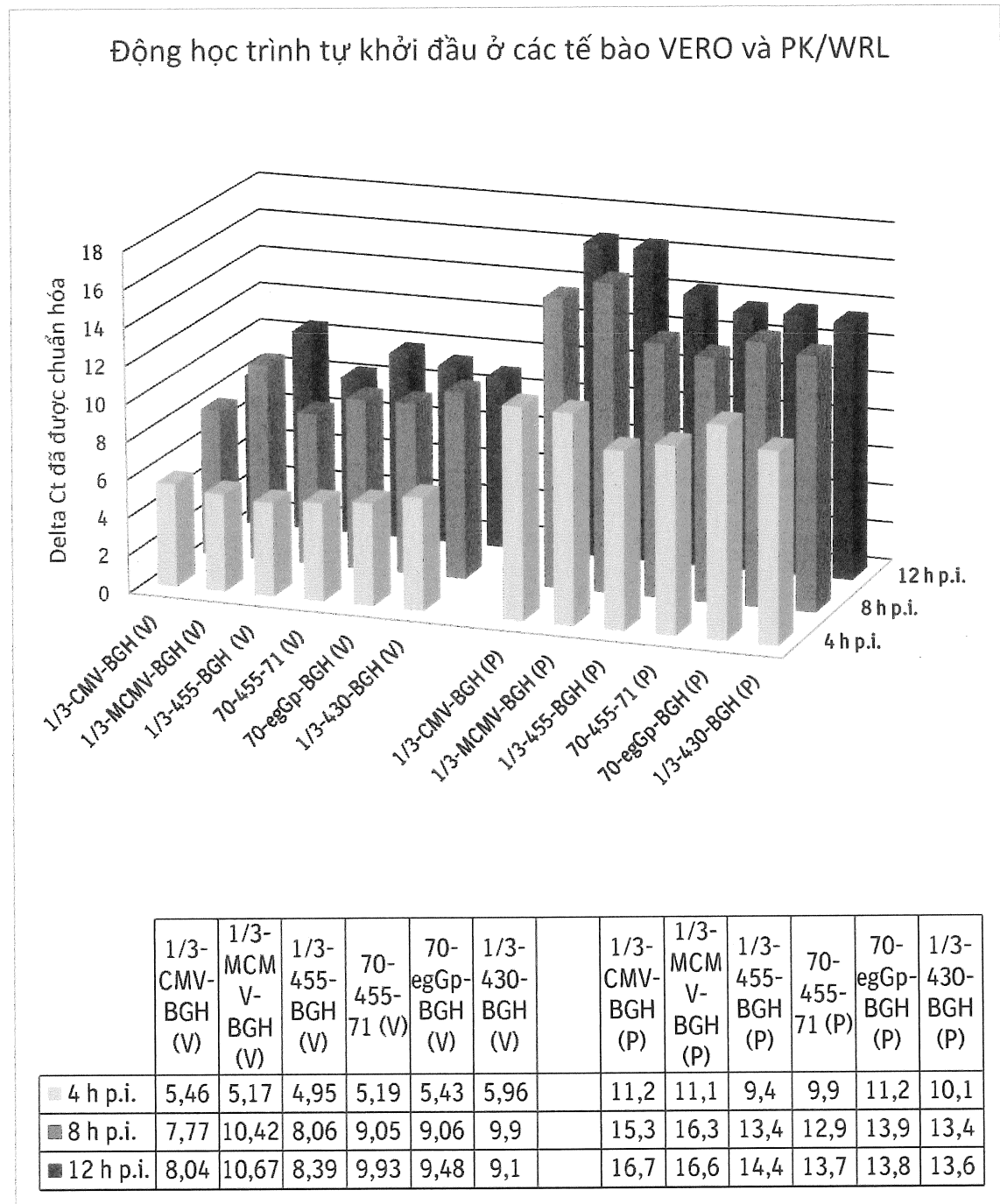
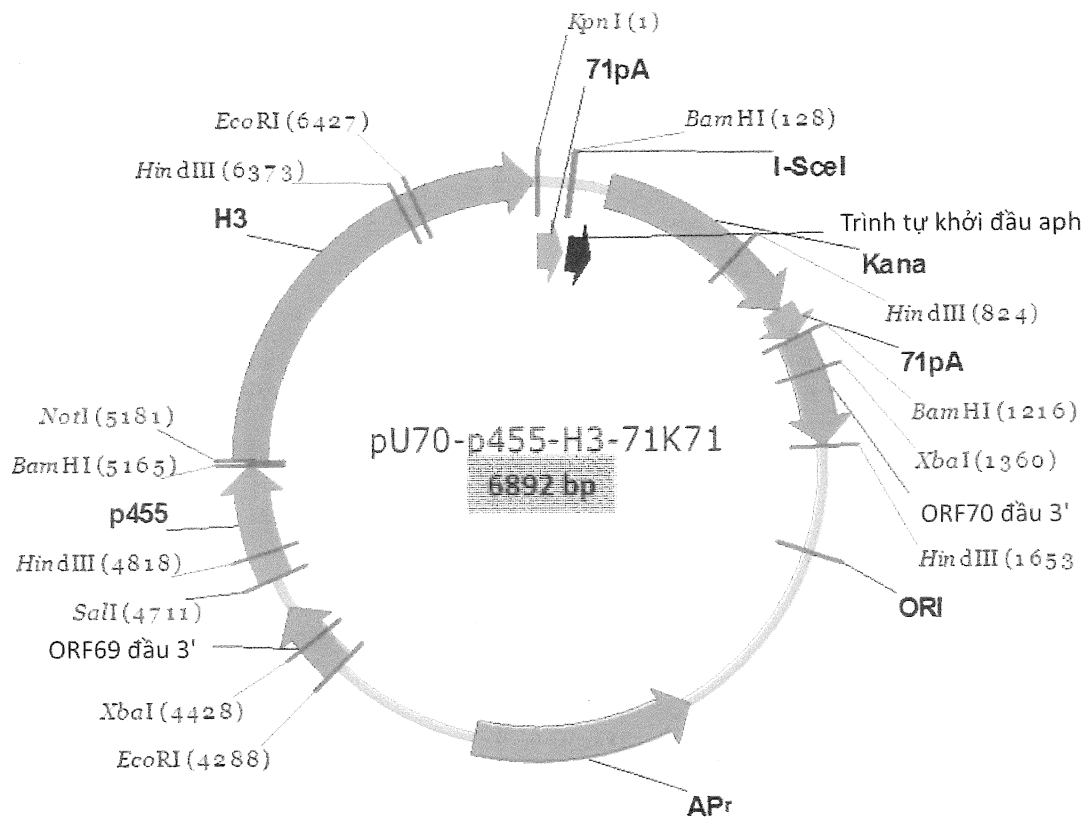


Fig. 5



ORF69 đầu 3': trình tự AND bộ gen virus kẹp sườn vị trí cài xen ngược chiều

ORF70 đầu 3': trình tự AND bộ gen virus kẹp sườn vị trí cài xen xuôi chiều

P455: trình tự khởi đầu dẫn hướng sự biểu hiện của gen chuyển

H3: gen chuyển (IAV hemagglutinin)

71pA: trình tự polyadenin hóa

I-SceI: vị trí phân cắt đối với I-SceI

Trình tự khởi đầu aph: trình tự khởi đầu ở sinh vật có nhân sơ dẫn hướng sự biểu hiện của gen kháng Kanamycin

Kana: Orf kháng Kanamycine

ORI: gốc sao chép của vector plasmit

Apr: gen kháng Ampicillin

EcoRI, SalI, NotI, HindIII, KpnI, BamHI, XbaI biểu thị các vị trí phân cắt endonucleaza giới hạn

Fig. 6

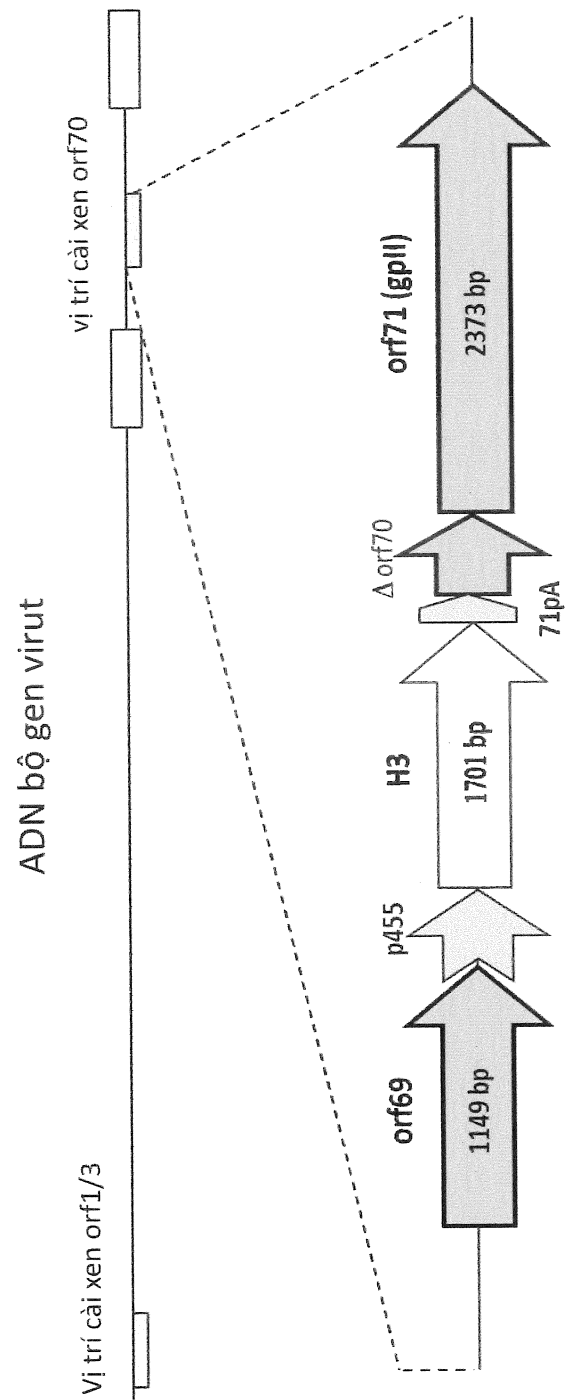
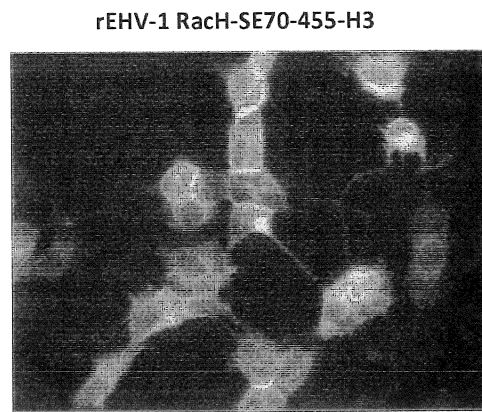
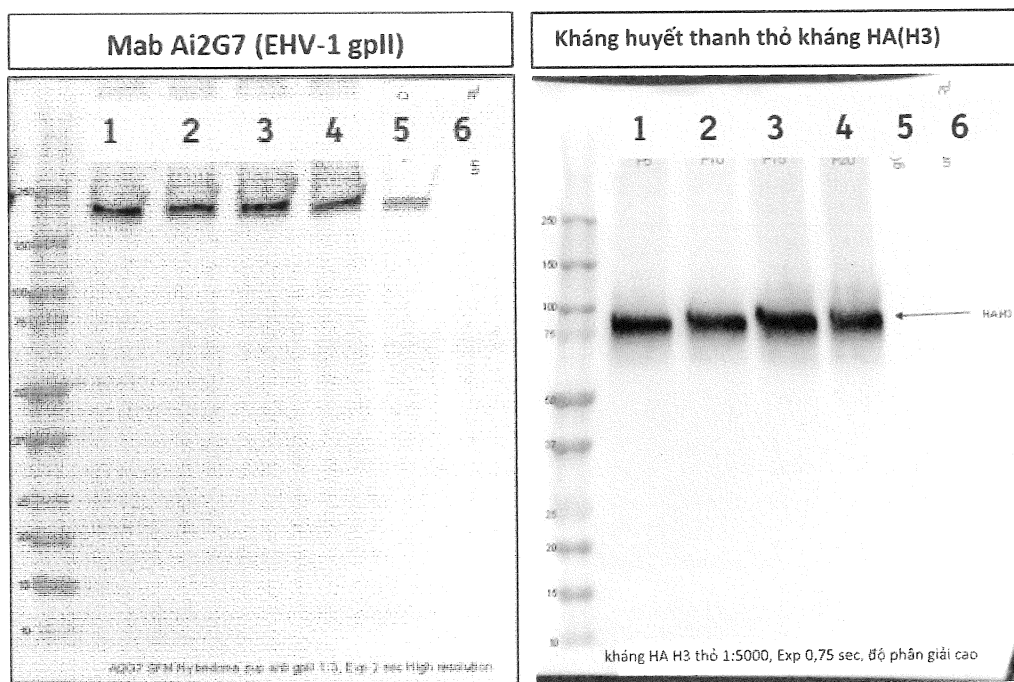


Fig. 7



Kháng thể đơn dòng kháng H3

Fig. 8



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

Fig. 9a

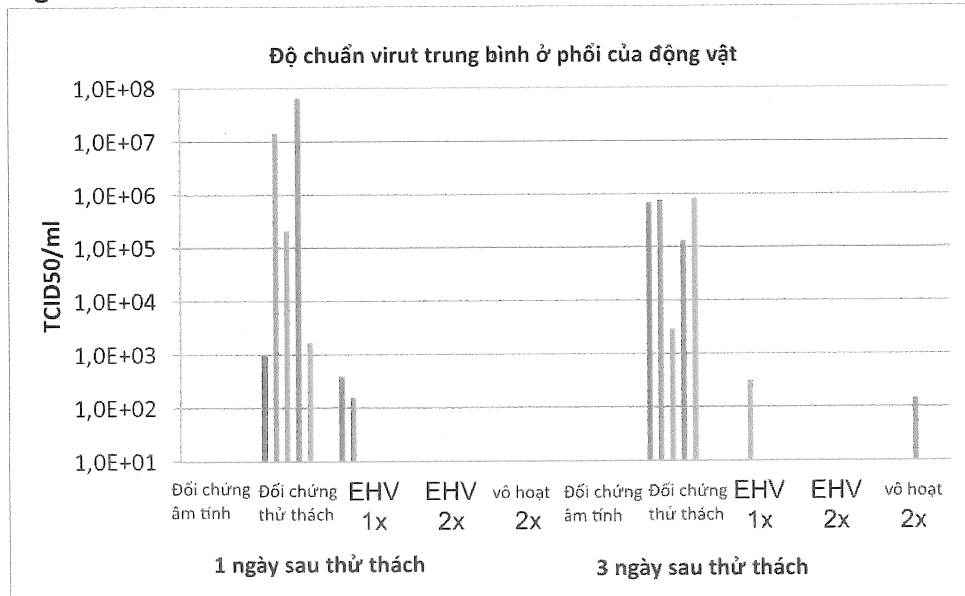


Fig. 9b

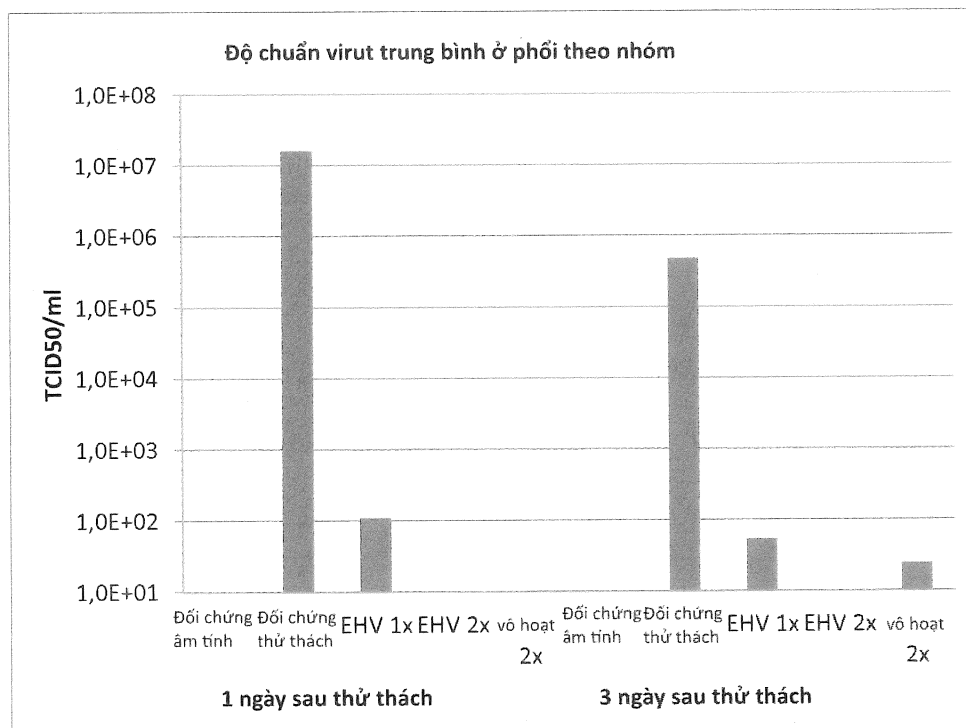
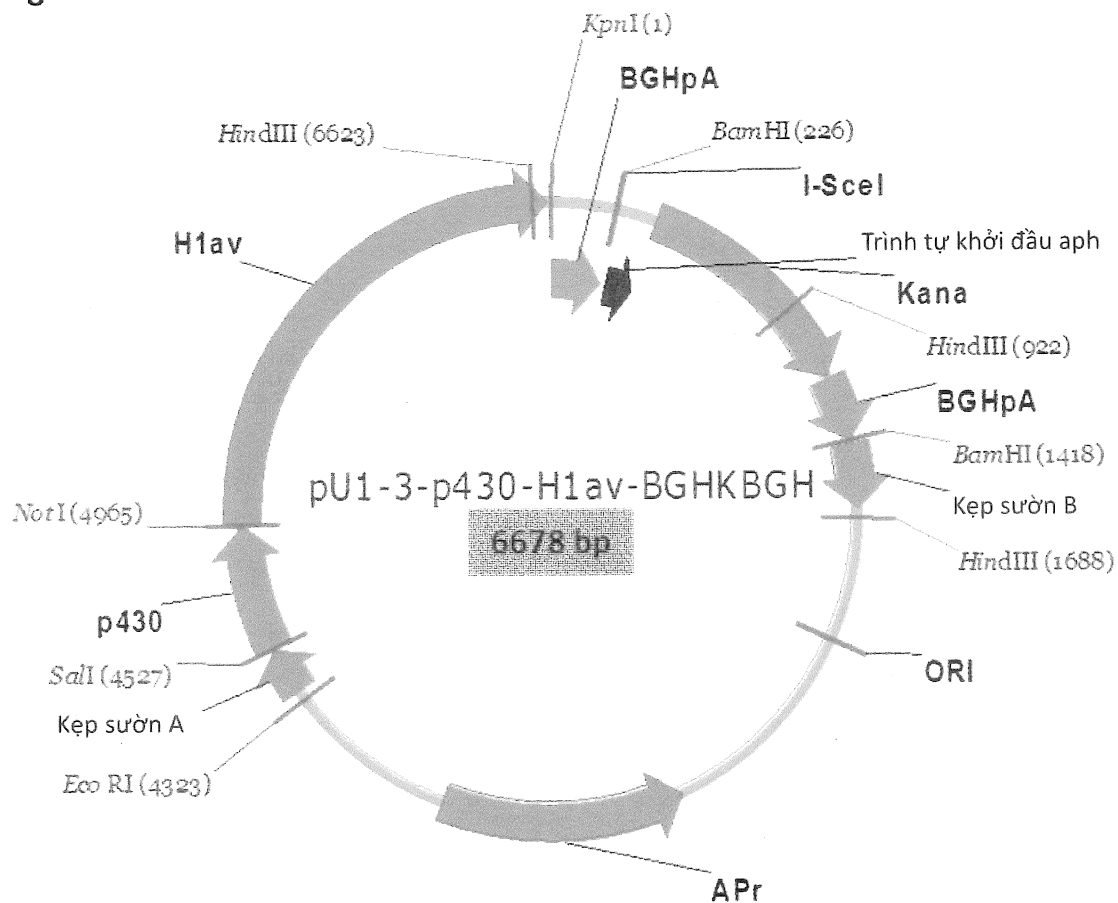


Fig. 10



Kẹp sườn A: Trình tự AND bộ gen virus kẹp sườn vị trí cài xen ngược chiều

Kẹp sườn B: Trình tự AND bộ gen virus kẹp sườn vị trí cài xen xuôi chiều

P430: trình tự khởi đầu dẫn hướng sự biểu hiện của gen chuyển

H1av: gen chuyển (IAV hemagglutinin)

BGHPA: trình tự polyadenyl hóa

I-Sce1: vị trí phân cắt đối với I-Sce1

Trình tự khởi đầu aph: trình tự khởi đầu ở sinh vật có nhân sơ dẫn hướng sự biểu hiện của gen kháng Kanamycin

Kana: Orf kháng Kanamycine

ORI: gốc sao chép của vector plasmit

Apr: gen kháng Ampicillin

EcoRI, SalI, NotI, HindIII, KpnI, BamHI biểu thị các vị trí phân cắt endonucleaza giới hạn

Fig. 11

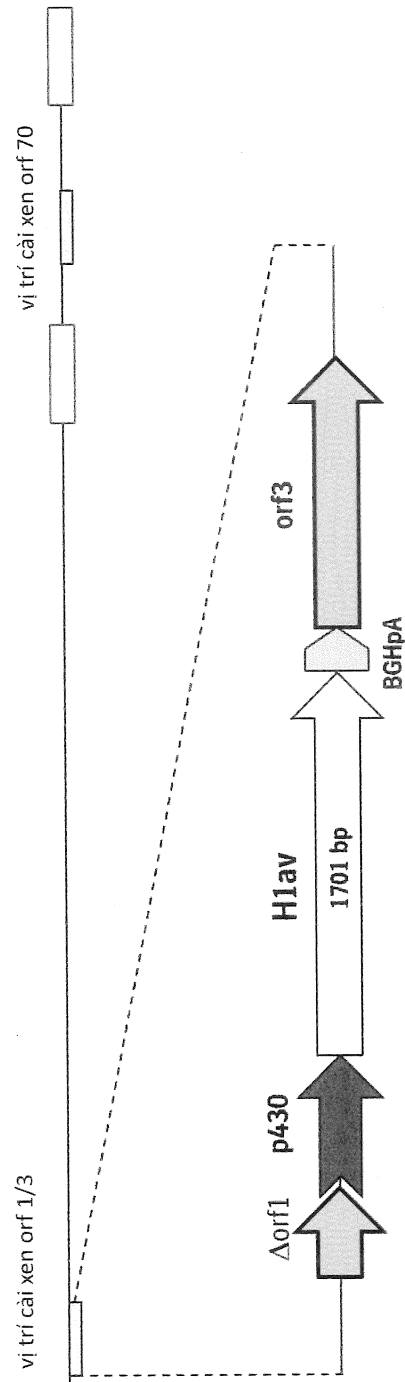


Fig. 12

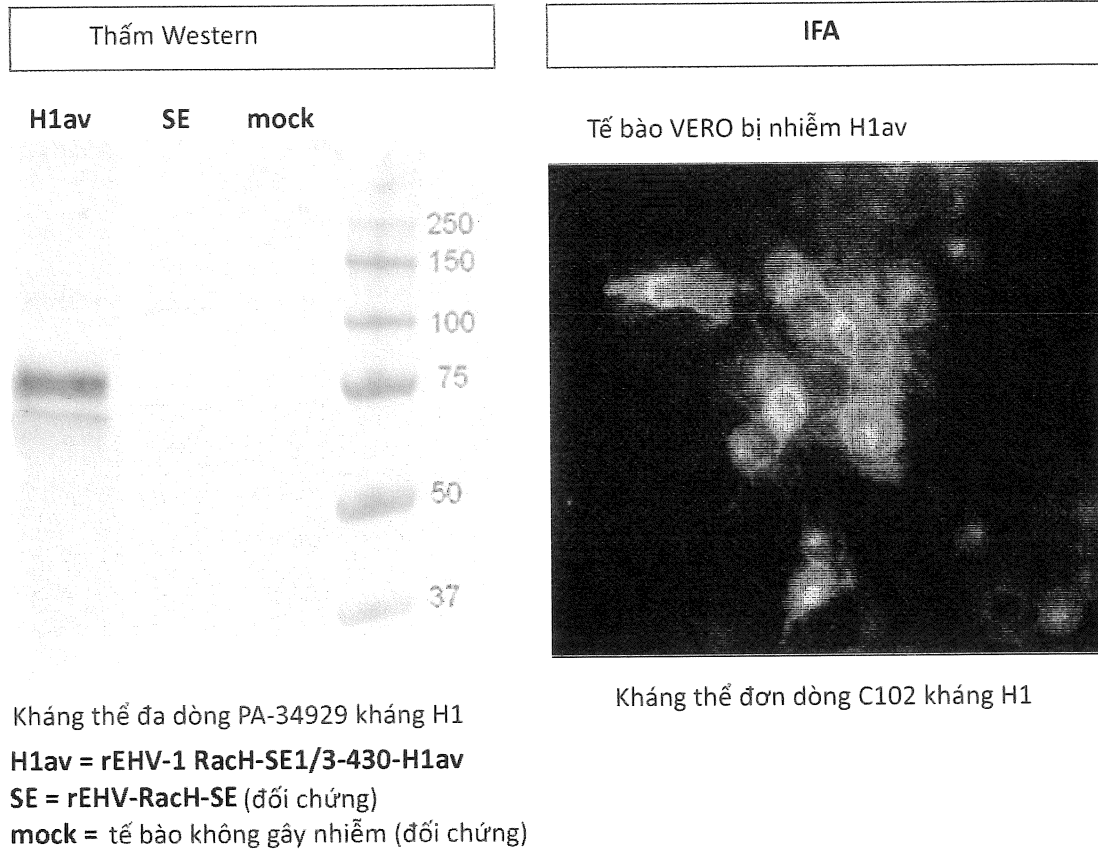


Fig. 13

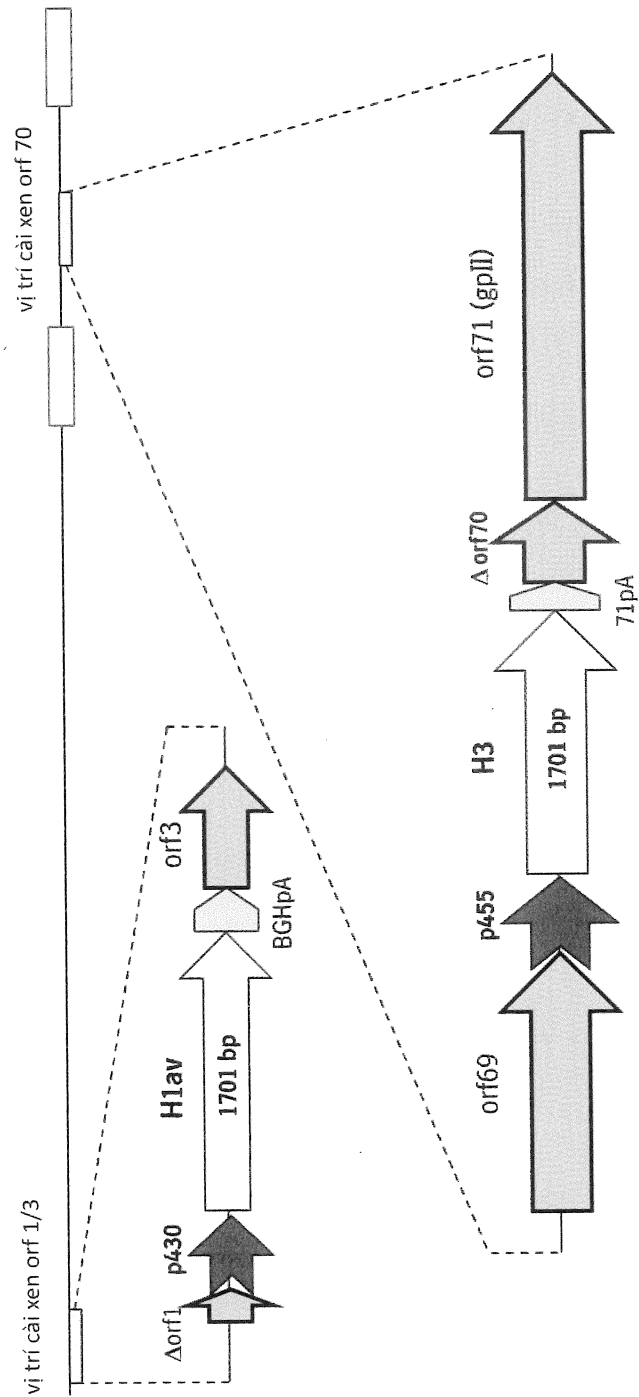


Fig. 14

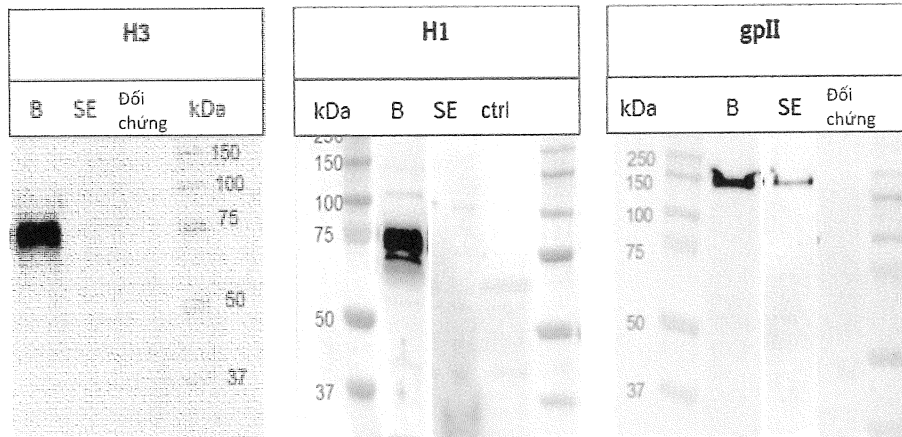


Fig. 15

Virus tái tổ hợp	Protein CAV-2 trung bình	Tế bào nhiễm CAV-2 (%)	Protein VP2 trung bình	Tế bào biểu hiện VP2 (%)
CAV2 CMVie BRSV F	518113	48,47	n/a	0,23
CAV2 CMVie CPV VP2 (Despl)	656218	62,21	178929	2,61
CAV2 CMVie CPV VP2 (Gen0.95)	697527	63,99	164591	2,59

Fig. 16

Virus tái tổ hợp	Protein CAV-2 trung bình	Tế bào nhiễm CAV-2 (%)	Protein VP2 trung bình	Tế bào biểu hiện VP2 (%)	Protein VP2 trung bình	Tế bào biểu hiện VP2 (%)
CAV2 CMVie BRSV F	249037	16,13	47389	0,80	n/a	
CAV2 gG430 CPV VP2 (Despl)	265134	18,28	151824	18,20	260564	14,17
CAV2 gG430 CPV VP2 (Gen0.95)	292271	32,82	136458	28,31	221600	19,68
CAV2 MCP455 CPV VP2 (Gen0.95)	248349	24,65	188663	35,78	292102	29,73
	Kháng-CAV2-FITC pAb		Kháng-CPV VP2-FITC		Kháng-CPV VP2 pAb	

Fig. 17A

Dung dịch pha loãng PBS							
1/64	1/32	1/16	1/8	1/4	1/2	1	
							CAV-2 CMVie BRSV F
							CAV-2 gG430 CPV VP2 (Despl) (dịch nối/phân giải)
							CAV-2 gG430 CPV VP2 (Gen0.95) (dịch nối/phân giải)
							CAV-2 MCP CPV VP2 (Gen0.95) (dịch nối/phân giải)

Fig. 17B

		Dịch nối/phân giải từ tế bào nhiễm virus tái tổ hợp			
Virus tái tổ hợp		CAV-2 CMVie BRSV F	CAV-2 gG430 CPV VP2 (Despl)	CAV-2 gG430 CPV VP2 (Gen0.95)	CAV-2 MCP CPV VP2 (Gen0.95)
Dung dịch pha loãng	1	-	++++	++	++++
	0,5	-	+++	+	++++
	0,25	-	+++	+	++++
	0,125	-	+++	+	++++
	0,0625	-	++	+/-	+++
	0,0312	-	+	-	++
	0,0156	-	+/-	-	+

Fig. 18

Virus tái tổ hợp	Protein CAV-2 trung bình	Tế bào nhiễm CAV-2 (%)	Protein RabG trung bình	Tế bào biểu hiện rabG (%)
CAV2 gG430 CPV VP2 (Gen0.95)	516801	46.22	n/a	0.63
Original CAV2 CMVie RabG (n)	375281	16.79	33298	1.58
CAV2 MCP455 RabG (n)	542598	54.41	90294	14.22
	kháng -CAV2-FITC pAb		kháng -RabG-FITC	

Fig. 19A: IFA đối với sự biểu hiện CPV VP2 ở tế bào AI-ST 2015 bị nhiễm

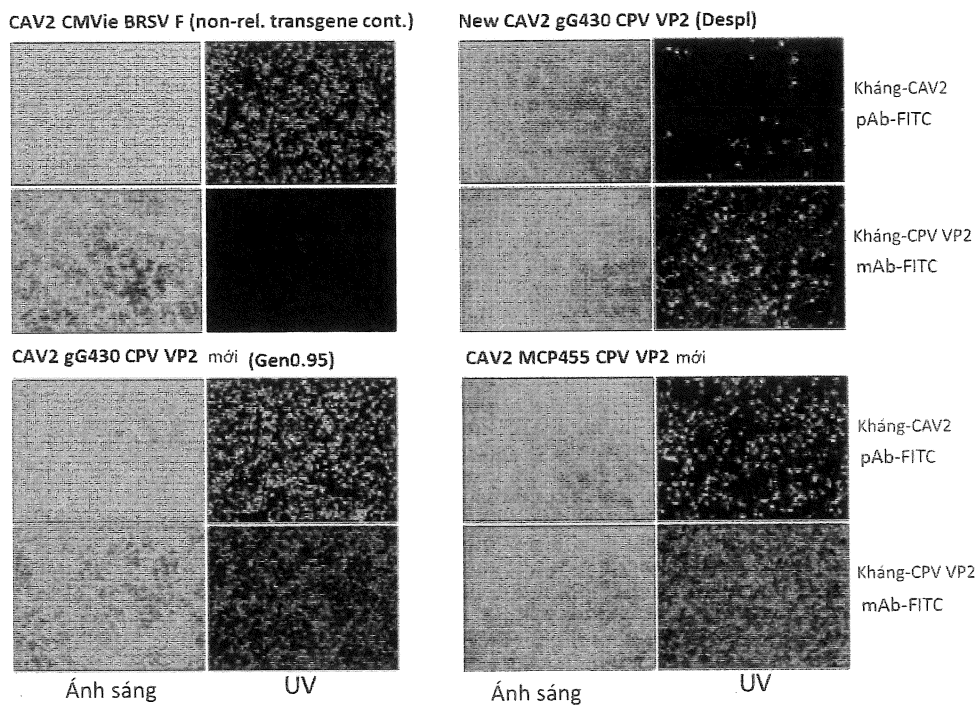


Fig. 19B: IFA đối với sự biểu hiện RabG ở các tế bào AI-ST 2015

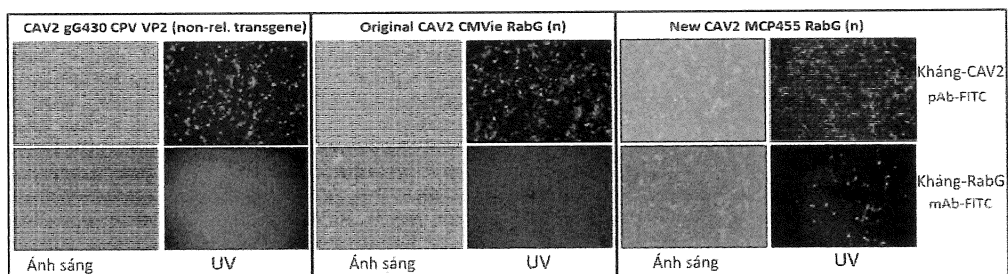


Fig. 19C: IFA đối với sự biểu hiện RabG ở các tế bào BIVI 2011 MDCK - nhuộm hai lần đối với RabG và CAV-2

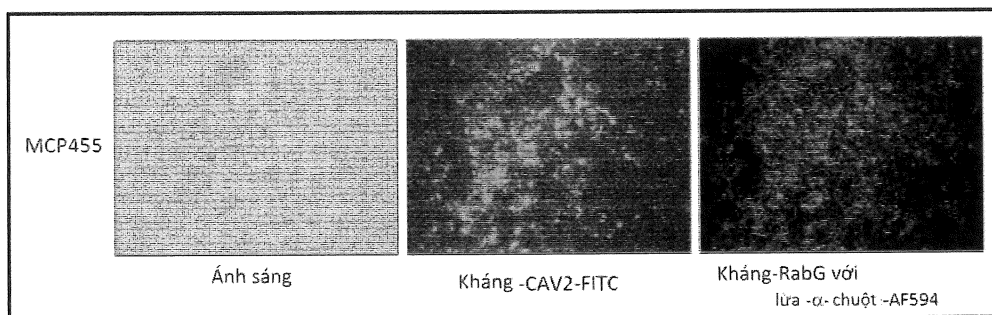


Fig. 20

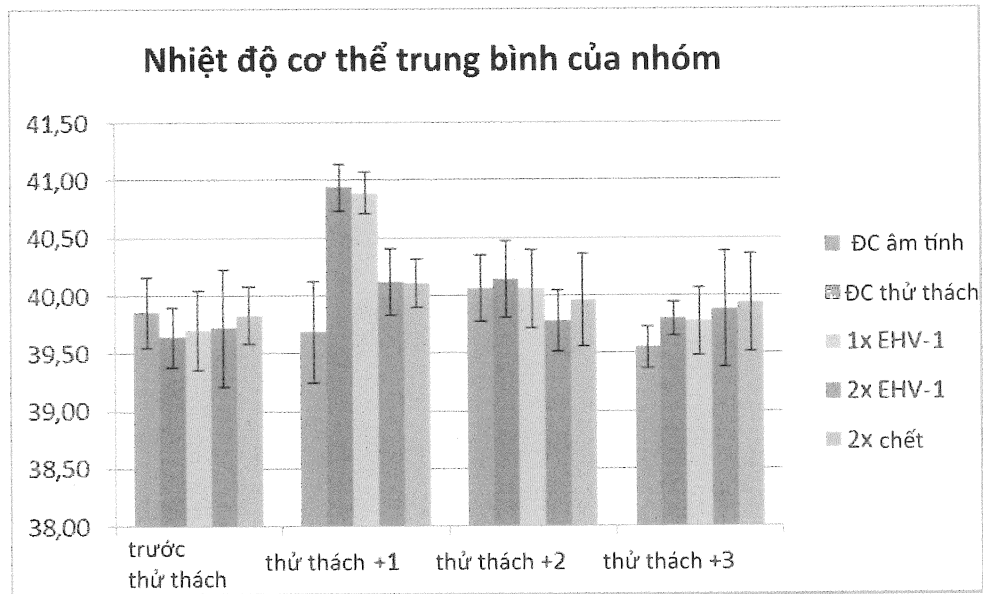


Fig. 21

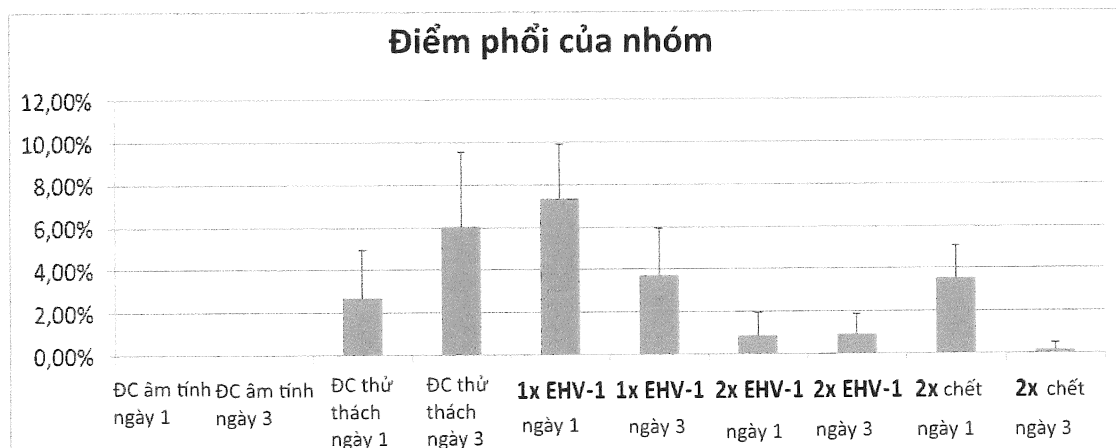


Fig. 22

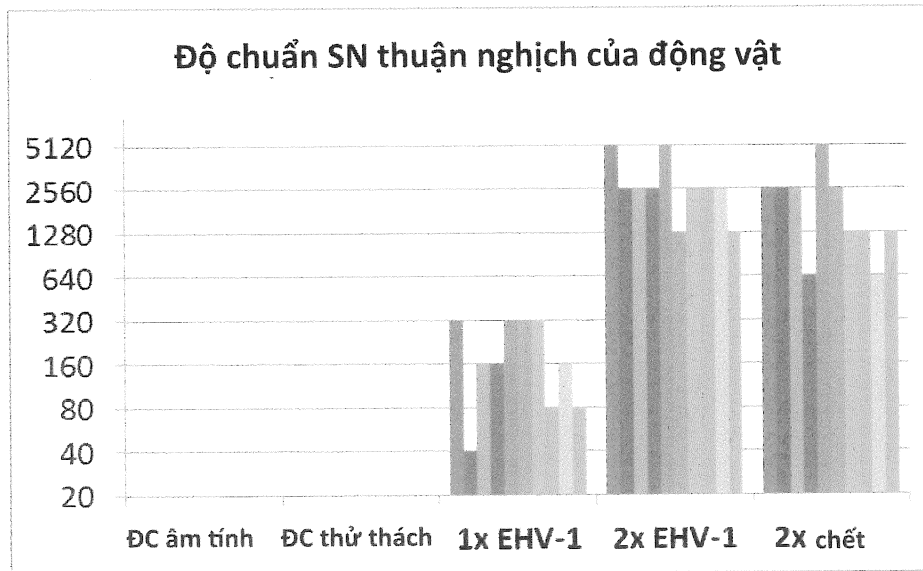


Fig. 23

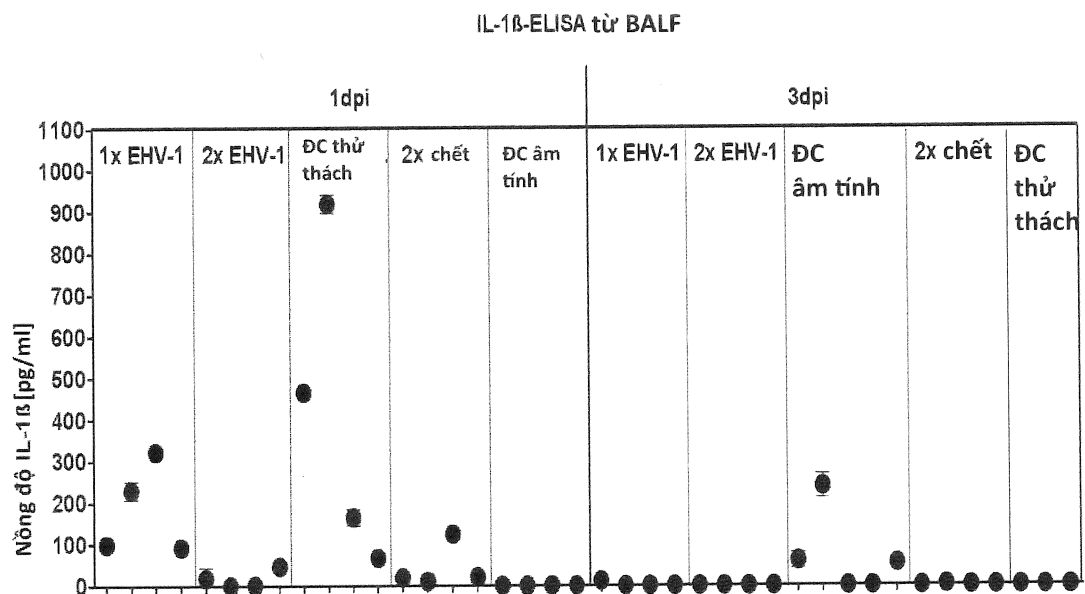
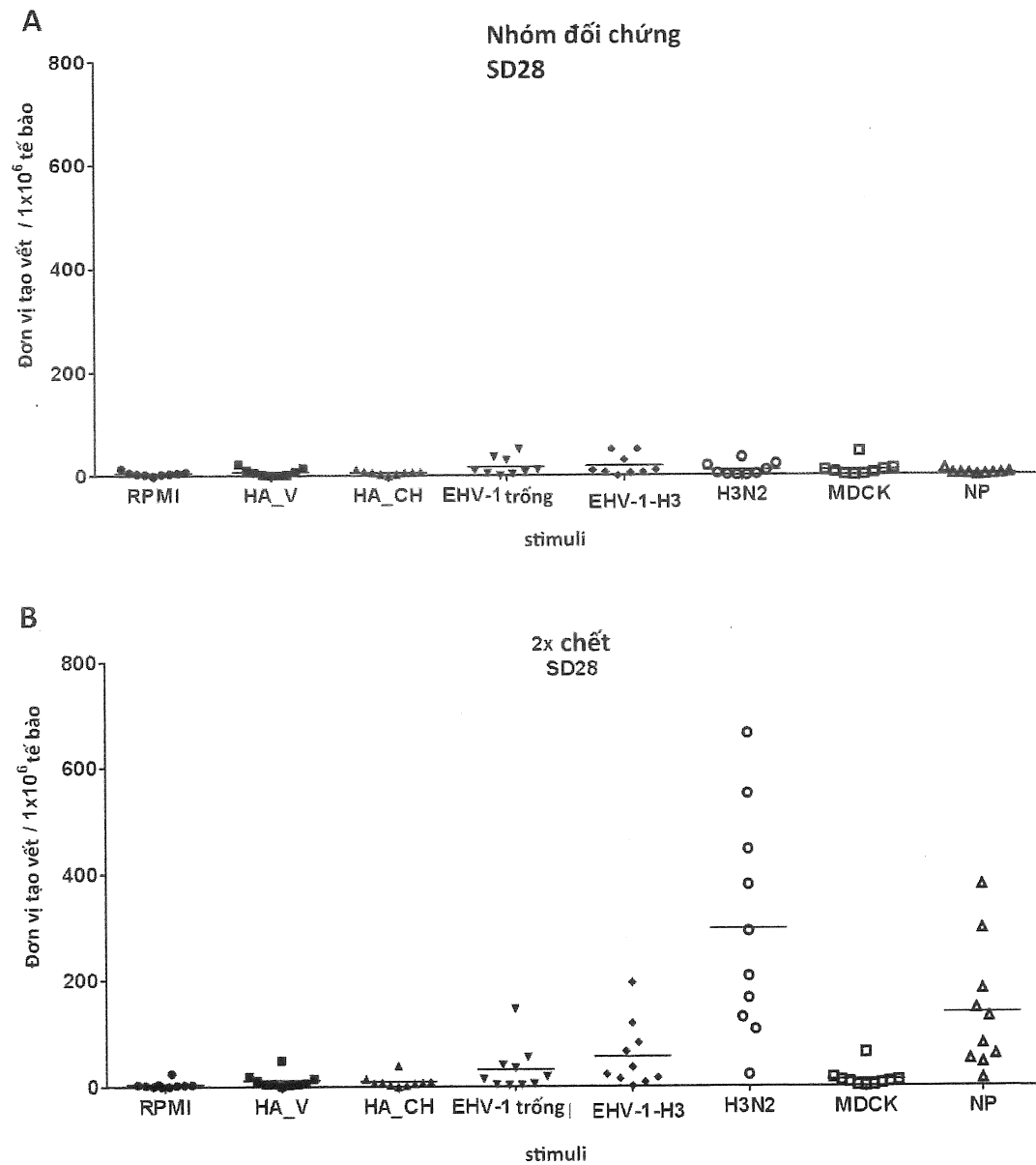


Fig. 24



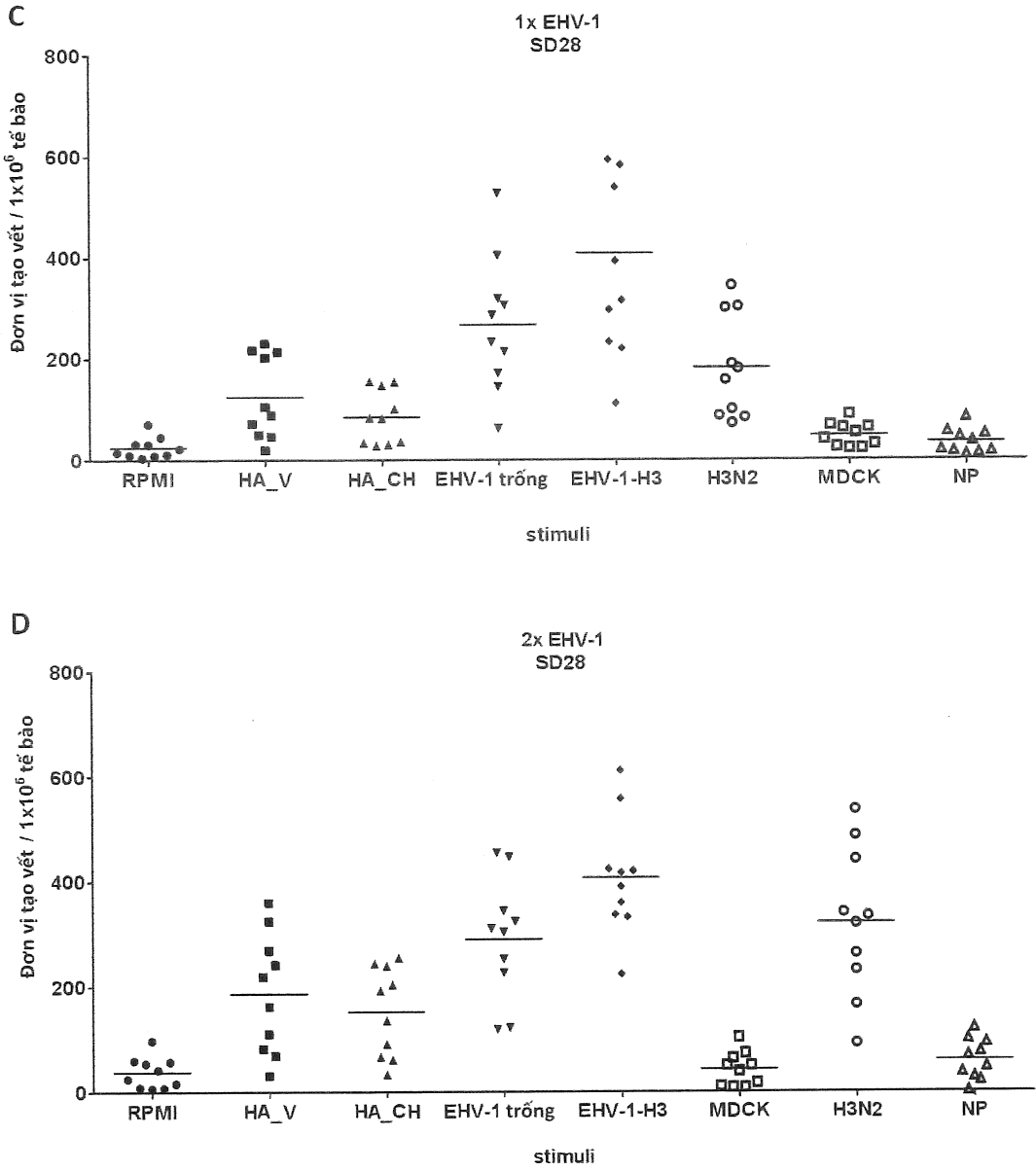
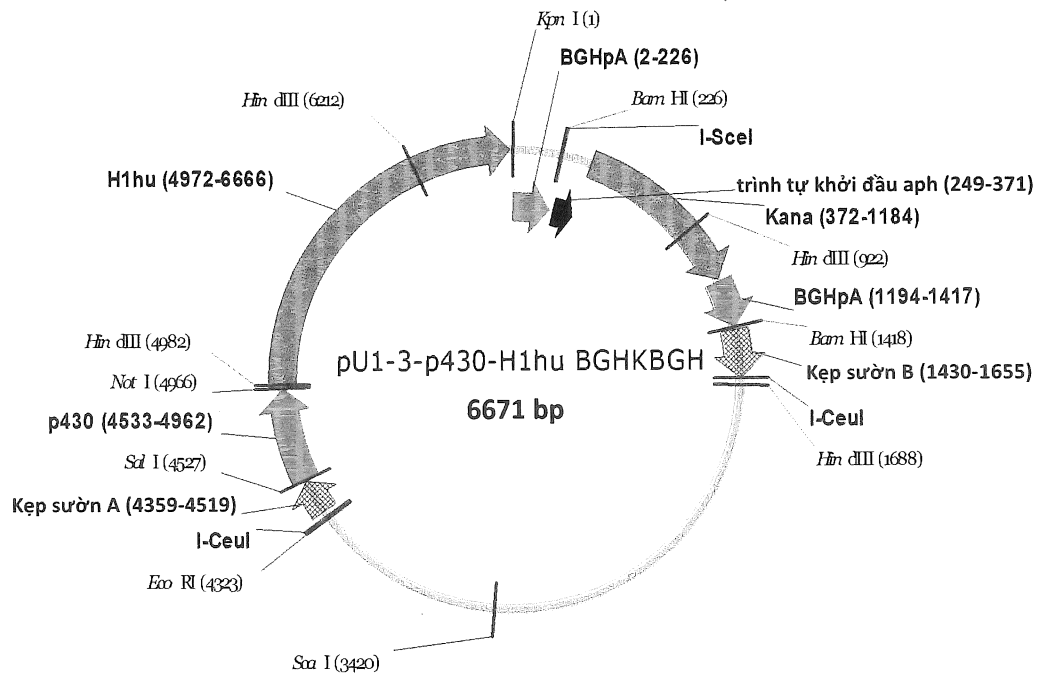


Fig. 25



Kẹp sườn A: Trình tự AND bộ gen virut kẹp sườn vị trí cài xen ngược chiều

Kẹp sườn B: Trình tự AND bộ gen virut kẹp sườn vị trí cài xen xuôi chiều

P430: trình tự khởi đầu dẫn hướng sự biểu hiện của gen chuyển

H1av: gen chuyển (IAV hemagglutinin)

BGHPA: trình tự polyadenyl hóa

I-Sce1: vị trí phân cắt đối với I-Sce1

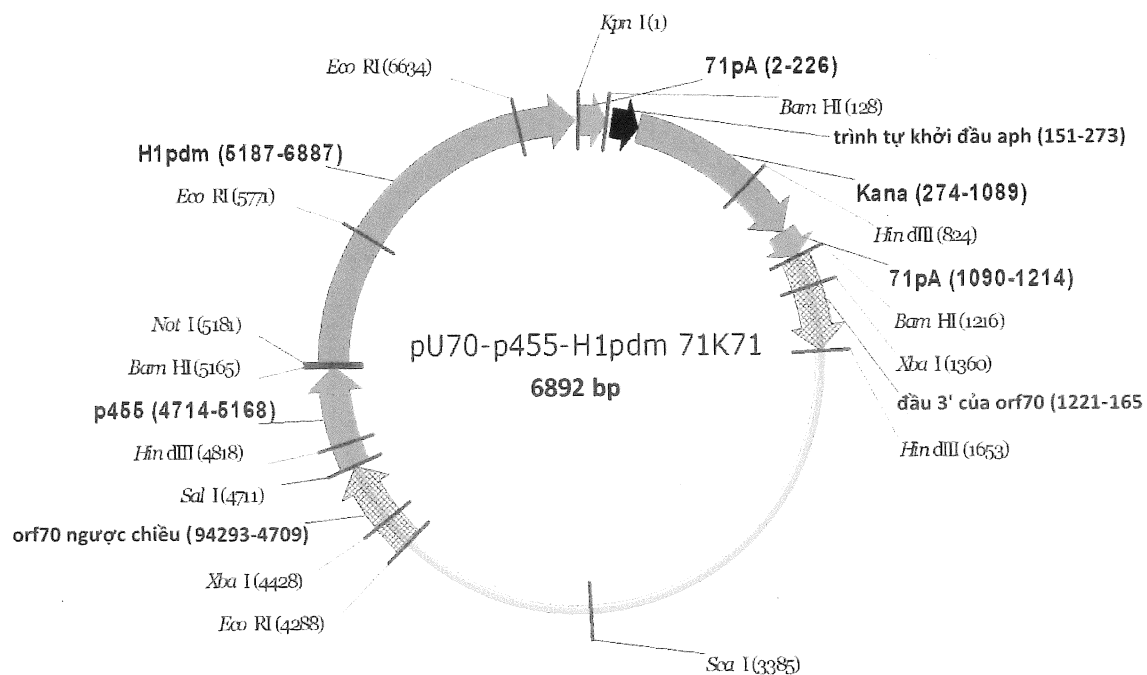
I-Ceu1: vị trí phân cắt đối với I-Ceu1

Trình tự khởi đầu aph: trình tự khởi đầu ở sinh vật có nhân sơ dẫn hướng sự biểu hiện của gen kháng Kanamycin

Kana: Orf kháng Kanamycine

Sal, EcoRI, Sall, NotI, HindIII, KpnI, BamHI biểu thị các vị trí phân cắt endonucleaza giới hạn

Fig. 26



ORF69 đầu 3': trình tự AND bộ gen virus kẹp sườn vị trí cài xen ngược chiều

ORF70 đầu 3': trình tự AND bộ gen virus kẹp sườn vị trí cài xen xuôi chiều

P455: trình tự khởi đầu dẫn hướng sự biểu hiện của gen chuyển

H1pdm: gen chuyển (IAV hemagglutinin)

71pA: trình tự polyadenin hóa

I-Sce1: vị trí phân cắt đối với I-Sce1

Trình tự khởi đầu aph: trình tự khởi đầu ở sinh vật có nhân sơ dẫn hướng sự biểu hiện của gen kháng Kanamycin

Kana: Orf kháng Kanamycin

ScaI, EcoRI, SalI, NotI, HindIII, KpnI, BamHI, XbaI biểu thị các vị trí phân cắt endonucleaza giới hạn

Fig. 27

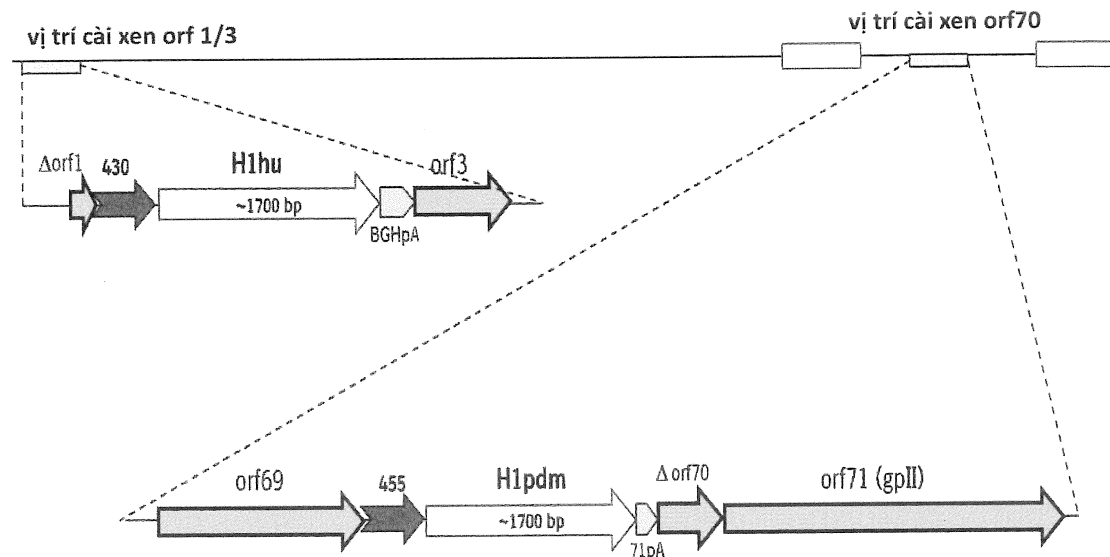


Fig. 28

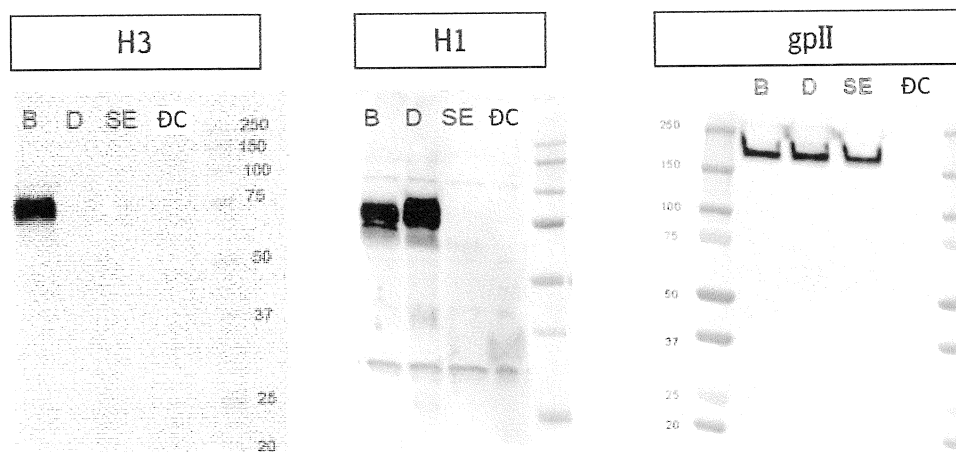


Fig. 29

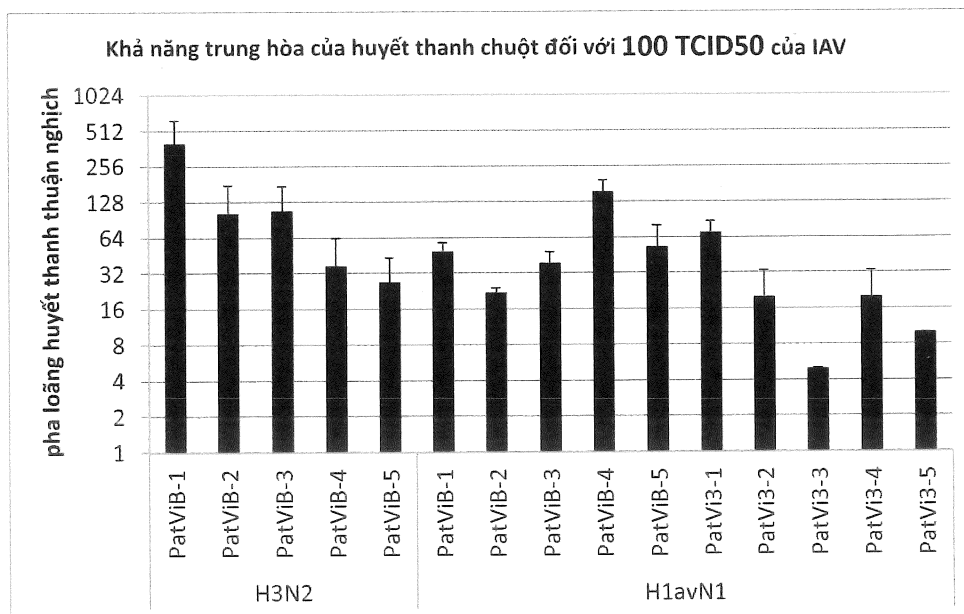


Fig. 30

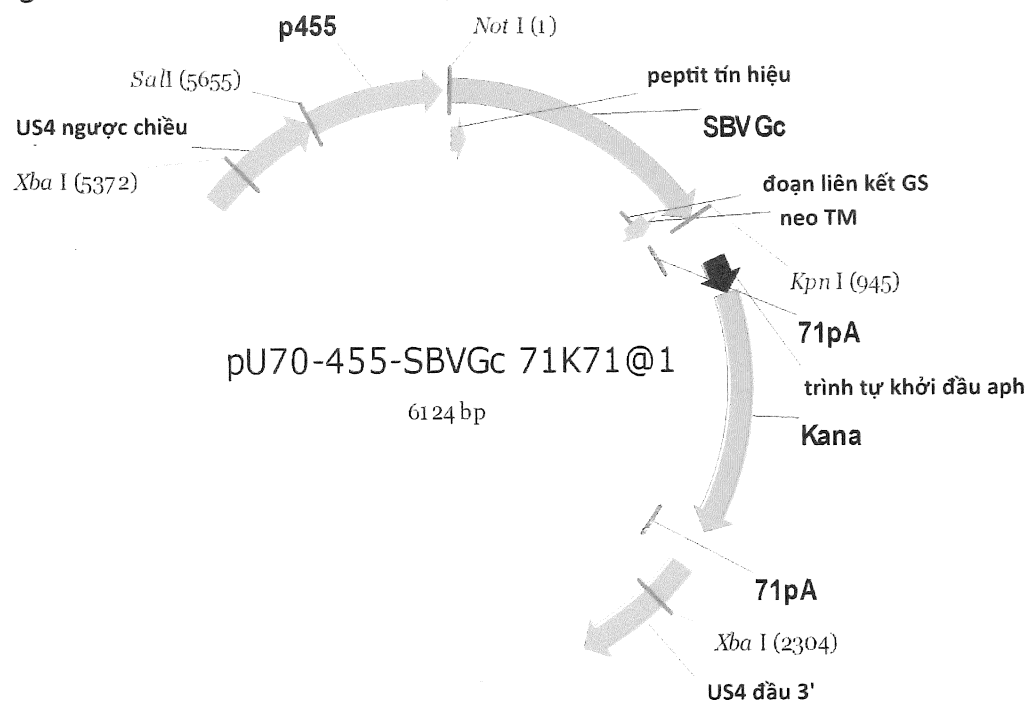


Fig. 31A

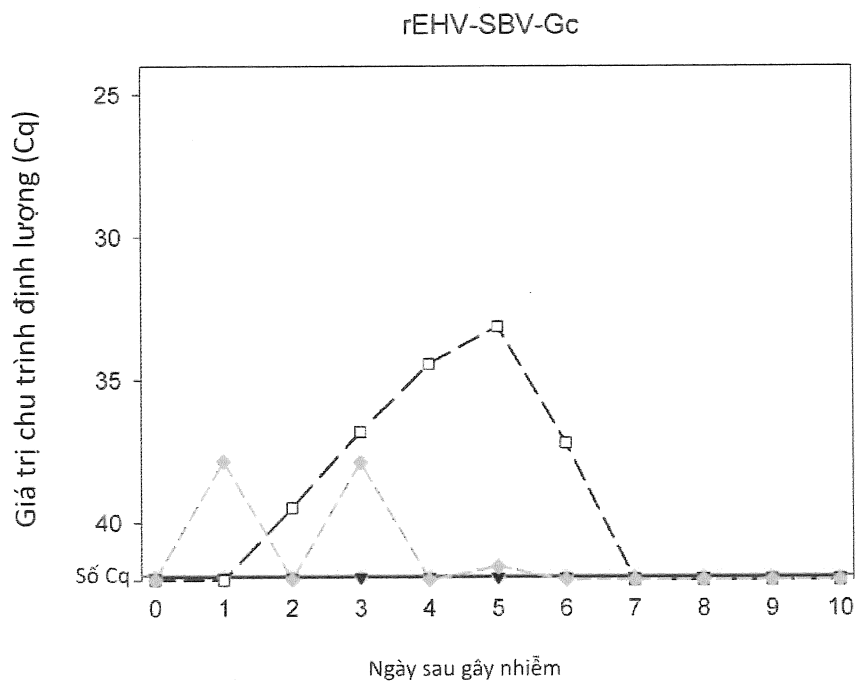
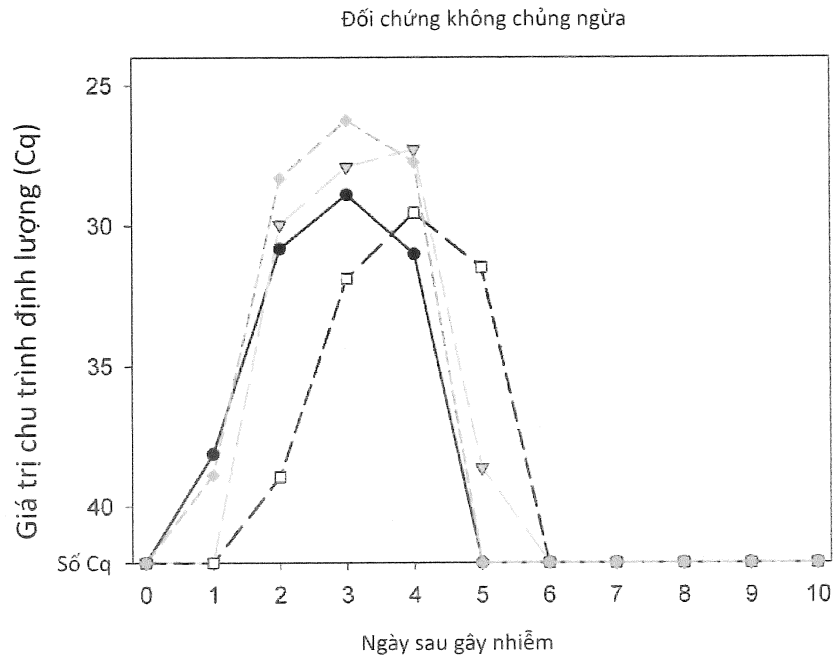


Fig. 31B

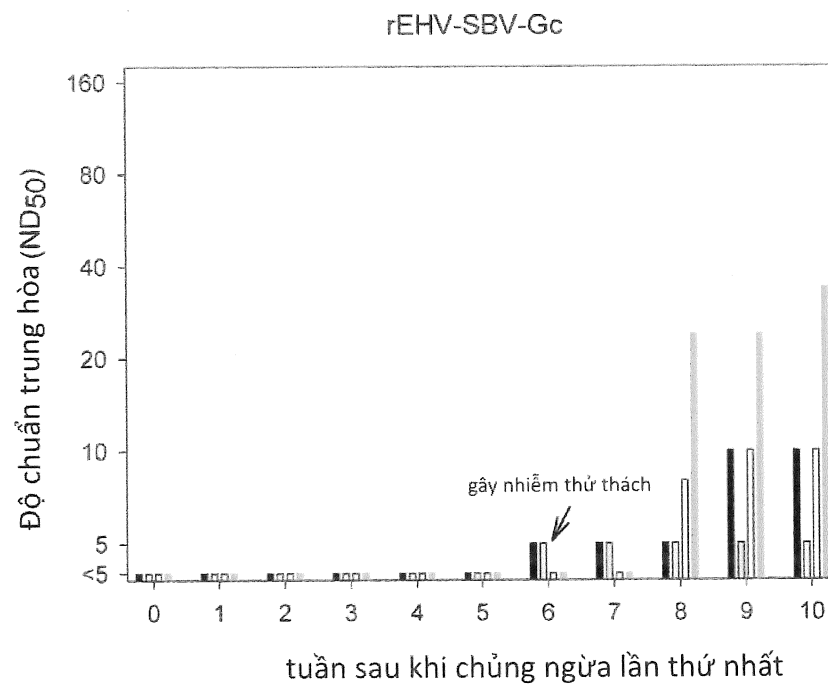
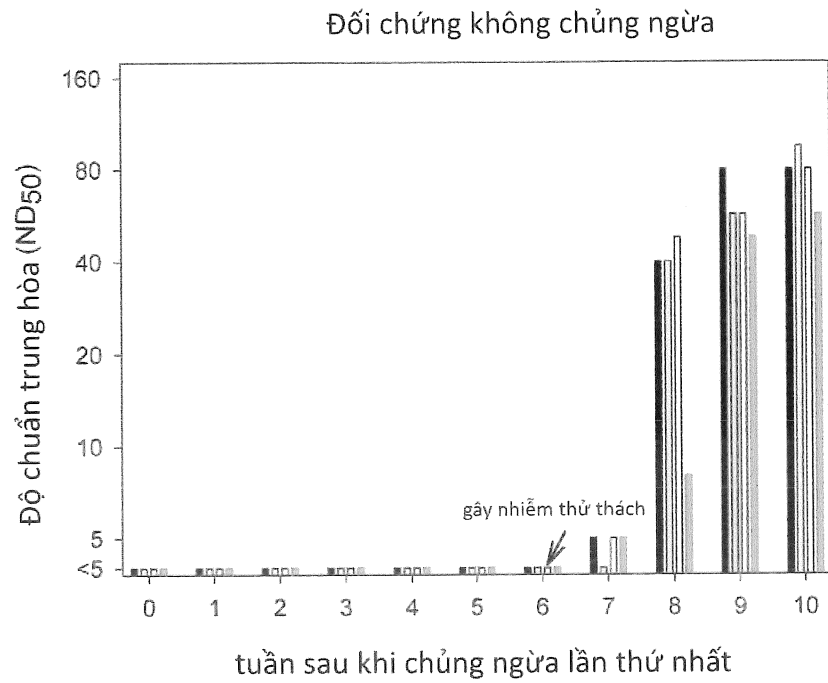


Fig. 32

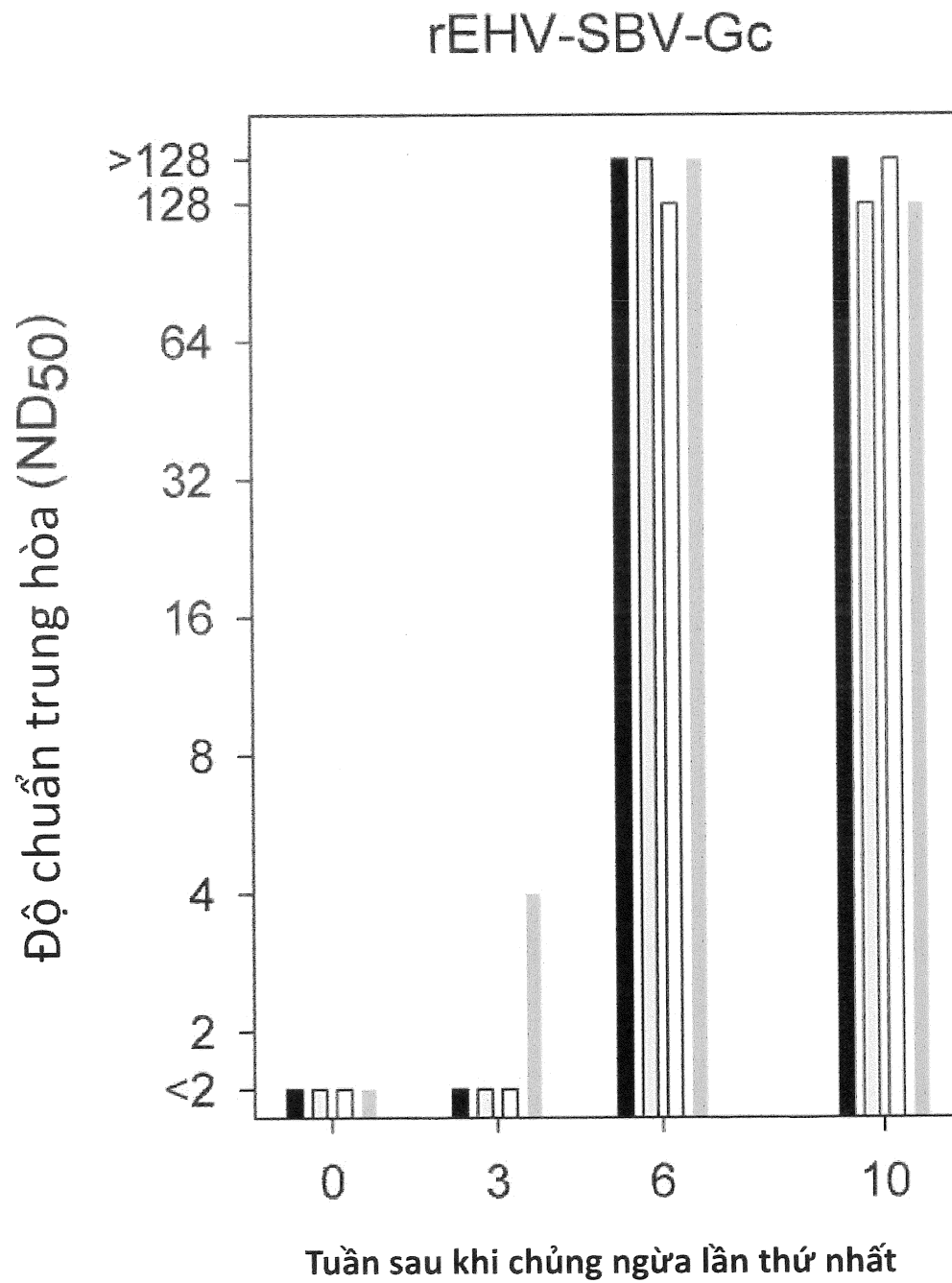


Fig. 33

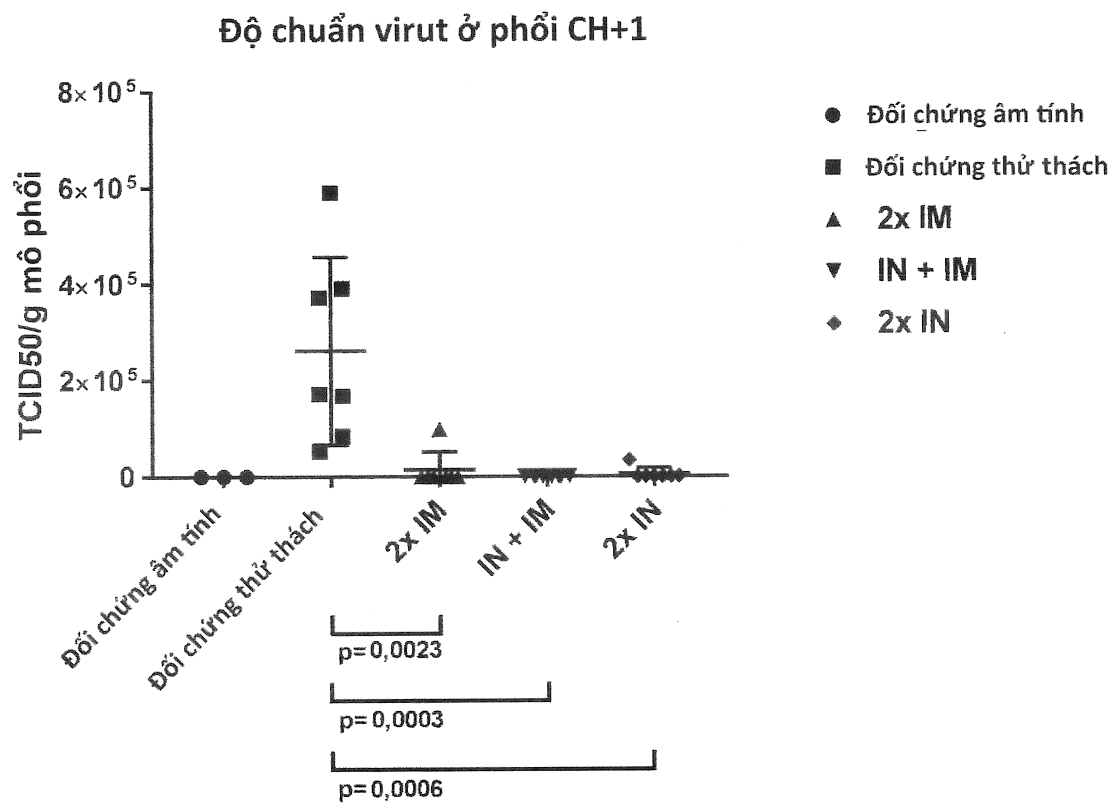


Fig. 34

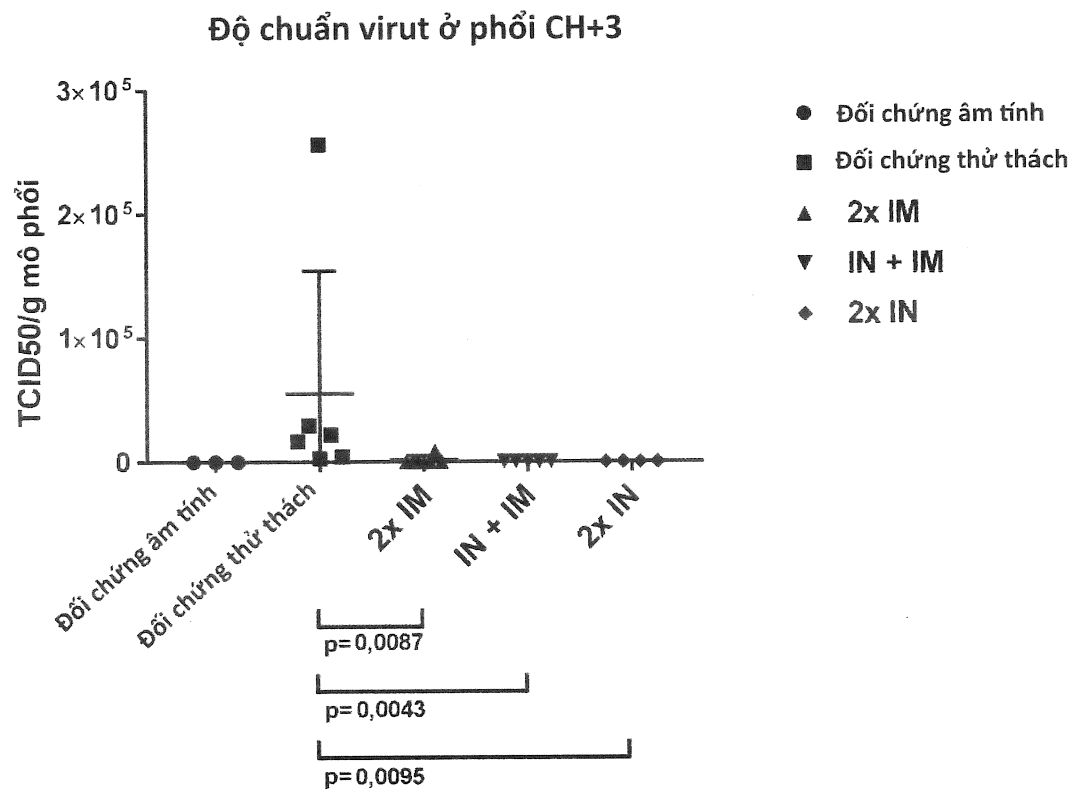


Fig. 35

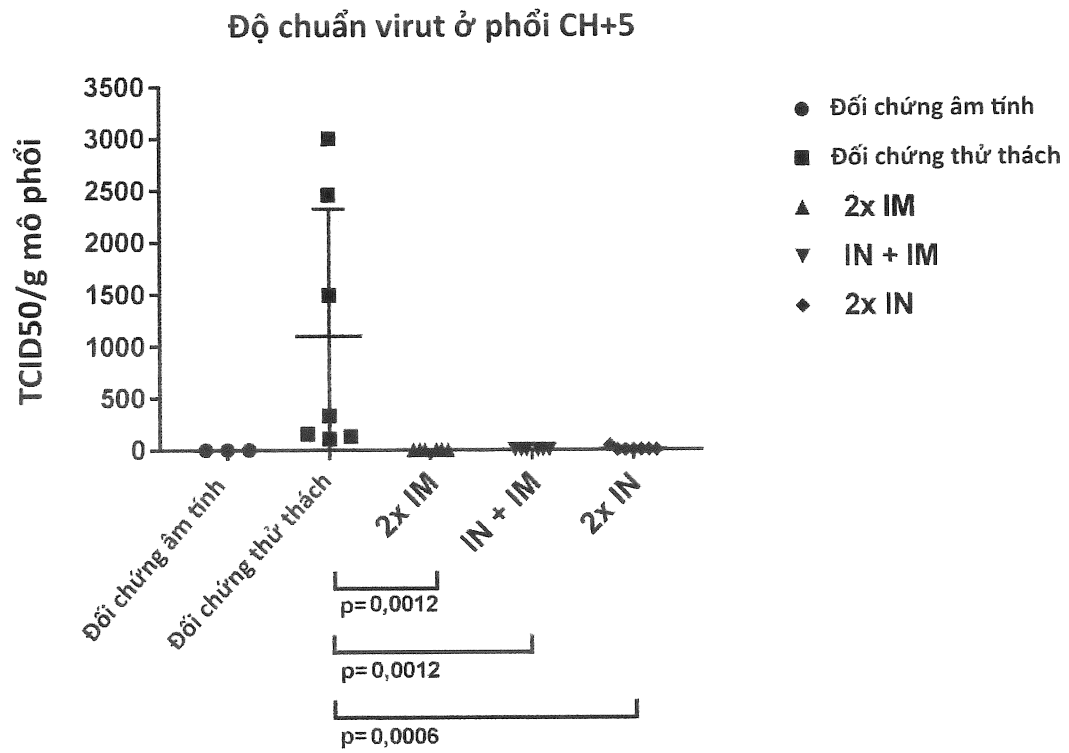


Fig. 36

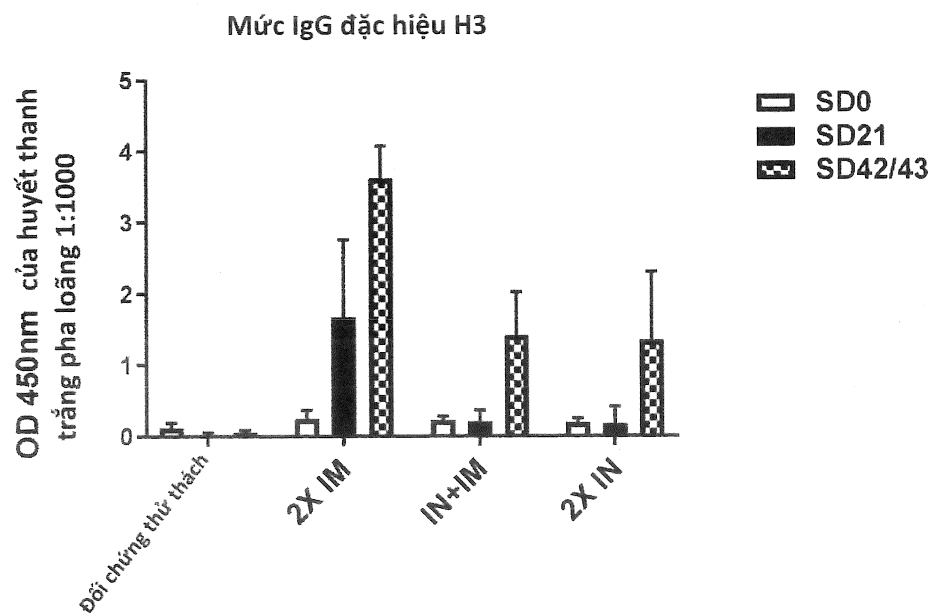


Fig. 37

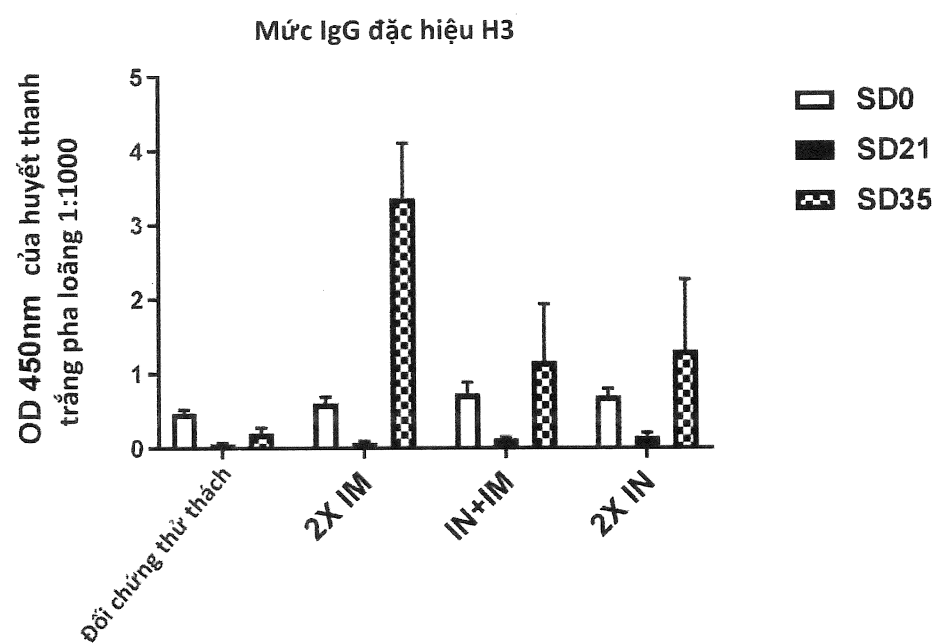


Fig. 38

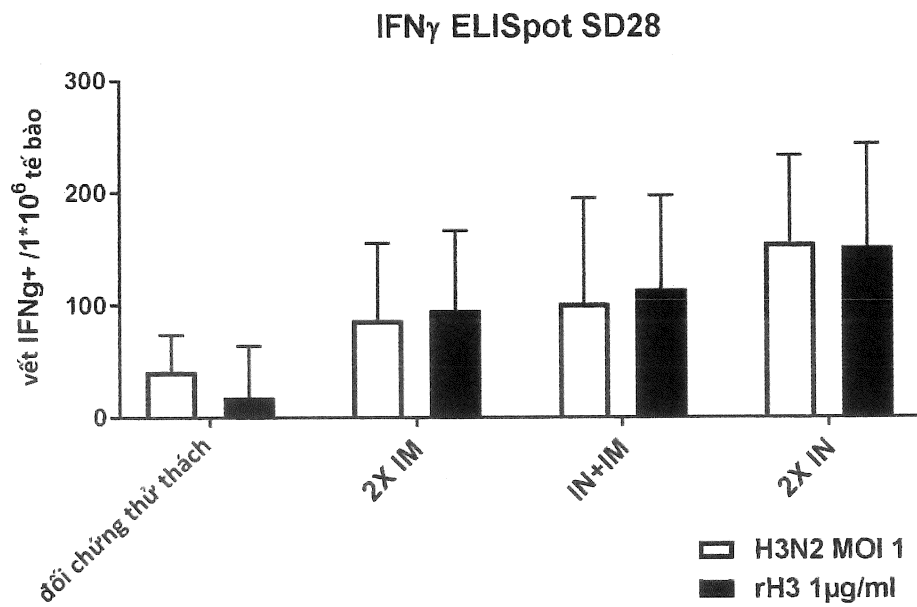
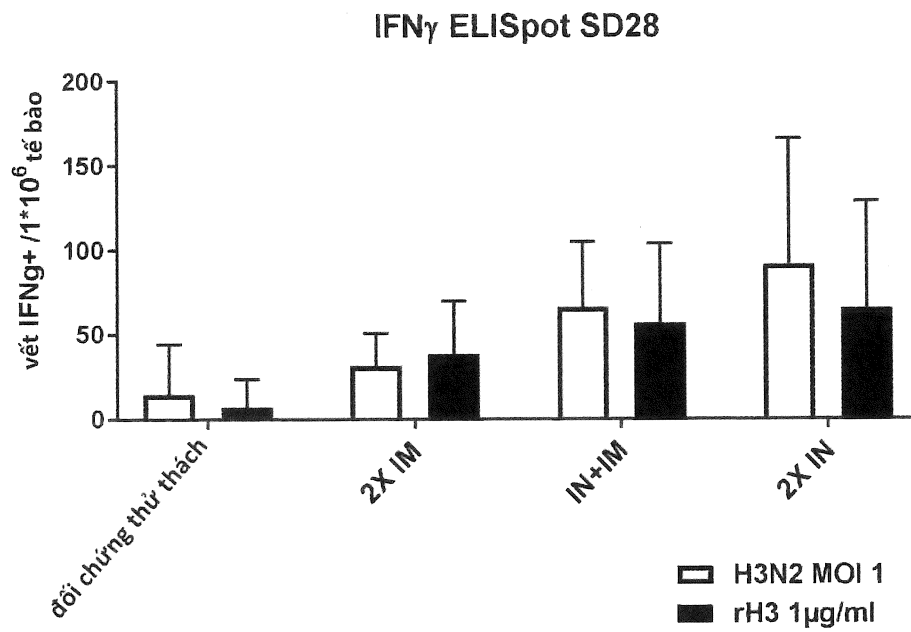


Fig. 39



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH

<120> Trình tự khởi đầu, cat-xet biểu hiện và vectơ thích hợp để biểu hiện gen quan tâm, chế phẩm sinh miễn dịch, vacxin, hoặc dược phẩm chứa chúng, và kit chứa chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vacxin này

<130> P01-3202

<160> 37

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 600

<212> ADN

<213> Equine herpesvirus 4

<400> 1

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

<210> 2

<211> 600

<212> ADN

<213> Equine herpesvirus 4

<400> 2

agctggggga gtttgtacta tagtgtatta catgcggctt gcaataactg cctggtttat	60
gtttcgcaac attcaagcag acatgctacc gctaaacact ttgcaacaat tttttatttg	120
gtgtttggcc tttggtagaa ctgtcgcggt tttggtggta gcatatacta ccttatttat	180

acgctccgag ctgtttttca gcatgctagc acccaacgcc gagcgagagt atataactcc 240
catcattgcc cacaagctta tgccacttat tagcggtccgc tctgccgttt gcttagtcat 300
aatatctacc gccgtttacg cagcagacgc tatctgcgac acaattggat ttgcgatacc 360
gcgcatgtgg atgtgtatth taatgagatc aacctccatg aagcgtaact agggggcctc 420
ccactgaggg actaccggct tagcagctga ctaacacagt ataaaacgtg agaagaaatc 480
agtctcatgc gccattagcg ctaggctagt tagcggtggag gaccggagcg ctaccgccag 540
cagtttcatc cgctgggtta cgggtttgtt aacacctacc ggtgtttttac cgctaccata 600

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

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

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

<400> 4
ttggtggtag catatactac cttatttata cgctccgagc tgtttttcag catgctagca 60
cccaacgccg agcgagagta tataactccc atcattgccc acaagcttat gccacttatt 120
agcggtccgct ctgccgtttg cttagtcata atatctaccg ccgtttacgc agcagacgct 180
atctgcgaca caattggatt tgcgataccg cgcatgtgga tgtgtattht aatgagatca 240

acctccatga agcgtaacta gggggcctcc cactgaggca ctaccggctt agcagctgac 300
 taacacagta taaaacgtga gaagaaatca gtctcatgcg ccattagcgc taggctagtt 360
 agcgtggagg accggagcgc taccgccagc agtttcatcc gcctgggttac gggtttgta 420
 acacctaccg gtgttttacc gctaccata 449

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

<220>
 <223> đoạn mỗi số 1130 đặc hiệu đối với orf72

<400> 5
 tgtctacctt caagcttatg 20

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

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

<400> 6
 ctagcgcagt cgcgttg 17

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

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

<400> 7
 gcgaggagga taacatgg 18

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

<220>

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

<400> 8

acccttggtc accttcag

18

<210> 9

<211> 22

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo đoạn mỗi PCR axit nucleic 1017 dùng cho vùng cài xen orf70

<400> 9

aggctcgtgc gcggatacat cg

22

<210> 10

<211> 22

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự nhân tạo đoạn mỗi PCR axit nucleic 1018 dùng cho vùng cài xen orf70

<400> 10

ttcggggctg ttagactcct cc

22

<210> 11

<211> 22

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự nhân tạo đoạn mỗi PCR axit nucleic 1007 dùng cho vùng cài xen orf1/3

<400> 11

ccaactcgcc gccatgagac cc

22

<210> 12

<211> 22

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự nhân tạo đoạn mỗi PCR axit nucleic 1008 dùng cho vùng cài xen orf1/3

<400> 12

agcgcgcccc gtacccagtg gg

22

<210> 13

<211> 417

<212> ADN

<213> Equine herpesvirus 1

<400> 13

ctccgagtag cccagaggag tatgtgaaaa gctgccactc gcaactactg aagataatTT 60

caacgctcaa gataaatccg gaggagtttc ctcgagaccc cgggtcgagg ctcgtgcgcg 120

gatacatcga gtattctaga ctcgagcgca agccctacac gcgctacccc tgctttcaac 180

gcgtcaacct gcacattgac ggggagtttc tgggtcacia gatgctagcg ttcaatgccg 240

cgatgcgccc atcggccgag gagctgctgt catacccaat gtttgcTcaa ctttaggatg 300

actaacctgt ttctgggagg agacagcgTg ggcgacggTg tataaagttg gtctgcTttc 360

aagccctgcc actgcgctac agtgccacca actgtaaagc ggtagtaagc tgcagtg 417

<210> 14

<211> 431

<212> ADN

<213> Equine herpesvirus 1

<400> 14

gaccctgttg gtgggtgcgg ttggactcag aatcttggcg caggcatgga agtttgcTg 60

tgacgaaaca tacgacacca tccgcgcaga agcaaagaat ttagagaccc acgtaccctc 120

aagtgcTgca gagtcgtctc tagaaaacca atcgacacag gaggagtcta acagccccga 180

agttgcccac ctgcgaagcg tcaacagcga tgacagtaca cacacggggg gtgcgtcgaa 240

cggcatccag gactgtgaca gtcagctcaa aactgtgtat gcctgcttgg ctctaattgg 300

actcggcaca tgtgccatga tagggttgat agtttacatt tgtgtattaa ggtcaaaact 360

gtcctctcgg aatttttTcg gcgcgcacaaa tgtaaaacat agaaattacc agcgacttga 420

gtacgttgct t 431

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

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

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

<400> 16
 gaccctgttg gtgggtgcgg ttggactcag aatcttggcg caggcatgga agtttgtcgg 60
 tgacgaaaca tacgacacca tccgctcaga agcaaagaat ttagagaccc acgtaccctc 120
 aagtgtctga gagtcgtctc tagaaaacca atcgacacag gaggagtcta acagccccga 180
 agttgcccac ctgcgaagcg tcaacagcga tgacagtaca cacacggggg gtgcgtcgaa 240
 cggcatccag gactgtgaca gtcagctcaa aactgtgtat gcctgcttgg ctctaattgg 300
 actcggcaca tgtgccatga tagggttgat agtttacatt tgtgtattaa ggtcaaaact 360
 gtctctctcg aatttttctgc gcgcgcaaaa tgtaaaacat agaaattacc agcgacttga 420
 gtacgttgct t 431

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

<400> 17

tctagactcg agcgcaagcc ctacacgcgc taccctgtct ttcaacgcgt caacctgcac	60
attgacgggg agtttctggt tcacaagatg ctagcggttca atgccgcgat gcgcccacg	120
gccgaggagc tgctgtcata cccaatgttt gctcaacttt aggatgacta acctgtttct	180
gggaggagac agcgtgggcg acggtgtata aagttggtct gctttcaagc cctgccactg	240
cgctacagtg ccaccaactg taaagcggta gtaagctgca gtg	283

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

<400> 18	
gaccctgttg gtgggtgcgg ttggactcag aatcttggcg caggcatgga agtttgtcgg	60
tgacgaaaca tacgacacca tccgcgcaga agcaaagaat ttagagaccc acgtaccctc	120
aagtgctgca gagtcgtctc taga	144

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

<400> 19	
atgttgactg tcttagcagc cctgagtctg ctacgcttgc ttacgagcgc aaccggacgg	60
ctcgccccag atgaactctg ttatgccgaa cccgcagaa ctggcagccc accaaacacc	120
cagcccgaac gccacccgt aatatttgag cccccaacaa ttgcgattaa agctgaatcc	180
aagggttggtg agctaatttt attagatcca cccatagatg taagctatcg cagagaagat	240
aaggtgaatg cgtccattgc ttggtttttt gactttggcg cttgccggat gcccatcgca	300
tacagagagt attacggttg tattggcaat gctgttcctt cccagagac ttgtgatgcg	360
tactcattta cccttattag gaccgagggt atcgtggagt ttaccatcgt aaacatgagc	420
ctcctgtttc agcctggaat atacgatagt ggcaatttta tctacagcgt tctcctggac	480
taccacatat ttacaggacg tgtaacgttg gaagtggaaa aggacacaaa ctatccctgt	540
ggcatgattc atggactcac tgcttacgga aacatcaacg tagatgaaac catggacaac	600
gccagcccac acccgcgtgc cgtggggtgc tttcccagac ccatcgacaa cgaagcgtgg	660

gcaaacgtta catttactga attggggata ccagacccaa actcatttct cgatgacgag 720
 ggtgattacc cgaatatatc agactgtcac tcgtgggagt catacaccta cccaaatacg 780
 ctgaggcagg ccacaggacc c 801

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

<400> 20
 atgttgactg tottagcagc tctgagtctg ctcagcttgc ttacgagcgc aaccggacgg 60
 ctgcgccag atgaactctg ttatgccgaa cccgcagaa ctggcagccc accaaacacc 120
 cagcccgaac gccacccgt aatatattgag cccccaacaa ttgcgattaa agctgaatcc 180
 aagggttgtg agctaatttt attagatcca cccatagatg taagctatcg cagagaagat 240
 aaggtgaatg cgtccattgc ttggtttttt gactttggcg cttgccggat gccatcgca 300
 tacagagagt attacggttg tattggcaat gctgttcct cccagagac ttgtgatgcg 360
 tactcattta cccttattag gaccgagggt atcgtggagt ttaccatcgt aaacatgagc 420
 ctctgttttc agcctggaat atacgatagt ggcaatttta tctacagcgt tctcctggac 480
 taccacatat ttacaggacg tgtaacgttg gaagtggaaa aggacacaaa ctatccctgt 540
 ggcatgattc atggactcac tgcttacgga aacatcaacg tagatgaaac catggacaac 600
 gccagccac accgcgtgc cgtggggtgc tttcccgagc ccatcgacaa cgaagcgtgg 660
 gcaaacgtta catttactga attggggata ccagacccaa actcatttct cgatgacgag 720
 ggtgattacc cgaatatatc agactgtcac tcgtgggagt catacaccta cccaaatacg 780
 ctgaggcagg ccacaggacc c 801

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

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

<400> 21
 tcgcgcgttt cggtgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacggtca 60

cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg	120
ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc	180
accatatgcg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgcc	240
attcgccatt caggctgcgc aactgttggg aagggcgatc ggtgcggggc tcttcgctat	300
tacgccagct ggcgaaaggg ggatgtgctg caaggcgatt aagttgggta acgccagggt	360
tttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgaatt cctccgagta ccccagagga	420
gtagtgaaa agctgccact cgcaactact gaagataatt tcaacgctca agataaatcc	480
ggaggagtth cctcgagacc ccgggtcgag gctcgtgcgc ggatacatcg agtattctag	540
actcgagcgc aagccctaca cgcgctaccc ctgctttcaa cgcgtcaacc tgcacattga	600
cggggagtth ctggttcaca agatgctagc gttcaatgcc gcgatgcgcc catcgggcca	660
ggagctgctg tcatacccaa tgtttgctca actttaggat gactaacctg tttctgggag	720
gagacagcgt gggcgacggg gtataaagtt ggtctgctth caagccctgc cactgcgcta	780
cagtgccacc aactgtaaag cggtagtaag ctgcagtggg cgacatgggt agcaagggcg	840
aggaggataa catggccatc atcaaggagt tcatgcgctt caagggtgcac atggaggggt	900
ccgtgaacgg ccacgagttc gagatcgagg gcgagggcga gggccgcccc tacgagggca	960
cccagaccgc caagctgaag gtgaccaagg gtggccccct gcccttcgcc tgggacatcc	1020
tgtccccctca gttcatgtac ggctccaagg cctacgtgaa gcaccccgcc gacatccccg	1080
actacttgaa gctgtccttc cccgaggggt tcaagtggga gcgctgatg aacttcgagg	1140
acggcggcgt ggtgaccgtg acccaggact cctccctgca ggacggcgag ttcattctaca	1200
aggtgaagct gcgcggcacc aacttccccct ccgacggccc cgtaatgcag aagaagacca	1260
tgggctggga ggctcctcc gagcggatgt accccgagga cggcgccctg aagggcgaga	1320
tcaagcagag gctgaagctg aaggacggcg gccactacga cgctgaggtc aagaccacct	1380
acaaggccaa gaagcccgtg cagctgcccg gcgcctacaa cgtcaacatc aagttggaca	1440
tcacctcca caacgaggac tacaccatcg tggaacagta cgaacgcgcc gagggccgcc	1500
actccaccgg cggcatggac gagctgtaca agtaactgtg ctttctagtt gccagccatc	1560
tgttgtttgc ccctcccccg tgccttcctt gaccctggaa ggtgccactc cactgtcct	1620

ttcctaataa aatgaggaaa ttgcatcgca ttgtctgagt aggtgtcatt ctattctggg	1680
gggtggggtg gggcaggaca gcaaggggga ggattgggaa gacaatagca ggcatgctgg	1740
ggatgcggtg ggctctatgg atccgaccct gttgggtgggt gcggttggac tcagaatctt	1800
ggcgcaggca tggaagtttg tcggtgacga aacatacgac accatccgcg cagaagcaaa	1860
gaatttagag acccacgtac cctcaagtgc tgcagagtcg tctctagaaa accaatcgac	1920
acaggaggag tctaacagcc ccgaagttgc ccacctgcga agcgtcaaca gcgatgacag	1980
tacacacacg gggggtgcgt cgaacggcat ccaggactgt gacagtcagc tcaaaactgt	2040
gtatgcctgc ttggctctaa ttggactcgg cacatgtgcc atgatagggt tgatagttaa	2100
catttggtgta ttaaggtcaa aactgtcctc tcggaatddd tcgcgcgcgc aaaatgtaaa	2160
acatagaaat taccagcgac ttgagtacgt tgcttaagct tggcgtaatc atggtcatag	2220
ctgtttcctg tgtgaaattg ttatccgctc acaattccac acaacatacg agccggaagc	2280
ataaagtgta aagcctgggg tgcctaataga gtgagctaac tcacattaat tgcgttgcgc	2340
tcactgcccg ctttccagtc gggaaacctg tcgtgccagc tgcattaatg aatcggccaa	2400
cgcgcgggga gaggcggttt gcgtattggg cgtcttccg cttcctcgct cactgactcg	2460
ctgcgctcgg tcgttcggct gcggcgagcg gtatcagctc actcaaaggc ggtaatacgg	2520
ttatccacag aatcagggga taacgcagga aagaacatgt gagcaaaagg ccagcaaaag	2580
gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc ataggctccg cccccctgac	2640
gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg actataaaga	2700
taccaggcgt ttccccctgg aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac cctgccgctt	2760
accggatacc tgtccgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg cgcttttctca tagctcacgc	2820
tgtaggtatc tcagttcggg gtaggtcggt cgctccaagc tgggctgtgt gcacgaaccc	2880
cccgttcagc ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc gtcttgagtc caaccggta	2940
agacacgact tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag agcgaggat	3000
gtaggcggtg ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact acggctacac tagaaggaca	3060
gtatdtggta tctgcgctct gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt tggtagctct	3120
tgatccggca aacaaaccac cgctggtagc ggtgggtttt ttgtttgcaa gcagcagatt	3180

```

acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct tttctacggg gtctgacgct      3240
cagtggaaacg aaaactcacg ttaagggatt ttggatcatga gattatcaaa aaggatcttc      3300
acctagatcc ttttaaatta aaaatgaagt tttaaatcaa tctaaagtat atatgagtaa      3360
acttgggtctg acagttacca atgcttaatc agtgaggcac ctatctcagc gatctgtcta      3420
tttcgttcat ccatagttgc ctgactcccc gtcgtgtaga taactacgat acgggagggc      3480
ttaccatctg gccccagtgc tgcaatgata ccgcgagacc cacgctcacc ggctccagat      3540
ttatcagcaa taaaccagcc agccggaagg gccgagcgca gaagtgggtcc tgcaacttta      3600
tccgcctcca tccagtctat taattgttgc cgggaagcta gagtaagtag ttcgccagtt      3660
aatagtttgc gcaacgttgt tgccattgct acaggcatcg tgggtgtcacg ctcgtcgttt      3720
ggtatggctt cattcagctc cggttcccaa cgatcaaggc gagttacatg atcccccatg      3780
ttgtgcaaaa aagcggttag ctcttcgggt cctccgatcg ttgtcagaag taagttggcc      3840
gcagtgttat cactcatggt tatggcagca ctgcataatt ctcttactgt catgccatcc      3900
gtaagatgct tttctgtgac tggtagtac tcaaccaagt cattctgaga atagtgtatg      3960
cggcgaccga gttgctcttg cccggcgta atacgggata ataccgcgcc acatagcaga      4020
actttaaaag tgctcatcat tggaaaacgt tcttcggggc gaaaactctc aaggatctta      4080
ccgctgttga gatccagttc gatgtaaccc actcgtgcac ccaactgac ttcagcatct      4140
tttactttca ccagcgtttc tgggtgagca aaaacaggaa ggcaaaatgc cgcaaaaaag      4200
ggaataaggg cgacacggaa atgttgaata ctcatactct tcctttttca atattattga      4260
agcatttatc agggttattg tctcatgagc ggatacatat ttgaatgtat ttagaaaaat      4320
aaacaaatag gggttccgcg cacatttccc cgaaaagtgc cacctgacgt ctaagaaacc      4380
attattatca tgacattaac ctataaaaat aggcgtatca cgaggccctt tcgtc      4435

```

```

<210> 22
<211> 5191
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<223> Trình tự nucleotit của vectơ chuyển nhiễm pU70-p455-71K71

```

```

<400> 22
caataaacgc ggtatgtcta ccttcaagcc tatgatgaac ggatgtttgg tgtttgcggc      60
tattataacg ctcttgagtt ttatgctatc tctgggaaca tgcgaaaatt acaggcgtgt      120
ggttcgggat cctagggata acagggtaat cgattttattc aacaaagcca cgttgtgtct      180
caaaatctct gatgttacat tgcacaagat aaaaatatat catcatgaac aataaaactg      240
tctgcttaca taaacagtaa tacaaggggt gttatgagcc atattcaacg ggaaacgtct      300
tgctcgaggc cgcgattaaa ttccaacatg gatgctgatt tatatgggta taaatgggct      360
cgcgataatg tcgggcaatc aggtgcgaca atctatcgat tgtatgggaa gcccgatgcg      420
ccagagttgt ttctgaaaca tggcaaaggt agcgttgcca atgatgttac agatgagatg      480
gtcagactaa actggctgac ggaatttatg cctcttccga ccatcaagca ttttatccgt      540
actcctgatg atgcatgggt actcaccact gcgatccccg ggaaaacagc attccaggta      600
ttagaagaat atcctgattc aggtgaaaat attgttgatg cgctggcagt gttcctgcgc      660
cggttgcatt cgattcctgt ttgtaattgt ccttttaaca gcgatcgcgt atttcgtctc      720
gctcaggcgc aatcacgaat gaataacggt ttggttgatg cgagtgattt tgatgacgag      780
cgtaatggct ggctgtttga acaagtctgg aaagaaatgc ataagctttt gccattctca      840
ccggattcag tcgtcactca tggtgatttc tcaattgata accttatttt tgacgagggg      900
aaattaatag gttgtattga tgttgacga gtcggaatcg cagaccgata ccaggatctt      960
gccatcctat ggaactgcct cggtgagttt tctccttcat tacagaaacg gctttttcaa     1020
aaatatggta ttgataatcc tgatatgaat aaattgcagt ttcatttgat gctcgatgag     1080
tttttctaaa ataaacgcgg tatgtctacc ttcaagccta tgatgaacgg atgtttggtg     1140
tttgcggcta ttataacgct cttgagtttt atgctatctc tgggaacatg cgaaaattac     1200
aggcgtgtgg ttcgggatcc gaccctgttg gtgggtgcgg ttggactcag aatcttggcg     1260
caggcatgga agtttgctcg tgacgaaaca tacgacacca tccgcgcaga agcaaagaat     1320
ttagagaccc acgtaccctc aagtgctgca gagtcgtctc tagaaaacca atcgacacag     1380
gaggagtcta acagccccga agttgccac ctgcgaagcg tcaacagcga tgacagtaca     1440
cacacggggg gtgcgtcgaa cggcatccag gactgtgaca gtcagctcaa aactgtgtat     1500
gcctgcttgg ctctaattgg actcggcaca tgtgccatga tagggttgat agtttacatt     1560

```


tgtgtattaa ggtcaaaaact gtcctctcgg aattttttcgc gcgcgcaaaa tgtaaaacat	1620
agaaattacc agcgacttga gtacgttgct taagcttggc gtaatcatgg tcatagctgt	1680
ttcctgtgtg aaattgttat ccgctcacia ttccacacia catacgagcc ggaagcataa	1740
agtgtaaagc ctgggggtgcc taatgagtga gctaactcac attaattgcg ttgcgctcac	1800
tgcccgcctt ccagtcggga aacctgtcgt gccagctgca ttaatgaatc ggccaacgcg	1860
cggggagagg cggtttgcgt attgggcgct cttccgcttc ctcgctcact gactcgctgc	1920
gctcggtcgt tcggctgcgg cgagcggat cagctcactc aaaggcggta atacggttat	1980
ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca	2040
ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc	2100
atcacaaaaa tcgacgtca agtcagaggt ggcgaaaccc gacaggacta taaagatacc	2160
aggcgtttcc ccctggaagc tccctcgtgc gctctcctgt tccgaccctg ccgcttaccg	2220
gatacctgtc cgcttttctc ccttcgggaa gcgtggcgct ttctcatagc tcacgctgta	2280
ggtatctcag ttcggtgtag gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac gaaccccccg	2340
ttcagccga ccgctgcgc ttatccggta actatcgtct tgagtccaac ccggtaaagc	2400
acgacttata gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag	2460
gcggtgctac agagtctctg aagtgggtgc ctaactacgg ctacactaga aggacagtat	2520
ttggtatctg cgctctgctg aagccagtta ccttcggaaa aagagttggg agctcttgat	2580
ccggcaaaaca aaccaccgct ggtagcgggt gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc	2640
gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc tacgggggtct gacgctcagt	2700
ggaacgaaaa ctcacgttaa gggattttgg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct	2760
agatcctttt aaattaaaaa tgaagtttta aatcaatcta aagtatatat gagtaaaactt	2820
ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcagtg aggcacctat ctcagcgatc tgtctatttc	2880
gttcatccat agttgcctga ctccccgtcg tgtagataac tacgatacgg gagggcttac	2940
catctggccc cagtgcctga atgataccgc gagaccacg ctcaccggct ccagatttat	3000
cagcaataaa ccagccagcc ggaagggccg agcgcagaag tggctctgca actttatccg	3060
cctccatcca gtctattaat tgttgccggg aagctagagt aagtagttcg ccagttaata	3120

gtttgcgcaa	cgttgttgcc	attgctacag	gcatcgtggt	gtcacgctcg	tcgtttggta	3180
tggcttcatt	cagctccggt	tcccaacgat	caaggcgagt	tacatgatcc	cccatgttgt	3240
gcaaaaaagc	ggttagctcc	ttcggtcctc	cgatcgttgt	cagaagtaag	ttggccgcag	3300
tgttatcact	catggttatg	gcagcactgc	ataattctct	tactgtcatg	ccatccgtaa	3360
gatgcttttc	tgtgactggt	gagtactcaa	ccaagtcatt	ctgagaatag	tgtatgcggc	3420
gaccgagttg	ctcttgcccg	gcgtaatac	gggataatac	cgcgccacat	agcagaactt	3480
taaaagtgct	catcattgga	aaacgttctt	cggggcgaaa	actctcaagg	atcttaccgc	3540
tgttgagatc	cagttcgatg	taaccctctc	gtgcacccaa	ctgatcttca	gcatctttta	3600
ctttcaccag	cgtttctggg	tgagcaaaaa	caggaaggca	aatgccgca	aaaaagggaa	3660
taagggcgac	acggaaatgt	tgaatactca	tactcttcct	ttttcaatat	tattgaagca	3720
tttatcaggg	ttattgtctc	atgagcggat	acatatttga	atgtatttag	aaaaataaac	3780
aaataggggt	tccgcgcaca	tttccccgaa	aagtgccacc	tgacgtctaa	gaaaccatta	3840
ttatcatgac	attaacctat	aaaaataggc	gtatcacgag	gccctttcgt	ctcgcgcggt	3900
tcggtgatga	cggtgaaaac	ctctgacaca	tgcagctccc	ggagacggtc	acagcttgtc	3960
tgtaagcgga	tgccgggagc	agacaagccc	gtcagggcgc	gtcagcgggt	gttggcgggt	4020
gtcggggctg	gcttaactat	gcggcatcag	agcagattgt	actgagagtg	caccatatgc	4080
gggtgtgaaat	accgcacaga	tgcgtaagga	gaaaataaccg	catcaggcgc	cattcgccat	4140
tcaggctgcg	caactgttgg	gaagggcgat	cgggtgcgggc	ctcttcgcta	ttacgccagc	4200
tggcgaaagg	gggatgtgct	gcaaggcgat	taagttgggt	aacgccaggg	ttttcccagt	4260
cacgacgttg	taaaacgacg	gccagtgaat	tcctccgagt	accccagagg	agtatgtgaa	4320
aagctgccac	tcgcaactac	tgaagataat	ttcaacgctc	aagataaatc	cggaggagtt	4380
tcctcgagac	cccgggtcga	ggctcgtgcg	cggatacatc	gagtattcta	gactcgagcg	4440
caagccctac	acgcgctacc	cctgctttca	acgcgtcaac	ctgcacattg	acggggagtt	4500
tctggttcac	aagatgctag	cgttcaatgc	cgcgatgcgc	ccatcggccg	aggagctgct	4560
gtcataccca	atgtttgctc	aacttttagga	tgactaacct	gtttctggga	ggagacagcg	4620
tgggcgacgg	tgtataaagt	tggtctgctt	tcaagccctg	ccactgcgct	acagtgccac	4680

caactgtaaa gcggtagtaa gctgcagtgg tcgactgggtg gtagcatata ctaccttatt 4740
 tatacgctcc gagctgtttt tcagcatgct agcacccaac gccgagcgag agtatataac 4800
 tcccatcatt gccacaagc ttatgccact tattagcgtc cgctctgccg ttgcttagt 4860
 cataatatct accgccgttt acgcagcaga cgctatctgc gacacaattg gatttgcgat 4920
 accgcgcatg tggatgtgta ttttaatgag atcaacctcc atgaagcgta actagggggc 4980
 ctcccactga ggcactaccg gcttagcagc tgactaacac agtataaaac gtgagaagaa 5040
 atcagtctca tgcgccatta gcgctaggct agttagcggtg gaggaccgga gcgctaccgc 5100
 cagcagtttc atccgcctgg ttacgggttt gttaacacct accggtgttt taccgctacc 5160
 ataggatccg atccatgggc ggccgcggta c 5191

<210> 23

<211> 6892

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

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

<400> 23

caataaacgc ggtatgtcta ccttcaagcc tatgatgaac ggatgtttgg tgtttgcggc 60
 tattataacg ctcttgagtt ttatgctatc tctgggaaca tgcgaaaatt acaggcgtgt 120
 ggttcgggat cctagggata acagggtaat cgatttattc aacaaagcca cgttgtgtct 180
 caaaatctct gatgttacat tgcacaagat aaaaatatat catcatgaac aataaaaactg 240
 tctgcttaca taaacagtaa tacaaggggt gttatgagcc atattcaacg ggaaacgtct 300
 tgctcgaggc cgcgattaaa ttccaacatg gatgctgatt tatatgggta taaatgggct 360
 cgcgataatg tcgggcaatc aggtgcgaca atctatcgat tgtatgggaa gcccgatgcg 420
 ccagagttgt ttctgaaaca tggcaaaggt agcgttgcca atgatgttac agatgagatg 480
 gtcagactaa actggctgac ggaatttatg cctcttccga ccatcaagca ttttatccgt 540
 actcctgatg atgcatgggt actcaccact gcgatccccg ggaaaacagc attccaggta 600
 ttagaagaat atcctgattc aggtgaaaat attgttgatg cgctggcagt gttcctgcgc 660
 cggttgcatc cgattcctgt ttgtaattgt ccttttaaca gcgatcgcgat atttcgtctc 720

gctcaggcgc aatcacgaat gaataacggt ttggttgatg cgagtgattt tgatgacgag	780
cgtaatggct ggctgttga acaagtctgg aaagaaatgc ataagctttt gccattctca	840
ccggattcag tcgtcactca tgggtgatttc tcaacttgata accttatttt tgacgagggg	900
aaattaatag gttgtattga tgttggacga gtcggaatcg cagaccgata ccaggatctt	960
gccatcctat ggaactgcct cggtgagttt tctccttcat tacagaaacg gctttttcaa	1020
aaatatggta ttgataatcc tgatatgaat aaattgcagt ttcatttgat gctcgatgag	1080
tttttctaaa ataaacgcgg tatgtctacc ttcaagccta tgatgaacgg atgtttggtg	1140
tttgcggtcta ttataacgct cttgagtttt atgctatctc tgggaacatg cgaaaattac	1200
aggcgtgtgg ttcgggatcc gaccctgttg gtgggtgcgg ttggactcag aatcttggcg	1260
caggcatgga agtttgctcg tgacgaaaca tacgacacca tccgcgcaga agcaaagaat	1320
ttagagaccc acgtaccctc aagtgctgca gagtcgtctc tagaaaacca atcgacacag	1380
gaggagtcta acagccccga agttgccac ctgcgaagcg tcaacagcga tgacagtaca	1440
cacacggggg gtgcgtcgaa cggcatccag gactgtgaca gtcagctcaa aactgtgtat	1500
gcctgcttgg ctctaattgg actcggcaca tgtgccatga tagggttgat agtttacatt	1560
tgtgtattaa ggtcaaaact gtcctctcgg aatttttcgc gcgcgcaaaa tgtaaaacat	1620
agaaattacc agcgacttga gtacgttgct taagcttggc gtaatcatgg tcatagctgt	1680
ttcctgtgtg aaattgttat ccgctcaca ttccacaca catacgagcc ggaagcataa	1740
agtgtaaagc ctgggggtgcc taatgagtga gctaactcac attaatgcg ttgcgctcac	1800
tgcccgcctt ccagtcggga aacctgtcgt gccagctgca ttaatgaatc ggccaacgcg	1860
cggggagagg cggtttgct attgggcgct cttccgcttc ctgcgtcact gactcgctgc	1920
gctcggtcgt tcggctgcgg cgagcggat cagctcactc aaaggcggtg atacggttat	1980
ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca	2040
ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc	2100
atcacaaaaa tcgacgtca agtcagaggt ggcgaaaccc gacaggacta taaagatacc	2160
aggcgtttcc cctggaagc tccctcgtgc gctctcctgt tccgaccctg ccgcttaccg	2220
gatacctgtc cgcctttctc ccttcgggaa gcgtggcgct ttctcatagc tcacgctgta	2280

ggtatctcag ttcggtgtag gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac gaaccccccg	2340
ttcagcccga ccgctgcgcc ttatccggtg actatcgtct tgagtccaac ccggtgaagac	2400
acgacttata gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag	2460
gcggtgctac agagtctctg aagtgggtggc ctaactacgg ctacactaga aggacagtat	2520
ttggtatctg cgctctgctg aagccagtta ccttcggaaa aagagttggg agctcttgat	2580
ccggcaaaaa aaccaccgct ggtagcgggt gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc	2640
gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc tacgggggtct gacgctcagt	2700
ggaacgaaaa ctcacgttaa gggattttgg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct	2760
agatcctttt aaattaaaaa tgaagtttta aatcaatcta aagtatatat gagtaaactt	2820
ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcagtg aggcacctat ctacgcgatc tgtctatttc	2880
gttcatccat agttgcctga ctccccgtcg tgtagataac tacgatacgg gagggccttac	2940
catctggccc cagtgcctga atgataccgc gagaccacg ctacccggct ccagatttat	3000
cagcaataaa ccagccagcc ggaagggccg agcgcagaag tggctctgca actttatccg	3060
cctccatcca gtctattaat tgttgccggg aagctagagt aagtagttcg ccagttaata	3120
gtttgcgcaa cgttgttgcc attgctacag gcatcgtggg gtcacgctcg tcgtttggta	3180
tggcttcatt cagctccggg tcccaacgat caaggcgagt tacatgatcc cccatgttgt	3240
gcaaaaaagc ggtagctcc ttcggtcctc cgatcgttgt cagaagtaag ttggccgcag	3300
tgttatcact catgggtatg gcagcactgc ataattctct tactgtcatg ccatccgtaa	3360
gatgcttttc tgtgactggg gagtactcaa ccaagtcatt ctgagaatag tgtatgcggc	3420
gaccgagttg ctcttgcccg gcgtcaatac gggataatac cgcgccacat agcagaactt	3480
taaaagtgct catcattgga aaacgttctt cggggcgaaa actctcaagg atcttaccgc	3540
tgttgagatc cagttcgatg taaccactc gtgcacccaa ctgatcttca gcatctttta	3600
ctttcaccag cgtttctggg tgagcaaaaa caggaaggca aaatgccgca aaaaagggaa	3660
taagggcgac acggaaatgt tgaatactca tactcttcct ttttcaatat tattgaagca	3720
tttatcaggg ttattgtctc atgagcggat acatatttga atgtatttag aaaaataaac	3780
aaataggggt tccgcgcaca tttccccgaa aagtgccacc tgacgtctaa gaaaccatta	3840

ttatcatgac attaacctat aaaaataggc gtatcacgag gccctttcgt ctgcgcggtt	3900
tcggtgatga cgggtgaaaac ctctgacaca tgcagctccc ggagacggtc acagcttgtc	3960
tgtaagcgga tgccgggagc agacaagccc gtcagggcgc gtcagcgggt gttggcgggt	4020
gtcggggctg gcttaactat gcggcatcag agcagattgt actgagagtg caccatatgc	4080
ggtgtgaaat accgcacaga tgcgtaagga gaaaataccg catcaggcgc cattcgccat	4140
tcaggctgcg caactgttgg gaagggcgat cgggtgcgggc ctcttcgcta ttacgccagc	4200
tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt aacgccaggg ttttcccagt	4260
cacgacgttg taaaacgacg gccagtgaat tcttccgagt accccagagg agtatgtgaa	4320
aagctgccac tcgcaactac tgaagataat ttcaacgctc aagataaatc cggaggagt	4380
tcttcgagac cccgggtcga ggctcgtgcg cggatacatc gagtattcta gactcgagcg	4440
caagccctac acgcgctacc cctgctttca acgcgtcaac ctgcacattg acggggagt	4500
tctggttcac aagatgctag cgttcaatgc cgcgatgcgc ccatcggccg aggagctgct	4560
gtcataccca atgtttgctc aactttagga tgactaacct gtttctggga ggagacagcg	4620
tgggcgacgg tgtataaagt tggctctgctt tcaagccctg ccaactgcgct acagtgccac	4680
caactgtaaa gcggtagtaa gctgcagtgg tcgactgggt gtagcatata ctaccttatt	4740
tatacgctcc gagctgtttt tcagcatgct agcacccaac gccgagcgag agtatataac	4800
tcccatcatt gccacaagc ttatgccact tattagcgtc cgctctgccg tttgcttagt	4860
cataatatct accgccgttt acgcagcaga cgctatctgc gacacaattg gatttgcgat	4920
accgcgcatg tggatgtgta ttttaatgag atcaacctcc atgaagcgta actagggggc	4980
ctcccactga ggcactaccg gcttagcagc tgactaacac agtataaaac gtgagaagaa	5040
atcagtctca tgcgccatta gcgctaggct agttagcgtg gaggaccgga gcgctaccgc	5100
cagcagtttc atccgcctgg ttacgggttt gttaacacct accggtgttt taccgctacc	5160
ataggatccg atccatgggc ggccgcatga agaccgtgat cgccctgagt tacatcttct	5220
gcctgggtgtt tgggcaggac ctccctggta aaggcaacaa cacggccacg ctgtgccttg	5280
ggcaccacgc cgtgccgaac ggcacccttg tgaaaactat taccgacgat cagatcgagg	5340
tgaccaacgc caccgaactg gttcagaatt ttagcatggg caaaatttgc aataaccgc	5400

accgcattct ggacggggcc aactgcacgc tgatcgattc attgctgggt gatccccact	5460
gcgatggctt tcaaaacgaa aagtgggact tgttcacga acgcagcaag gcattcagca	5520
actgctaccc atacgacgtg cccgaataca ccagcctgcg aagcctgac gcgagctctg	5580
ggaccctgga gttcaccaat gagaacttca attggaccgg agtgacccaa aacggtggct	5640
ccagcgctg taaaagggga cccaataaca gcttcttttag caagttgaat tggctttaca	5700
agagcggcaa tacttaccg atgttgaatg tgaccatgcc caacagtgc gactttgata	5760
aactgtacat atggggcgtg caccatccca gcacggaccg cgaacagata aacctgtacg	5820
tgcaggccag cgggaagata atcgtgagca ccaagcgcag ccagcagacc atcattccca	5880
acattggcag ccgaccgtgg gtgcgcggtc tgagctcccg catcagcata tactggacca	5940
ttgtcaagcc gggagacatc ctgatcatca actctaattg caatcttata gcccacgcg	6000
gctacttcaa gatgcagacc ggcaaaagca gtgtgatgag gagcgacgcc cccatcgaca	6060
cctgcaatag cgaatgcac accccaatg gcagcatccc caacgacaag cttttccaga	6120
acgtgaataa gatcacctac ggcgcggtgc ccaagtacat caagcagaac accctgaagc	6180
tggccaccgg catgcgcaac atccccgagc gacagacacg gggcattttt ggcgcaatcg	6240
cagggttcat tgagaatggc tgggaggga tggttaacgg ctggtacggc ttccgccatc	6300
agaactctga aggaatcggc caagctgcgg atctgaagtc cacgcaagca gccatcaacc	6360
agatcaacgg caagcttaac cgcgtgattg aaaagacgaa cgagaaattc caccaaatag	6420
agaaagaatt cagcgaggtg gagggccgca tccaagacct cgagcgctac gtggaggaca	6480
ccaagatcga cctgtggagc tacaatgcc agctcctggt cgccttgga aaccaacaca	6540
ccattgacct gaccgacagc gagatgaata aactcttcga gaagaccgg aagcaactcc	6600
gagagaacgc cgaagacatg ggtaatgggt gttttaagat ctaccacaag tgcgacaata	6660
gctgcatgga gagcatccga aacggaacct acgaccacaa cgagtaccgc gatgaggcag	6720
ttaataaccg cttccaaatc aaaagcgtgg aactgaagag tggctataag gactggatac	6780
tgtggatcag ctttgccata agctgcttcc tgctgtgcgc cgtttggttg ggtttcatca	6840
tgtgggcctg tcaaaagggc aatattcgct gtaacatctg catttgaggt ac	6892

<210> 24
 <211> 4977
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nucleotit của vectơ chuyển nhiễm pU-1-3-p430-BGHKBGH

<400> 24
 cctgtgcctt ctagttgccca gccatctggt gtttgcccct ccccggtgcc ttccttgacc 60
 ctggaaggtg ccactccacac tgtcctttcc taataaaatg aggaaattgc atcgcatgtg 120
 ctgagtaggt gtcattctat tctggggggt ggggtggggc aggacagcaa gggggaggat 180
 tgggaagaca atagcaggca tgctggggat gcggtgggct ctatggatcc tagggataac 240
 agggtaatcg atttattcaa caaagccacg ttgtgtctca aaatctctga tgttacattg 300
 cacaagataa aaatatatca tcatgaacaa taaaactgtc tgcttacata aacagtaata 360
 caaggggtgt tatgagccat attcaacggg aaacgtcttg ctcgaggccg cgattaaatt 420
 ccaacatgga tgctgattta tatgggtata aatgggctcg cgataatgtc gggcaatcag 480
 gtgcgacaat ctatcgattg tatgggaagc ccgatgcgcc agagttgttt ctgaaacatg 540
 gcaaaggtag cgttgccaat gatgttacag atgagatggt cagactaaac tggctgacgg 600
 aatttatgcc tcttccgacc atcaagcatt ttatccgtac tcctgatgat gcatggttac 660
 tcaccactgc gatccccggg aaaacagcat tccaggtatt agaagaatat cctgattcag 720
 gtgaaaatat tgttgatgcg ctggcagtggt tcctgcgccg gttgcattcg attcctgttt 780
 gtaattgtcc ttttaacagc gatcgcgtat ttcgctctcg tcaggcgcaa tcacgaatga 840
 ataacggttt ggttgatgcg agtgattttg atgacgagcg taatggctgg cctggtgaac 900
 aagtctggaa agaaatgcat aagcttttgc cattctcacc ggattcagtc gtcactcatg 960
 gtgattttctc acttgataac cttatttttg acgaggggaa attaataggt tgtattgatg 1020
 ttggacgagt cggaatcgca gaccgatacc aggatcttgc catcctatgg aactgcctcg 1080
 gtgagttttc tccttcatta cagaaacggc tttttcaaaa atatggtatt gataatcctg 1140
 atatgaataa attgcagttt catttgatgc tcgatgagtt tttctaacca tggctgtgcc 1200
 ttctagttgc cagccatctg ttgtttgccc ctccccctg ccttccttga ccctggaagg 1260
 tgccactccc actgtccttt cctaataaaa tgaggaaatt gcatcgcatg gtctgagtag 1320

gtgtcattct attctggggg gtgggggtggg gcaggacagc aagggggagg attgggaaga	1380
caatagcagg catgctgggg atgcggtggg ctctatggat ccgaccctcc ccgggggctaa	1440
aaagctgcgt cttcacgccc gaggcgctta ttgcccactg ggtacggggc gcgcttttat	1500
atgtgtaacg tcccaccggt gtgacgcacg tactacggtt gttctaaata gctgtccccg	1560
tgattgcctc ggctgcacac atcgctagg tttccgccgt gcctgggtgc gagggcccac	1620
ccctgtaacc aacatcgatg ggggcctgct gctccttcgc taccttagga ccgttatagt	1680
tacgtcaagc ttggcgtaat catggtcata gctgtttcct gtgtgaaatt gttatccgct	1740
cacaattcca cacaacatac gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaata	1800
agtgagctaa ctcacattaa ttgcgttgcg ctcaactgcc gctttccagt cgggaaacct	1860
gtcgtgccag ctgcattaat gaatcggcca acgcgcgggg agaggcggtt tgcgtattgg	1920
gcgctcttcc gcttcctcgc tcaactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc	1980
ggatatcagct cactcaaagg cggtaatagc gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg	2040
aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct	2100
ggcgtttttc cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca	2160
gaggtggcga aaccgcacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct	2220
cgtgcgctct cctgttccga ccctgccgct taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc	2280
gggaagcgtg gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat ctcaagtccg tgtaggctcg	2340
tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag ccgaccgct gcgccttacc	2400
cggtaaactat cgtcttgagt ccaaccggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc	2460
cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgtaggcggt gctacagagt tcttgaagtg	2520
gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtatttggt atctgcgctc tgctgaagcc	2580
agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag	2640
cggtgggtttt ttgttttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaggat ctcaagaaga	2700
tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac gttaagggat	2760
tttggtcatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaat aaatgaag	2820
ttttaaatca atctaaagta tatatgagta aacttgggtc gacagttacc aatgcttaat	2880

cagtgaggca cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagttg cctgactccc	2940
cgtcgtgtag ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat	3000
accgcgagac ccacgctcac cggctccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaag	3060
ggccgagcgc agaagtggtc ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta ttaattgttg	3120
ccgggaagct agagtaagta gttcgccagt taatagtttg cgcaacgttg ttgccattgc	3180
tacaggcatc gtggtgtcac gctcgtcgtt tggatatggct tcattcagct ccggttccca	3240
acgatcaagg cgagttacat gatcccccat gttgtgcaaa aaagcgggta gtccttcgg	3300
tcctccgata gttgtcagaa gtaagttggc cgcagtggtta tcactcatgg ttatggcagc	3360
actgcataat tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc ttttctgtga ctggtgagta	3420
ctcaaccaag tcattctgag aatagtgtat ggggcgaccg agttgctctt gccggcgctc	3480
aatacgggat aataccgcgc cacatagcag aactttaaaa gtgctcatca ttggaaaacg	3540
ttcttcgggg cgaaaactct caaggatctt accgctgttg agatccagtt cgatgtaacc	3600
cactcgtgca cccaactgat cttcagcatc ttttactttc accagcgttt ctgggtgagc	3660
aaaaacagga aggcaaatg ccgcaaaaaa gggaataagg gcgacacgga aatggtgaat	3720
actcatactc ttcctttttc aatattattg aagcatttat cagggttatt gtctcatgag	3780
cggatacata tttgaatgta tttagaaaaa taaacaaata ggggttccgc gcacatttcc	3840
ccgaaaagtg ccacctgacg tctaagaaac cattattatc atgacattaa cctataaaaa	3900
taggcgtatc acgaggccct ttcgtctcgc gcgtttcggg gatgacgggtg aaaacctctg	3960
acacatgcag ctcccggaga cggtcacagc ttgtctgtaa gcggatgccg ggagcagaca	4020
agcccgtcag ggcgcgtcag cgggtgttgg cgggtgtcgg ggctggctta actatgcggc	4080
atcagagcag attgtactga gagtgcacca tatgcggtgt gaaataccgc acagatgcgt	4140
aaggagaaaa taccgcatca ggcgccattc gccattcagg ctgcgcaact gttgggaagg	4200
gcgatcgggtg cgggcctctt cgctattacg ccagctggcg aaagggggat gtgctgcaag	4260
gcgattaagt tgggtaacgc cagggttttc ccagtcacga cgttgtaaaa cgacggccag	4320
tgaattcgac gtaactataa cggtcctaag gtagcgaatt tttccattgg gccctcct	4380
tttggctctg ggtatttagc ttcctccca cttctcattc cactttctcc acctgcacct	4440

```

tttccatctc ctctccaact cgccgccatg agacccgagg gagtttcgcg gggccgcgcc      4500
tcctctgtct ccatctccaa ctagtgtcga cctctatttg aggacccgcc gagtacccca      4560
caagagtatg taaaaagctg tcattctcaa ctactgagaa taatatcaaa gctaaagata      4620
aaccctgagg agtttccacg ggaaccagag tctaggctcg tgcgcggata catcgaatac      4680
gccagcctag agcgtaagcc acatacgcgc tatccttgct tccagcgcgt gaacctacac      4740
attgacgggg aatttttgat ccataaaatg ctagcggttca atgctgcgat gcgcccattc      4800
gcagaagagt tgttgtccta cccaatgttt atgaatctgt aggatgacta acagatttgg      4860
ggtaggagac gcgtgggcga tactgtataa agttgtacta cttaccagcc cagtcagtgt      4920
gctgtagtgc caccacctgt aaagctgtga taagctgcag ttgcgggccgc cgggtac      4977

```

<210> 25

<211> 6678

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

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

<400> 25

```

cctgtgcctt ctagttgcca gccatctggt gtttgccctt ccccggtgcc ttccttgacc      60
ctggaagggt ccactccac tgtcctttcc taataaaatg aggaaattgc atcgcatgt      120
ctgagtaggt gtcattctat tctggggggt ggggtggggc aggacagcaa gggggaggat      180
tggaagaca atagcaggca tgctggggat gcggtgggct ctatggatcc tagggataac      240
agggtaatcg atttattcaa caaagccacg ttgtgtctca aaatctctga tgttacattg      300
cacaagataa aaatatatca tcatgaacaa taaaactgtc tgcttacata aacagtaata      360
caaggggtgt tatgagccat attcaacggg aaacgtcttg ctcgaggccg cgattaaatt      420
ccaacatgga tgctgattta tatgggtata aatgggctcg cgataatgtc gggcaatcag      480
gtgcgacaat ctatcgattg tatgggaagc ccgatgcgcc agagttgttt ctgaaacatg      540
gcaaaggtag cgttgccaat gatgttacag atgagatggc cagactaaac tggctgacgg      600
aatttatgcc tcttccgacc atcaagcatt ttatccgtac tcctgatgat gcatggttac      660
tcaccactgc gatccccggg aaaacagcat tccaggtatt agaagaatat cctgattcag      720

```

gtgaaaatat tgttgatgcg ctggcagtgt tcctgcgccg gttgcattcg attcctgttt	780
gtaattgtcc ttttaacagc gatcgcgat ttcgtctcgc tcaggcgcaa tcacgaatga	840
ataacggttt ggttgatgcg agtgattttg atgacgagcg taatggctgg cctggtgaac	900
aagtctggaa agaaatgcat aagcttttgc cattctcacc ggattcagtc gtcactcatg	960
gtgatttctc acttgataac cttatttttg acgaggggaa attaataggt tgtattgatg	1020
ttggacgagt cggaatcgca gaccgatacc aggatcttgc catcctatgg aactgcctcg	1080
gtgagttttc tccttcatta cagaaacggc tttttcaaaa atatggtatt gataatcctg	1140
atatgaataa attgcagttt catttgatgc tcgatgagtt tttctaacca tggctgtgcc	1200
ttctagttgc cagccatctg ttgtttgccc ctccccctg ccttccttga ccctggaagg	1260
tgccactccc actgtccttt cctaataaaa tgaggaaatt gcatcgcat gtctgagtag	1320
gtgtcattct attctggggg gtgggggtgg gcaggacagc aagggggagg attgggaaga	1380
caatagcagg catgctgggg atgcggtggg ctctatggat ccgaccctcc ccggggctaa	1440
aaagctgcgt cttcacgccc gaggcgctta ttgcccactg ggtacggggc gcgcttttat	1500
atgtgtaacg tcccaccggt gtgacgcacg tactacggtt gttctaaata gctgtccccg	1560
tgattgcctc ggctgcacac atcgccatag tttccgccgt gcctgggtgc gagggccac	1620
ccctgtaacc aacatcgatg ggggcctgct gctccttcgc taccttagga ccgttatagt	1680
tacgtcaagc ttggcgtaat catggtcata gctgtttcct gtgtgaaatt gttatccgct	1740
cacaattcca cacaacatac gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaatg	1800
agtgagctaa ctcacattaa ttgcgttgcg ctcaactgcc gctttccagt cgggaaacct	1860
gtcgtgccag ctgcattaat gaatcgcca acgcgcgggg agaggcggtt tgcgtattgg	1920
gcgctcttcc gcttcctcgc tcaactgact gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc	1980
ggtatcagct cactcaaagg cggtaatagc gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg	2040
aaagaacatg tgagcaaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct	2100
ggcgtttttc cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca	2160
gaggtggcga aacccgacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct	2220
cgtgcgctct cctgttccga ccctgccgct taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc	2280

gggaagcgtg ggcgtttctc atagctcacg ctgtaggtat ctcagttcgg tgtaggtcgt	2340
tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccgct ggccttatac	2400
cggtaactat cgtcttgagt ccaacccggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc	2460
cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgtaggcggt gctacagagt tcttgaagtg	2520
gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtatttggt atctgcgctc tgctgaagcc	2580
agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag	2640
cggtggtttt tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga	2700
tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac gttaagggat	2760
tttggtcatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaatt aaaaatgaag	2820
ttttaaatca atctaaagta tatatgagta aacttggtct gacagttacc aatgcttaat	2880
cagtgaggca cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagttg cctgactccc	2940
cgtcgtgtag ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat	3000
accgcgagac ccacgctcac cggtccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaag	3060
ggccgagcgc agaagtggtc ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta ttaattgttg	3120
ccgggaagct agagtaagta gttcgccagt taatagtttg cgcaacgttg ttgccattgc	3180
tacaggcatc gtggtgtcac gctcgtcgtt tggatatggct tcattcagct ccggttccca	3240
acgatcaagg cgagttacat gatcccccat gttgtgcaaa aaagcggtta gtccttcggt	3300
tcctccgatc gttgtcagaa gtaagttggc cgcagtgtta tcaactcatgg ttatggcagc	3360
actgcataat tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc ttttctgtga ctggtgagta	3420
ctcaaccaag tcattctgag aatagtgtat gcggcgaccg agttgctctt gcccggcgtc	3480
aatacgggat aataccgcgc cacatagcag aactttaaaa gtgctcatca ttggaaaacg	3540
ttcttcgggg cgaaaactct caaggatctt accgctgttg agatccagtt cgatgtaacc	3600
cactcgtgca cccaactgat cttcagcatc ttttactttc accagcgttt ctgggtgagc	3660
aaaaacagga aggcaaaatg ccgcaaaaaa gggaataagg gcgacacgga aatggtgaat	3720
actcatactc ttcttttttc aatattattg aagcatttat cagggttatt gtctcatgag	3780
cggatacata ttgtaatgta tttagaaaaa taaacaaata ggggttccgc gcacatttcc	3840

ccgaaaagtg ccacctgacg tctaagaaac cattattatc atgacattaa cctataaaaa	3900
taggcgtatc acgaggccct ttcgtctcgc gcgttttcggt gatgacggtg aaaacctctg	3960
acacatgcag ctcccggaga cggtcacagc ttgtctgtaa gcggatgccg ggagcagaca	4020
agcccgtcag ggcgcgtcag cgggtgttgg cgggtgtcgg ggctggctta actatgcggc	4080
atcagagcag attgtactga gagtgcacca tatgcggtgt gaaataccgc acagatgcgt	4140
aaggagaaaa taccgcatca ggcgccattc gccattcagg ctgcgcaact gttgggaagg	4200
gcgatcggtg cgggcctctt cgctattacg ccagctggcg aaagggggat gtgctgcaag	4260
gcgattaagt tgggtaacgc cagggttttc ccagtcacga cgttgtaaaa cgacggccag	4320
tgaattcgac gtaactataa cggtcctaag gtagcgaatt tttccattgg gccctcct	4380
tttggctctg ggtatttagc ttccctccca cttctcattc cactttctcc acctgcacct	4440
tttccatctc ctctccaact cgccgccatg agacccgagg gagtttcgcg gggccgcgcc	4500
tcctctgtct ccatctccaa ctagtgtcga cctctatttg aggacccgcc gagtaccca	4560
caagagtatg taaaaagctg tcattctcaa ctactgagaa taatatcaaa gctaaagata	4620
aaccctgagg agtttccacg ggaaccagag tctaggctcg tgcgcgata catcgaatac	4680
gccagcctag agcgtaagcc acatacgcg c ttccttgct tccagcgcg gaacctacac	4740
attgacgggg aatttttgat ccataaaatg ctagcgttca atgctgcgat gcgcccattc	4800
gcagaagagt tgttgtccta cccaatgttt atgaatctgt aggatgacta acagatttgg	4860
ggtggagacg gcgtgggcga tactgtataa agttgtacta cttaccagcc cagtcagtgt	4920
gctgtagtgc caccacctgt aaagctgtga taagctgcag ttgcggccgc cgatggaggc	4980
aaaattgttc gtgctgttct gcgccttcac tgctctgaag gcagacacca tctgcgtggg	5040
ttaccagccc aataattcca ccgacacggt ggataccatc ctggagaaga acgtgaccgt	5100
gactcattcc gtgaacctct tggagaactc acacaatggg aaattgtgca gccttaacgg	5160
caaagccccg ctgcaattgg ggaattgtaa cgtggccgga tggatactgg ggaaccccga	5220
gtgcgacctt ctctgaccg ccaacagttg gtccctacatc attgagacga gcaacagcaa	5280
gaatggcgcc tgctatcctg gggagtctgc tgactacgag gagctgcgcg agcagttgtc	5340
tacagtcagc agcttcgaaa gattcgagat cttcccaaag gccactagct ggcccaacca	5400

cgatactacc aagggcacta cagtgagttg cagccacagc ggtgcccaata gcttctaccg 5460
 caacctgctg tggatcgtga agaagggtaa cagctacccc aagctgagca aatcttacac 5520
 aaacaacaaa ggcaaagagg tgttggttat ctggggcgctg catcatcccc caaccgactc 5580
 cgatcagcaa accctgtacc agaacaacca cacctacgtg agcgtcggta gctctaagta 5640
 ttaccagcgc ttcacccccg aaatcgtcgc acgaccgaag gtgagagggc aggccgggag 5700
 aatgaactac tactggaccc tgctggatca aggcgacact attaccttcg aggctaccgg 5760
 caacttgatc gccccgtggc acgcgttcgc cctcaataaa ggatctaata gcggcataat 5820
 gatgagtgat gccacgtgc ataactgcac cacgaagtgc cagaccctc acggcgact 5880
 gaaaagcaat ctgccctttc agaatgtgca ccccatcacc atcggcgagt gcccgaagta 5940
 tgttaaaagc actcagctcc gcatggccac cggactgcgc aacatcccga gcatccaatc 6000
 ccgcggactg ttcggcgcaa tcgcgggctt tatagagggc ggctggaccg gcatgatcga 6060
 cggctggtac ggctaccacc atcaaaatga gcaaggttcc ggctacgccg cagaccagaa 6120
 gagcacccaa atagcaatcg atggcatctc caacaaggctg aacagcgtga tcgaaaagat 6180
 gaacatccag ttcacaagcg tggggaagga gttcaataac ctggaaaagc gcatcgagaa 6240
 tctgaacaag aaggttgacg atgggttcct cgatgtctgg acctataacg ccgagctcct 6300
 gatactgctt gagaacgagc gcaccctgga cttccacgac ttcaacgtga aaaacctgta 6360
 cgaaaaggctc aagtcacagt tgcgaaacaa tgcgaaggag ataggcaacg gctgcttcga 6420
 gttctatcac aagtgtgaca acgagtgcac ggagagcgtc aagaacggca cttacaacta 6480
 cccgcgctac tctgaggaga gtaagctcaa ccgcgaagag attgacggcg tgaaactgga 6540
 aagcgttggt gtccatcaga tcctggccat ctacagcacc gtggctagct ctctggttct 6600
 gttggtgagc ctgggcgcta taagcttttg gatgtgttct aatgggagcc tgcagtgccg 6660
 catctgcatc tgaggtac 6678

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

<400> 26

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Cys Arg Ile Cys Ile
 565

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

<400> 27

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Ser Phe Phe Ser Lys Leu Asn Trp Leu Tyr Lys Ser Gly Asn Thr
 165 170 175

Tyr Pro Met Leu Asn Val Thr Met Pro Asn Ser Asp Asp Phe Asp Lys
 180 185 190

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

Asn Leu Tyr Val Gln Ala Ser Gly Lys Ile Ile Val Ser Thr Lys Arg
 210 215 220

Ser Gln Gln Thr Ile Ile Pro Asn Ile Gly Ser Arg Pro Trp Val Arg
 225 230 235 240

Gly Leu Ser Ser Arg Ile Ser Ile Tyr Trp Thr Ile Val Lys Pro Gly
 245 250 255

Asp Ile Leu Ile Ile Asn Ser Asn Gly Asn Leu Ile Ala Pro Arg Gly
 260 265 270

Tyr Phe Lys Met Gln Thr Gly Lys Ser Ser Val Met Arg Ser Asp Ala
 275 280 285

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

Pro Asn Asp Lys Pro Phe Gln Asn Val Asn Lys Ile Thr Tyr Gly Ala
 305 310 315 320

Cys Pro Lys Tyr Ile Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Gly Met
 325 330 335

Arg Asn Ile Pro Glu Arg Gln Thr Arg Gly Ile Phe Gly Ala Ile Ala
 340 345 350

Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly Met Val Asn Gly Trp Tyr Gly
 355 360 365

Phe Arg His Gln Asn Ser Glu Gly Ile Gly Gln Ala Ala Asp Leu Lys
 370 375 380

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Cys Asn Ile Cys Ile
 565

<210> 28

<211> 566

<212> PRT

<213> Virut cúm A

<400> 28

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

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

Val Asp Thr Ile Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn

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

				245						250						255
Ile	Thr	Phe	Glu	Ala	Thr	Gly	Asn	Leu	Ile	Ala	Pro	Trp	His	Ala	Phe	
			260					265					270			
Ala	Leu	Asn	Lys	Gly	Ser	Asn	Ser	Gly	Ile	Met	Met	Ser	Asp	Ala	His	
		275					280					285				
Val	His	Asn	Cys	Thr	Thr	Lys	Cys	Gln	Thr	Pro	His	Gly	Ala	Leu	Lys	
	290					295					300					
Ser	Asn	Leu	Pro	Phe	Gln	Asn	Val	His	Pro	Ile	Thr	Ile	Gly	Glu	Cys	
305					310					315					320	
Pro	Lys	Tyr	Val	Lys	Ser	Thr	Gln	Leu	Arg	Met	Ala	Thr	Gly	Leu	Arg	
				325					330					335		
Asn	Ile	Pro	Ser	Ile	Gln	Ser	Arg	Gly	Leu	Phe	Gly	Ala	Ile	Ala	Gly	
			340					345					350			
Phe	Ile	Glu	Gly	Gly	Trp	Thr	Gly	Met	Ile	Asp	Gly	Trp	Tyr	Gly	Tyr	
		355					360					365				
His	His	Gln	Asn	Glu	Gln	Gly	Ser	Gly	Tyr	Ala	Ala	Asp	Gln	Lys	Ser	
	370					375					380					
Thr	Gln	Ile	Ala	Ile	Asp	Gly	Ile	Ser	Asn	Lys	Val	Asn	Ser	Val	Ile	
385					390					395					400	
Glu	Lys	Met	Asn	Ile	Gln	Phe	Thr	Ser	Val	Gly	Lys	Glu	Phe	Asn	Asn	
			405						410					415		
Leu	Glu	Lys	Arg	Ile	Glu	Asn	Leu	Asn	Lys	Lys	Val	Asp	Asp	Gly	Phe	
			420					425					430			
Leu	Asp	Val	Trp	Thr	Tyr	Asn	Ala	Glu	Leu	Leu	Ile	Leu	Leu	Glu	Asn	
		435					440					445				
Glu	Arg	Thr	Leu	Asp	Phe	His	Asp	Phe	Asn	Val	Lys	Asn	Leu	Tyr	Glu	

450 455 460
 Lys Val Lys Ser Gln Leu Arg Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly
 465 470 475 480
 Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu Ser Val
 485 490 495
 Lys Asn Gly Thr Tyr Asn Tyr Pro Arg Tyr Ser Glu Glu Ser Lys Leu
 500 505 510
 Asn Arg Glu Glu Ile Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Val Gly Val His
 515 520 525
 Gln Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Leu
 530 535 540
 Val Ser Leu Gly Ala Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu
 545 550 555 560
 Gln Cys Arg Ile Cys Ile
 565
 <210> 29
 <211> 564
 <212> PRT
 <213> Virut cúm A
 <400> 29
 Met Lys Ala Lys Leu Leu Ile Leu Trp Cys Ala Leu Ser Ala Thr Asp
 1 5 10 15
 Ala Asp Thr Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr
 20 25 30
 Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn
 35 40 45
 Leu Leu Glu Asp Asn His Asn Gly Lys Leu Cys Lys Leu Lys Gly Val
 50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Ile Cys Ile

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

<220>
 <223> đoạn liên kết GS

<400> 30

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

Gly Gly Thr

<210> 31
 <211> 947
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự ADN tổng hợp của glycoprotein c (Gc) đã bị cắt cụt bao gồm các vị trí giới hạn để tạo dòng phụ

<400> 31
gcggccgcat gaaggcgatc ctggttggtg tgctgtacac ctttgccacc gccaacgccg 60
atacgctgat caactgcaag aacatccaga gcacccagct gacaatcgag cacctgagca 120
agtgcattggc cttctaccag aacaagacca gcagccccgt cgtgatcaac gagatcatct 180
ccgacgccag cgtggacgaa caggaactga ttaagtctct gaacctgaac tgcaacgtga 240
tcgaccggtt catcagcgag tccagcgtga tcgagacaca ggtgtactac gagtatatca 300
agagccagct gtgtccactg caagtgcacg atatcttcac catcaacagc gccagcaaca 360
tccagtggaa ggccctggcc cgcagcttta ccctgggctg gtgcaacacc aacccccaca 420
agcacatctg ccggtgcctg gaatccatgc agatgtgtac cagcaccaag accgaccacg 480
ccagagagat gagcatctac tacgacggcc accccgacag attcgagcac gacatgaaga 540
ttatcctgaa tatcatgcgg tacatcgtgc ccggcctggg cagagtgtctg ctggaccaga 600
tcaagcagac caaggactac caggccctga gacacatcca gggcaagctg agccccaagt 660
cccagagcaa cctgcagctg aagggtctcc tggaattcgt ggacttcac cctgggcccga 720
acgtgaccat tgagaaaacc cccagaccc tgaccaccct gagcctgatt catatgggag 780
gttccggagg tggaggttcc ggaggtggag gttccggagg tggcaccata ctggccatct 840
acagcacagt tgcgagcagc ctggtcctga tcgtgagcct ggggtgctata tcattctgga 900
tgtgcagcaa cggctctctc cagtgccgca tctgtatctg aggtacc 947

<210> 32
<211> 3060
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mảnh ADN được sử dụng để tái tổ hợp RED để tạo ra pRacH-SE-70-455-SBVGc,

<400> 32
tctagactcg agcgcaagcc ctacacgcgc taccctgtgt ttcaacgcgt caacctgcac 60
attgacgggg agtttctggt tcacaagatg ctagcggttca atgccgcat gcgcccacg 120
gccgaggagc tgctgtcata cccaatgttt gctcaacttt aggatgacta acctgtttct 180
gggaggagac agcgtgggag acggtgtata aagttggtct gctttcaagc cctgccactg 240

cgctacagtg ccaccaactg taaagcggta gtaagctgca gtggtcgact ggtggtagca	300
tatactacct tatTTatacg ctccgagctg tttttcagca tgctagcacc caacgccgag	360
cgagagtata taactcccat cattgcccac aagcttatgc cacttattag cgtccgctct	420
gccgtttgct tagtcataat atctaccgcc gttttacgcag cagacgctat ctgcgacaca	480
attggatttg cgataccgcg catgtggatg tgtattttta tgagatcaac ctccatgaag	540
cgtaactagg gggcctccca ctgaggcact accggcttag cagctgacta acacagtata	600
aaacgtgaga agaaatcagt ctcatgcgcc attagcgcta ggctagttag cgtggaggac	660
cggagcgcta ccgccagcag tttcatccgc ctgggttacgg gtttggttaac acctaccggt	720
gttttaccgc taccatagga tccgatccat gggcgggccgc atgaaggcga tcctggttgt	780
gctgctgtac acctttgcca ccgccaacgc cgatacgctg atcaactgca agaacatcca	840
gagcaccag ctgacaatcg agcacctgag caagtgcag gccttctacc agaacaagac	900
cagcagcccc gtcgtgatca acgagatcat ctccgacgcc agcgtggacg aacaggaact	960
gattaagtct ctgaacctga actgcaacgt gatcgaccgg ttcacacagc agtccagcgt	1020
gatcgagaca caggtgtact acgagtatat caagagccag ctgtgtccac tgcaagtgca	1080
cgatatcttc accatcaaca gcgccagcaa catccagtgg aaggccctgg cccgcagctt	1140
taccctgggc gtgtgcaaca ccaaccccca caagcacatc tgccggtgcc tggaatccat	1200
gcagatgtgt accagcacca agaccgacca cgccagagag atgagcatct actacgacgg	1260
ccaccccgac agattcgagc acgacatgaa gattatcctg aatatcatgc ggtacatcgt	1320
gcccggcctg ggcagagtgc tgctggacca gatcaagcag accaaggact accaggccct	1380
gagacacatc cagggcaagc tgagcccca gtcccagagc aacctgcagc tgaagggtt	1440
cctggaattc gtggacttca tcctggggcg caacgtgacc attgagaaaa cccccagac	1500
cctgaccacc ctgagcctga ttcatatggg aggttccgga ggtggaggtt ccggaggtgg	1560
aggttccgga ggtggcacca tactggccat ttacagcaca gttgagcagc gcctggtcct	1620
gatcgtgagc ctgggtgcta tatcattctg gatgtgcagc aacggctctc tccagtgccg	1680
catctgtatc tgaggtagca ataaacgcgg tatgtctacc ttcaagccta tgatgaacgg	1740
atgtttggtg tttgcggcta ttataacgt cttgagtttt atgctatctc tgggaacatg	1800

cgaaaattac aggcgtgtgg ttcgggatcc tagggataac agggtaatcg atttattcaa	1860
caaagccacg ttgtgtctca aaatctctga tgttacattg cacaagataa aaatatatca	1920
tcatgaacaa taaaactgtc tgcttacata aacagtaata caaggggtgt tatgagccat	1980
attcaacggg aaacgtcttg ctcgaggccg cgattaaatt ccaacatgga tgctgattta	2040
tatgggtata aatgggctcg cgataatgtc gggcaatcag gtgcgacaat ctatcgattg	2100
tatgggaagc ccgatgcgcc agagttgttt ctgaaacatg gcaaaggtag cgttgccaat	2160
gatgttacag atgagatggt cagactaaac tggctgacgg aatttatgcc tcttccgacc	2220
atcaagcatt ttatccgtac tcctgatgat gcatggttac tcaccactgc gatccccggg	2280
aaaacagcat tccaggtatt agaagaatat cctgattcag gtgaaaatat tgttgatgcg	2340
ctggcagtgt tcctgcgccg gttgcattcg attcctgttt gtaattgtcc ttttaacagc	2400
gatcgcgatat ttcgtctcgc tcaggcgcaa tcacgaatga ataacggttt ggttgatgcg	2460
agtgatthttg atgacgagcg taatggctgg cctggtgaac aagtctggaa agaaatgcat	2520
aagctthttgc cattctcacc ggattcagtc gtcactcatg gtgattttctc acttgataac	2580
cttathttttg acgaggggaa attaataagg tgtattgatg ttggacgagt cggaatcgca	2640
gaccgatacc aggatcttgc catcctatgg aactgcctcg gtgagthttc tccttcatta	2700
cagaaacggc tttttcaaaa atatggtatt gataatcctg atatgaataa attgcagtht	2760
catttgatgc tcgatgagtt tttctaaaat aaacgcggta tgtctacctt caagcctatg	2820
atgaacggat gtttggtggt tgcggctatt ataacgctct tgagthttat gctatctctg	2880
ggaacatgcg aaaattacag gcgtgtggtt cgggatccga ccctgttggt ggggtgcggtt	2940
ggactcagaa tcttggcgca ggcatggaag tttgtcgggt acgaaacata cgacaccatc	3000
cgcgcagaag caaagaattt agagaccac gtaccctcaa gtgctgcaga gtcgtctaga	3060

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

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 33 cgtgcgcgga tacatcg	17
<210> 34 <211> 16 <212> ADN <213> Trình tự nhân tạo	
<220> <223> đoạn mồi	
<400> 34 cgcttcgcag gtgggc	16
<210> 35 <211> 19 <212> ADN <213> Trình tự nhân tạo	
<220> <223> đoạn mồi	
<400> 35 gactggtggt agcatatac	19
<210> 36 <211> 19 <212> ADN <213> Trình tự nhân tạo	
<220> <223> đoạn mồi	
<400> 36 gatcaacgag atcatctcc	19
<210> 37 <211> 17 <212> ADN <213> Trình tự nhân tạo	
<220> <223> đoạn mồi	
<400> 37 ctggagagag ccgttgc	17