



(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)



1-0037190

(51)⁷ C12N 15/86; A61K 39/145; A61K
39/00; A61K 39/12

(13) B

(21) 1-2019-01828

(22) 18/09/2017

(86) PCT/EP2017/073438 18/09/2017

(87) WO2018/054822 29/03/2018

(30) 16189767.3 20/09/2016 EP

(45) 25/10/2023 427

(43) 25/06/2019 375A

(73) BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH (DE)

Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim Am Rhein, Germany

(72) GALLEI, Andreas (DE); MUNDT, Alice (DE); NIKOLIN, Veljko (YU).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) VECTƠ EQUID ALPHAHERPESVIRUS 1 RACH (EHV-1 RACH), CHẾ PHẨM SINH MIỄN DỊCH VÀ VACXIN ĐỂ PHÂN BIỆT ĐỘNG VẬT BỊ NHIỄM VỚI ĐỘNG VẬT ĐƯỢC CHỦNG NGỪA (DIVA) CHỨA VECTƠ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến vectơ virus herpes của ngựa (EHV) chứa ít nhất một (ít nhất là hai) trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh liên quan đến tác nhân gây bệnh lây nhiễm cho động vật sản xuất thực phẩm, trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh này được gắn chèn vào trong vị trí gắn chèn (tốt hơn là ORF70) và trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh này được liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự khởi đầu (tốt hơn là trình tự khởi đầu chứa 4pgG600 (SEQ ID NO:1) hoặc 4pMCP600 (SEQ ID NO:2) hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó hoặc mảnh chức năng hoặc dẫn xuất chức năng của nó hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó). Ngoài ra, sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch và vacxin để phân biệt động vật bị nhiễm với động vật được chủng ngừa (DIVA) chứa vectơ EHV này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực vaccin (vector), và cụ thể là các vị trí gắn chèn và vùng khởi đầu thích hợp để biểu hiện các kháng nguyên đích từ vaccin vector này. Ngoài ra, sáng chế đề cập đến vaccin virus cúm A ở lợn.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Hệ thống vector EHV

Tác nhân gây bệnh cho ngựa Equid Alphaherpesvirus 1 (virus gây sẩy thai ở ngựa, EHV-1) thuộc giống *Varicellovirus* trong phân họ *Alphaherpesvirinae* thuộc họ *Herpesviridae* trong bộ *Herpesvirales*. Nó là virus lớn, có vỏ với hệ gen ADN mạch kép khoảng 150.000 cặp bazơ. Các thành viên quan trọng khác của phân chi *Varicellovirus* là Human Herpesvirus 3 (virus Varicella Zoster), Suid Herpesvirus 1 (virus gây bệnh giả dại), Bovine Herpesvirus 1 (virus gây bệnh viêm phế quản truyền nhiễm - Infectious Bronchitis Virus), và Equid Herpes Virus 4 (Equine Rhinopneumonitis 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 mang tính địa phương và ảnh hưởng đến ngựa trên khắp 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 sẩy 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 Rhinomune[®] (Boehringer Ingelheim) và Prevaccinol[®] (MSD). Cả hai vaccin này đều chứa chủng EHV-1 RacH đã được làm 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 ngựa, 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 virus herpes ở ngựa 1 (Equid Herpes Virus 1 - EHV-1) RacH (pRacH-SE) đã được biết là nền tảng cho sự phát triển vaccin vectơ. Đã thấy rằng các vaccin vectơ trên cơ sở EHV-1 RacH 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 EHV-1 RacH tái tổ hợp. Hệ gen EHV-1-RacH 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 gắn chèn 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 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 BAC-vectơ và khôi phục hệ gen EHV-1-RacH 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 gắn chèn các cat-xet biểu hiện gen chuyển, virus được tổ chức lại sau quá trình chuyển nhiễm trong các tế bào cho phép sẽ mang sự biến đổi này và sẽ biểu hiện gen bổ sung. EHV-1-RacH tái tổ hợp có thể được sử dụng làm vaccin vectơ.

Vùng khởi đầu của hệ thống vectơ EHV

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

Bằng cách sử dụng yếu tố tăng cường vùng khởi đầu gen sớm tức thời 1 của cytomegalovirus ở người (Boshart et al. 1985), gen chuyển được thông báo là được biểu hiện hiệu quả từ vị trí gắn chèn orf1/3. Trong các nghiên cứu này, tín hiệu polyadenyl hóa hormon tăng trưởng bò (BGH) được sử dụng để làm ổn định các sản phẩm phiên mã nhằm 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. Trong khi yếu tố tăng cường vùng khởi đầu IE HCMV và MCMV (Mouse cytomegalovirus) đặc hiệu khác 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 vùng khởi đầu cho vacxin 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 vacxin.

Vị trí gắn chèn của hệ thống vector EHV

Các chủng EHV-1 kiểu đại 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.1a). Orf1 và orf3 được sắp xếp tuần tự trên một mạch của ADN trong khi orf 2 được mã hóa bởi mạch bổ sung. Chủng vacxin RacH có sự mất đoạn 1283 bp trong đó vùng ảnh hưởng đến orfs 1 và 2 chỉ ra rằng các gen này không thiết yếu cho sự sao chép của virus. Vì lý do này, vị trí này dùng làm vị trí gắn chèn gen chuyển. Vị trí gắn chèn này được gọi là ORF1/3.

Tuy nhiên, kích thước và số lượng của gen chuyển có thể được gắn chèn vào trong vị trí gắn chèn ORF1/3 thường bị giới hạn. Vì thế, để tăng cường khả năng của vector EHV-1, có nhu cầu chưa được đáp ứng đối với các cách mới và thay thế để gắn chèn và biểu hiện gen chuyển từ vector EHV-1, đặc biệt là vector EHV-1 RacH tái tổ hợp.

Virus cúm A ở lợn (Swine Influenza A Virus - SIAV)

Cúm lợn là bệnh virus đường hô hấp cấp tính gây ra bởi virus cúm A (IAV) thuộc họ Orthomyxovirus mà làm giảm sức khỏe và sự khỏe mạnh của lợn. Các dấu hiệu lâm sàng của bệnh cúm ở lợn có thể biểu hiện một loạt các mức độ nghiêm trọng, nhưng thường xảy ra dưới dạng bệnh hô hấp nhẹ với tỷ lệ mắc bệnh cao và phục hồi nhanh chóng, với các trường hợp tử vong hiếm gặp. Tuy nhiên, bệnh này gây ra gánh nặng kinh tế đáng kể vì nó dẫn đến sút cân, giảm tăng cân và trong một số trường hợp, mất khả năng sinh sản ở lợn nái do sốt cao. SIAV là một trong các tác nhân gây bệnh đường hô hấp quan trọng nhất cho đàn lợn và tỷ lệ mắc cao của nó trong đàn lợn trên toàn thế giới liên quan trực tiếp đến

tác động kinh tế của bệnh. Ở châu Âu hiện có bốn phân typ virus cúm A chính xuất hiện ở lợn nuôi và gây thiệt hại kinh tế (Brown, 2000). Các virus cúm H1N1 (phân typ “gia cầm”) và H3N2 lợn đã xuất hiện ở các nước sản xuất lợn lớn từ những năm 1980. Virus H1N2 đã du nhập vào lợn châu Âu khoảng hai mươi năm trước (Brown et al., 1995) và phân typ “đại dịch” H1N1 (H1pdmN1) đã du nhập vào quần thể lợn bằng cách truyền từ người sang lợn trong quá trình đại dịch cúm H1N1 ở người năm 2009 và tiếp tục lan rộng ra khắp thế giới trong các quần thể lợn với tỷ lệ mắc trung bình ở châu Âu ước lượng là 8% trong số tất cả các trường hợp nhiễm virus cúm lợn (Watson et al., 2015). Ngoài ra, cúm lợn cũng có mối liên quan đến sức khỏe con người do IVA rất nổi tiếng vì tiềm năng truyền bệnh từ động vật sang người (Thacker&Janke 2008).

Bốn chủng cúm A phổ biến nhất ở châu Âu là các các phân typ H1N2, H3N2 và H1N1 (H1N1 gia cầm và đại dịch H1N1). Vì thế, cần có vaccin hiệu lực cao kháng phân typ H1N2, H3N2 và H1N1 (H1N1 gia cầm và đại dịch H1N1) và vì thế, tạo ra sự bảo vệ rộng kháng các chủng thực địa IAV lợn.

Ngoài ra, thuận lợi khi có vaccin đa giá vì vaccin đa giá nói chung có hiệu quả hơn về mặt chi phí và hiệu quả về thời gian hơn so với vaccin đơn giá.

Tuy nhiên, nói chung hiệu lực vaccin có thể bị ảnh hưởng bởi các hiệu ứng nhiễu như sự can thiệp của virus của các chủng vaccin khác nhau và/hoặc tác dụng diệt virus của một trong các thành phần vaccin. Vì thế, vẫn cần có vaccin tổ hợp IAV lợn mà có hiệu lực cao và không bị ảnh hưởng bởi sự can thiệp nêu trên.

Hơn nữa, phạm vi bao phủ rộng rãi và đa dạng của các chủng lợn IAV lưu hành cũng có thể ngăn chặn một cách hiệu quả sự tăng cường liên quan đến vaccin của bệnh hô hấp (VAERD) sau khi nhiễm virus thực địa của động vật được chủng ngừa mà có thể quan sát được nếu các chủng vaccin/kháng nguyên và virus thực địa chỉ liên quan lỏng lẻo với nhau (Rajao et al. 2016).

Vaccin trên cơ sở vectơ EHV như được mô tả trong bản mô tả này không phải là vaccin sống được cải biến (MLV) tạo sự an toàn tối đa đối với IAV lợn vì không có IAV sống được tạo ra hoặc đưa vào động vật, do đó ngăn chặn khả năng khôi phục độc lực của chủng vaccin và tái tổ hợp di truyền hoặc tái sắp xếp với các chủng thực địa từ lợn hoặc người. Ngoài ra, trái ngược với vaccin chết (tiêu chuẩn hiện nay), vaccin vectơ được kỳ

vọng không chỉ cảm ứng kháng thể trung hòa IAV lợn mà còn kích thích mạnh mẽ tính miễn dịch tế bào kháng IAV lợn bằng cả hai con đường MHC nhóm I và II. Vì vậy, vẫn có nhu cầu đối với các vaccin SIAV trên cơ sở vectơ.

Hơn nữa, cả vaccin sống được cải biến và vaccin bất hoạt đều thiếu tính năng vốn có để phân biệt chẩn đoán động vật bị nhiễm với động vật đã chủng ngừa (Differentiating Infected from Vaccinated Animals - DIVA). Vì thế, vẫn có nhu cầu đối với các vaccin SIAV DIVA. DIVA có thể đạt được bằng cách phát hiện kháng thể kháng protein IAV lợn như NP (nucleoprotein) hoặc NA (neuraminidaza) ở động vật đã bị nhiễm chủng thực địa IAV lợn. Ngược lại, động vật chỉ được chủng ngừa bằng vaccin như được mô tả trong bản mô tả này (và không bị nhiễm virus kiểu đại hoặc MLV và không được chủng ngừa bằng vaccin bất hoạt) chỉ biểu hiện (các) protein HA của IAV lợn và trong các động vật được chủng ngừa này các protein như NP hoặc NA và vì thế, cả kháng thể kháng NP hoặc NA, không thể phát hiện được.

Vaccin bất hoạt (chết) có thể được áp dụng cho lợn nái mẹ trước khi đẻ để tạo sự bảo vệ cho lợn con kháng IAV lợn bằng tính miễn dịch có nguồn gốc từ mẹ (vaccin từ lợn nái). Ngoài ra, vaccin bất hoạt có thể được dùng trực tiếp cho lợn con (vaccin cho lợn con). Tuy nhiên, khi được dùng dưới dạng vaccin cho lợn con, vaccin bất hoạt không thể vượt qua được tính miễn dịch có nguồn gốc từ mẹ kháng IAV lợn ở lợn con non. Vì thế, việc chủng ngừa IAV lợn ở lợn con bằng cách sử dụng vaccin bất hoạt được dùng ở các thời điểm bắt đầu từ khoảng 8 tuần tuổi và cảm ứng sự khởi phát tính miễn dịch từ khoảng 12 tuần tuổi hoặc muộn hơn, vì thế tạo ra khoảng trống miễn dịch mà tại đó lợn con có thể không còn được bảo vệ bởi tính miễn dịch có nguồn gốc từ mẹ kháng IAV lợn và bảo vệ kháng IAV lợn từ việc chủng ngừa cho lợn con vẫn chưa đạt được, vì thế khiến cho động vật này dễ bị nhiễm IAV lợn trong khoảng thời gian này. Không giống như đối với vaccin chết, vaccin được mô tả trong bản mô tả này cho phép chủng ngừa cho lợn con với mức kháng thể kháng IAV lợn có nguồn gốc từ mẹ và vẫn cung cấp sự bảo vệ kháng nhiễm IAV lợn sau đó. Vì thế, vẫn cần có vaccin IAV lợn có hiệu lực cao và có thể được dùng trong giai đoạn sớm ngay cả khi vẫn còn kháng thể có nguồn gốc từ mẹ.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Để tránh các trở ngại bất kỳ, sáng chế đề xuất các vị trí gắn chèn, các trình tự khởi đầu và vacxin SIAV.

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 các khía cạnh khác nhau của nó, sáng chế được thực hiện căn cứ vào phần yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Để tăng cường khả năng của vector EHV, sáng chế đề xuất các cách thức mới và thay thế để gắn chèn và biểu hiện gen chuyển từ khung vector EHV.

Sáng chế đề cập đến vector EHV có các vị trí gắn chèn trong ORF70 như được định nghĩa trong bản mô tả này.

Sáng chế đề xuất vector EHV chứa

- (i) ít nhất một trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh liên quan đến tác nhân gây bệnh lây nhiễm cho động vật sản xuất thực phẩm,
- (ii) trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh này được gắn chèn vào trong ORF70,
- (iii) trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh này được liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự khởi đầu.

Sáng chế đề cập đến vị trí gắn chèn, thay thế ORF70 có thể được sử dụng để gắn chèn trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh và biểu hiện protein từ vector EHV, cụ thể là EHV-1 RacH tái tổ hợp.

“Vị trí gắn chèn ORF70” trong vector EHV-1 được đặc trưng bởi việc xóa, cắt, thay thế, cải biến một phần hoặc tương tự liên quan đến ORF70. Việc xóa ORF70 hoàn chỉnh sẽ được coi là bất lợi cho sự sao chép của virus và vì thế việc sản xuất và hiệu quả vacxin việc xóa bỏ hoàn toàn ORF70 có thể ảnh hưởng đến trình tự khởi đầu của ORF71 mã hóa cho gpII. Vị trí gắn chèn ORF70 và/hoặc việc việc gắn chèn (của cat-xet biểu hiện) vào trong ORF70 được định nghĩa về mặt chức năng sao cho ORF71 vẫn giữ được chức năng hoặc nguyên vẹn.

Theo một khía cạnh cụ thể, vị trí gắn chèn ORF70 bao gồm việc xóa một phần khoảng 801bp trong ORF70 đối với RacH (SEQ ID NO.: 20) hoặc 70%, 80%, 85%, 90%,

95%, 99% trình tự tương đồng của nó. Phần bị xóa trong trình tự hệ gen RacH được thể hiện là SEQ ID NO.: 20 (không có số nucleotit vì trình tự bộ gen RacH hoàn chỉnh không được biết). Theo một khía cạnh cụ thể khác, vị trí gắn chèn ORF70 bao gồm việc xóa 801bp theo lý thuyết trong ORF70 đối với chủng EHV-1 kiểu đại ab4 (mã số truy cập Genbank AY665713.1). Phần bị xóa nằm trong trình tự hệ gen ab4 kiểu đại (mã số truy cập Genbank AY665713.1) từ nucleotit 127681 đến 128482 (SEQ ID NO.: 19).

Trong sáng chế “vùng chặn” để chỉ việc tái tổ hợp của cat-xet biểu hiện chứa trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh vào trong hệ gen EHV-1. Các vùng chặn này có mặt theo cách tự nhiên trong EHV-1. Vùng chặn Up70 (417 bp, SEQ ID NO.: 13) và vùng chặn Up71 (431 bp, SEQ ID NO.: 14) được chọn để tái tổ hợp tương đồng cổ điển đối với tất cả các vectơ/plasmit được sử dụng cho vị trí orf70. Trong chủng EHV-1 kiểu đại ab4 (mã số truy cập Genbank AY665713.1) các trình tự tương ứng được nằm ở các nucleotit 127264 – 127680 (vùng chặn up orf70, SEQ ID NO.: 15) và 128483 – 128913 (vùng chặn up orf71, SEQ ID NO.: 16). Đối với việc tái tổ hợp RED, vùng chặn bị cắt do việc phân cắt giới hạn XbaI. Các vùng chặn bị cắt này giống với 3’ 283 bp của vùng chặn “cổ điển” 417 bp (vùng chặn Up70, SEQ ID NO.: 13) và 5’ 144 bp của vùng chặn “cổ điển” 431 bp (vùng chặn Up71, SEQ ID NO.: 14), mà được mô tả ở trên. Các vùng chặn bị cắt này được đặt tên là vùng chặn Up70 (283 bp), bao gồm SEQ ID NO.: 17 và vùng chặn Up71 (144 bp) bao gồm SEQ ID NO.: 18. Các vùng chặn khác nhau này xác định vị trí gắn chèn ORF70 giống nhau. Các vùng chặn luôn được sử dụng theo cặp một vùng chặn “trái” như các SEQ ID NO.: 13, 15, 17 và một vùng chặn “phải” như các SEQ ID NO.: 14, 16, 18.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất trình tự axit nucleic điều hòa/trình tự khởi đầu 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.

Vì thế, sáng chế đề xuất vectơ EHV chứa

- (i) ít nhất một trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh liên quan đến tác nhân gây bệnh lây nhiễm cho động vật sản xuất thực phẩm,
- (ii) trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh này được gắn chèn vào trong vị trí gắn chèn,

(iii) trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh này được liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự khởi đầu chứa 4pgG600 (SEQ ID NO:1) hoặc 4pMCP600 (SEQ ID NO:2) hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó hoặc mảnh chức năng hoặc dẫn xuất chức năng của nó hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó.

Vì thế, sáng chế đề cập đến vector EHV có hai trình tự khởi đầu mới: 4pgG600 và 4pMCP600, và các dẫn xuất của chiều dài ngắn hơn của nó, mà được thể hiện là có chức năng sau khi chuyển nhiễm tạm thời trong nuôi cấy tế bào hoặc trong cơ sở của việc sao chép rEHV1-RacH trong nuôi cấy tế bào. Các vùng khởi đầu mới p430 và p455 đã thể hiện là có chức năng trong cơ sở của việc sao chép rEHV1-RacH trong nuôi cấy tế bào, và cả ở trên động vật (lợn và chuột nhắt). Mức hoạt tính của hai vùng 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 vùng khởi đầu in vitro.

Các đặc điểm này cho phép tạo ra vacxin 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 mục tiêu vacxin gồm có hai ứng dụng tác nhân gây bệnh khác nhau của hai vùng khởi đầu mới này trong hai vị trí gắn chèn 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 còn đề cập đến vector EHV-1 biểu hiện hai gen chuyển khác nhau từ một khung vector mà không ghép hai gen chuyển bằng các chức năng có nguồn gốc từ virus ARN (peptit 2a, các vị trí IRES) dưới sự kiểm soát của một vùng khởi đầu.

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến vector EHV chứa

- (i) ít nhất hai trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh liên quan đến tác nhân gây bệnh lây nhiễm cho động vật sản xuất thực phẩm,
- (ii) trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh này được gắn chèn vào trong các vị trí gắn chèn,
- (iii) trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh này được liên kết theo kiểu hoạt động được với các trình tự khởi đầu.

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch và vaccin DIVA chứa vector EHV này như được mô tả ở trên.

Các đặc điểm này cho phép tạo ra vaccin vector tái tổ hợp dựa trên việc EHV-1 RaCH biểu hiện các kháng nguyên khác nhau theo cách song song với hiệu quả tương tự. Nếu đích vaccin gồm có hai ứng dụng tác nhân gây bệnh khác nhau của hai vùng khởi đầu mới này trong hai vị trí gắn chen 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.

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến vaccin SIAV. Sáng chế còn đề cập đến các trình tự hemagglutinin đặc trưng như SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28 và SEQ ID NO:29 và các trình tự tương đồng của nó. Ngoài ra, sáng chế đề cập đến vaccin SIAV hóa trị một và đa trị an toàn và hiệu quả cao.

Ngoài ra, vaccin SIAV trên cơ sở vector theo sáng chế có thể được sử dụng cho các động vật sản xuất thực phẩm khác nhau bị nhiễm virus cúm lợn A từ động vật sản xuất thực phẩm được chủng ngừa bằng chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA như được mô tả trong bản mô tả này.

Hơn nữa, sáng chế đề cập đến việc sử dụng chế phẩm sinh miễn dịch và vaccin DIVA chứa vector EHV như được mô tả trong bản mô tả này. Sáng chế đề cập đến phương pháp gây miễn dịch cho động vật sản xuất thực phẩm, điều trị hoặc điều trị dự phòng các dấu hiệu lâm sàng gây ra bởi IAV lợn ở động vật sản xuất thực phẩm, phương pháp làm giảm nồng độ virus chuẩn trong phổi của động vật sản xuất thực phẩm và phương pháp chủng ngừa cho động vật sản xuất thực phẩm có nhu cầu có kháng thể kháng virus cúm lợn A.

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

Fig. 1B: Hình minh họa vị trí gắn chèn 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. Bản đồ plasmit và trình tự nucleotit của plasmit chuyển pU-mC70-BGH

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

Đồ thị trên 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 vùng 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 và trình tự nucleotit của vector chuyển pU70-p455-71K71

Fig. 6. Bản đồ plasmit và trình tự nucleotit của plasmit chuyển pU70-p455-H3-71K71 để gắn chèn cat-xet biểu hiện p455-H3-71 vào trong orf70 của EHV-1 RacH.

H3 = khung đọc mở mã hóa cho hemagglutinin H3 của virus cúm A

71pA = trình tự polyA mới như được mô tả trong sáng chế EM P2016-022

I-SceI = vị trí phân cắt đối với endonucleaza giới hạn I-SceI

đoạn khởi đầu aph = đoạn khởi đầu gen kháng kanamycin sinh vật nhân sơ

Kana = gen kháng kanamycin

ORF70 đầu 3' = vùng tái tổ hợp xuôi chiều của vị trí gắn chèn

ORI = điểm khởi đầu sao chép của plasmit

AP_r = gen kháng ampicilin của plasmit

orf70 ngược chiều = vùng tái tổ hợp ngược chiều của vị trí gắn chèn

p455 = vùng khởi đầu mới p455

bp = cặp bazơ

Fig. 7. Sơ đồ minh họa hệ gen của rEHV-1 RacH-SE-70-p455-H3 với vùng gắn chèn orf70 được phóng đại.

orf69: số khung đọc mở 69 ngược chiều vị trí gắn chèn trong orf70; p455: đoạn khởi đầu mới được mô tả trong bản mô tả này, xem ví dụ ví dụ 1; H3: hemagglutinin virus cúm gen chuyển; 71pA: trình tự polyadenyl hóa mới; Δorf70: phần còn lại của orf70 chứa đoạn khởi đầu đối với orf71, mã hóa glycoprotein II virus cấu trúc (gpII).

Fig. 8. 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 trong không khí. Bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng có bán trên thị trường kháng H3 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 hiển vi huỳnh quang.

Fig. 9. Thẩm tách Western:

Thẩm tách Western đối với tế bào bị nhiễm các lần 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 bản sao bên phải được ủ với huyết thanh tăng miễn dịch của thỏ có bán trên thị trường kháng hemagglutinin H3 cúm A (PA5-34930). 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.

Fig. 10: Nồng độ virus chuẩn:

Nồng độ virus chuẩn trong phổi trung bình của các nhóm vào một và ba ngày sau thử thách đối với các động vật riêng rẽ (a) hoặc đối với trung bình nhóm (b). Nồng độ chuẩn được cho là liều gây nhiễm nuôi cấy mô 50 của IAV lợn cho mỗi g chất đồng nhất phổi, tương ứng. Nồng độ chuẩn được xác định là giá trị trung bình của các giá trị được xác định đối với các phổi trái và phải ở mỗi động vật, và nghiên cứu chất đồng nhất mỗi phổi mà thu được từ nhóm ba mẫu phổi tương ứng. Nhóm đối chứng âm (neg. ctrl.), Nhóm đối chứng lây nhiễm (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 vacxin IAV lợn bất hoạt có bán trên thị trường (2x Inact.).

Fig. 11. Bản đồ plasmit và trình tự nucleotit của vectơ chuyển pU-1-3-p430-BGHKBGH

Fig. 12. Bản đồ plasmit và trình tự nucleotit của plasmit chuyển pU1/3-p430-H1av-BGH_K_BGH để gắn chèn cat-xet biểu hiện p430-H1av-BGH vào trong orf1/3 của EHV-1 RacH.

H1av = khung đọc mở mã hóa cho hemagglutinin H1 của virus cúm A

BGHpA = trình tự polyA hormon sinh trưởng bò

trình tự khởi đầu aph = vùng khởi đầu gen kháng kanamycin sinh vật nhân sơ

Kana = gen kháng kanamycin

Flank B = vùng tái tổ hợp xuôi chiều của vị trí gắn chèn

Flank A = vùng tái tổ hợp ngược chiều của vị trí gắn chèn

p430 = trình tự khởi đầu mới p430

bp = cặp bazơ

Fig. 13: Sơ đồ minh họa hệ gen của rEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1av với vùng gắn chèn orf1/3 được phóng đại.

Δ orf1: Phần còn lại của khung đọc mở 1 ngược chiều của vị trí gắn chèn; p430: trình tự khởi đầu mới được mô tả trong bản mô tả này, xem ví dụ 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 của vị trí gắn chèn.

Fig. 14. 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. 15. 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 gắn chèn được phóng đại.

Δ orf1: Phần còn lại của khung đọc mở 1 ngược chiều của vị trí gắn chèn; p430: trình tự khởi đầu mới; H1av: hemagglutinin virus cúm gen chuyển; BGHPA: trình tự polyadenyl hóa hormon tăng trưởng bò; orf3: khung đọc mở 3 xuôi chiều của vị trí gắn chèn.

orf69: khung đọc mở 69 ngược chiều của vị trí gắn chèn trong orf70; p455: trình tự khởi đầu mới; H3: hemagglutinin virus cúm gen chuyển; 71pA: trình tự polyadenyl hóa mới; Δ orf70: phần còn lại của orf70 chứa vùng khởi đầu đối với orf71, mã hóa glycoprotein II virus cấu trúc (gpII).

Fig. 16. Thẩm tách Western: Thẩm tách Western của tế bào bị nhiễm rEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1av-70-p455-H3 (B), vectơ trống rEHV-1 RacH-SE (SE), hoặc được gây nhiễm giả (ctrl). Các mẫu thẩm tách bản sao được ủ với huyết thanh tăng miễn dịch của thỏ thương mại kháng H3 (H3), huyết thanh tăng miễn dịch của thỏ thương mại (PA 34929) kháng H1 (H1), hoặc kháng thể đơn dòng Ai2G7 kháng EHV-1 gpII (gpII).

Fig. 17. Thân nhiệt trung bình của các nhóm trước và lúc 1, 2, và 3 ngày sau khi thử thách. Khoảng sai số, Sai số chuẩn. Từ trái sang phải mỗi ngày thử nghiệm: nhóm đối chứng âm (neg. ctrl.), Nhóm đối chứng lây nhiễm (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 bất hoạt (2x chết).

Fig. 18. Điểm số trung bình của phổi của các nhóm một và ba ngày sau khi thử thách. Khoảng sai số, Sai số chuẩn. Nhóm đối chứng âm (neg. ctrl.), Nhóm đối chứng lây nhiễm (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 bất hoạt (2x chết).

Fig. 19. Độ chuẩn trung hòa huyết thanh nghịch đảo (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 lây nhiễm (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 bất hoạt (2x chết).

Fig. 20. 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 (Neg. Ctr.), Nhóm đối chứng lây nhiễm (Chall. Ctr.), 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 bất hoạt (2x chết).

Fig. 21. 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 vaccin 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 động vật đối với thời điểm cho trước và sau khi kích thích lại bằng các kích thích cụ thể. Để kích thích lại, IAV HA lợn được biểu hiện tái tổ hợp tương ứng với kháng nguyên vaccin 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), vaccin 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 được biểu hiện tái tổ hợp nucleoprotein IAV lợn (NP) được sử dụng.

Fig. 22. Bản đồ sơ lược của plasmit chuyển pU1/3-p430-H1hu-BGHKKBGH

Fig. 23: Bản đồ sơ lược của plasmit chuyển pU70-p455-H1pdm-71K71

Fig. 24: Hệ gen ADN mạch kép dạng thẳng của rEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1hu-70-p455-H1pdm (**rEHV-1 RacH-SE_D**) với vùng gắn chèn orf1/3 và orf70 được phóng đại

Fig. 25: Thẩm 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 thẩm tách bản sao được ủ với huyết thanh tăng miễn dịch đa dòng của thỏ kháng H3 (PA5-34930), huyết thanh tăng miễn dịch đa dòng của thỏ 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. 26: Đồ thị thể hiện khả năng trung hòa trung bình của huyết thanh chuột nhất kháng virus cúm A (A/swine/Italy/7680/2001(H3N2)) hoặc (A/swine/Gent/132/2005(H1N1)). Khả năng trung hòa được tính bằng cách nhân trị số pha loãng huyết thanh nghịch đảo với độ chuẩn tương ứng mà được trung hòa bởi nó. Sau đó lấy giá trị trung bình của ba thử nghiệm chia cho 100 để phản ánh giá trị trung hòa của 100 TCID₅₀. Khoảng sai số cho biết độ lệch chuẩn.

Fig. 27: 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 lây nhiễm; 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 cho biết giá trị trung bình thu được từ các động vật riêng lẻ. Đường nằm ngang ở giữa tương ứng cho biết 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. 28: Độ chuẩn IAV lợn trong phổi được xác định là mô phổi TCID₅₀/g đối với các động vật bị giết ba ngày sau khi thử thách. neg. ctrl., nhóm đối chứng âm; chall. Ctrl.,

nhóm đối chứng âm lây nhiễm; 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 cho biết giá trị trung bình thu được từ các động vật riêng lẻ. Đường nằm ngang ở giữa tương ứng cho biết 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. 29: Độ chuẩn IAV lợn ở phổi được xác định là mô phổi TCID50/g đối với các động vật bị giết năm ngày sau khi thử thách. neg. ctrl., nhóm đối chứng âm; chall. ctrl., nhóm đối chứng âm lây nhiễm; 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 cho biết giá trị trung bình thu được từ các động vật riêng lẻ. Đường nằm ngang ở giữa tương ứng cho biết 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. 30: 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 vắc xin 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 xác định theo cặp, giá trị trung bình của mẫu được tính từ giá trị xác định theo cặp, và giá trị của nhóm được tính từ giá trị trung bình của mẫu tương ứng. chall. ctrl., Nhóm đối chứng lây nhiễm (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 cho biết độ lệch chuẩn. Ngày nghiên cứu (Study days - SD) được nêu trong chú giải ở bên phải của đồ thị.

Fig. 31: 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 xác định theo cặp, giá trị trung bình của mẫu được tính từ giá trị xác định theo cặp, và giá trị của nhóm được tính từ giá trị trung bình của mẫu tương ứng. chall. ctrl., Nhóm đối chứng lây nhiễm (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 cho biết độ lệch chuẩn. Ngày nghiên cứu (Study days - SD) được nêu trong chú giải ở bên phải của đồ thị.

Fig. 32: 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 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 giữa số lượng tác nhân gây bệnh và vật chủ bằng 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 vacxin 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 10^6 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 cho biết độ lệch chuẩn.

Fig. 33: 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 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 giữa số lượng tác nhân gây bệnh và vật chủ bằng 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 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 10^6 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 cho biết độ lệch chuẩn.

Fig. 34: Các kết quả từ thử nghiệm hấp thụ miễn dịch được liên kết enzym (ELISA) đặc hiệu globulin miễn dịch G (IgG) của lợn kháng nucleoprotein IAV lợn (NP) được biểu hiện tái tổ hợp. Với thử nghiệm này, mỗi lỗ được phủ bằng 100 ng NP được biểu hiện tái tổ hợp. Các mẫu được xác định theo cặp, giá trị trung bình của mẫu được tính từ giá trị xác định theo cặp, và giá trị của nhóm được tính từ giá trị trung bình của mẫu tương ứng. pos. ctrl., nhóm đối chứng dương; neg. ctrl., nhóm 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 cho biết độ lệch chuẩn. Ngày nghiên cứu (Study days - SD) được nêu trong chú giải ở bên phải của đồ thị.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế giải quyết được các vấn đề vốn có trước đây và tạo ra sự cải tiến rõ rệt trong lĩnh vực. Nói chung, sáng chế đề cập đến vectơ EHV chứa:

- (i) ít nhất một trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh liên quan đến tác nhân gây bệnh lây nhiễm cho động vật sản xuất thực phẩm,
- (ii) trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh này được gắn chèn vào trong ORF70,
- (iii) trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh này được liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự khởi đầu.

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch chứa vectơ EHV như được mô tả trong bản mô tả này và tùy ý chất mang được dùng.

Vì thế, sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch bao gồm vectơ EHV chứa

- (i) ít nhất một trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh liên quan đến tác nhân gây bệnh lây nhiễm cho động vật sản xuất thực phẩm,
- (ii) trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh này được gắn chèn vào trong ORF70,
- (iii) trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh này được liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự khởi đầu.

Thuận lợi là dữ liệu thử nghiệm mà sáng chế cung cấp bộc lộ vị trí gắn chèn mới trong vector EHV được tạo ra có thể được sử dụng để gắn chèn và biểu hiện kháng nguyên. Ngoài ra, việc cung cấp vị trí gắn chèn mới giờ đây cho phép gắn chèn và biểu hiện kháng nguyên từ các vị trí gắn chèn khác nhau và tương ứng là biểu hiện hơn một kháng nguyên. Ngoài ra, dữ liệu thử nghiệm cho thấy rằng vector EHV với các vị trí gắn chèn mới có thể được sử dụng để tạo ra chế phẩm sinh miễn dịch từ một hoặc hai vị trí và tạo ra vaccin DIVA, tương ứng.

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến vector EHV chứa:

- (i) ít nhất một trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh liên quan đến tác nhân gây bệnh lây nhiễm cho động vật sản xuất thực phẩm,
- (ii) trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh này được gắn chèn vào trong vị trí gắn chèn,
- (iii) trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh này được liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự khởi đầu chứa 4pgG600 (SEQ ID NO:1) hoặc 4pMCP600 (SEQ ID NO:2) hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó hoặc mảnh chức năng hoặc dẫn xuất chức năng của nó hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó.

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch chứa vector EHV như được mô tả trong bản mô tả này và tùy ý chất mang được dùng.

Vì thế, sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch bao gồm vector EHV chứa

- (i) ít nhất một trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh liên quan đến tác nhân gây bệnh lây nhiễm cho động vật sản xuất thực phẩm,
- (ii) trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh này được gắn chèn vào trong vị trí gắn chèn,

- (iii) trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh này được liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự khởi đầu chứa 4pgG600 (SEQ ID NO:1) hoặc 4pMCP600 (SEQ ID NO:2) hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó hoặc mảnh chức năng hoặc dẫn xuất chức năng của nó hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó.

Thuận lợi là dữ liệu thử nghiệm mà sáng chế cung cấp bộc lộ các trình tự khởi đầu mới được tạo ra mà có thể được sử dụng để biểu hiện kháng nguyên. Ngoài ra, việc tạo ra các trình tự khởi đầu mới cho phép biểu hiện các kháng nguyên từ các vị trí gắn chèn khác nhau của hệ thống vector như hệ thống vector EHV và biểu hiện nhiều hơn một kháng nguyên, tương ứng. Ngoài ra, dữ liệu thử nghiệm cho thấy rằng các trình tự khởi đầu có thể được sử dụng để biểu hiện kháng nguyên trong các hệ thống vector như hệ thống vector EHV để tạo ra chế phẩm sinh miễn dịch từ một hoặc hai vị trí và tạo ra vacxin DIVA, tương ứng.

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến vector EHV chứa

- (i) ít nhất hai trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh liên quan đến tác nhân gây bệnh lây nhiễm cho động vật sản xuất thực phẩm,
- (ii) trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh này được gắn chèn vào trong các vị trí gắn chèn,
- (iii) trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh này được liên kết theo kiểu hoạt động được với các trình tự khởi đầu.

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch chứa vector EHV như được mô tả trong bản mô tả này và tùy ý chất mang được dùng.

Vì thế, sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch bao gồm vector EHV chứa

- (i) ít nhất hai trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh liên quan đến tác nhân gây bệnh lây nhiễm cho động vật sản xuất thực phẩm,
- (ii) trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh này được gắn chèn vào trong các vị trí gắn chèn,
- (iii) trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh này được liên kết theo kiểu hoạt động được với các trình tự khởi đầu.

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch chứa hai hay nhiều vectơ EHV như được mô tả trong bản mô tả này. Tốt hơn là, chế phẩm sinh miễn dịch chứa hai, ba hoặc bốn vectơ EHV.

Theo một khía cạnh của sáng chế, chế phẩm sinh miễn dịch chứa hai vectơ EHV.

Theo một khía cạnh của sáng chế, hai hay nhiều vectơ EHV chứa các trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh khác nhau. Tốt hơn là, hai hay nhiều vectơ EHV chứa trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh khác nhau liên quan đến virus cúm lợn A. Tốt hơn nữa là hai hay nhiều vectơ EHV chứa các trình tự mã hóa hemagglutinin khác nhau.

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến vacxin DIVA chứa một hay nhiều vectơ EHV như được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một khía cạnh của sáng chế vectơ EHV là vectơ tái tổ hợp.

Theo một khía cạnh của sáng chế vectơ EHV là RacH hoặc RacH SE.

Theo một khía cạnh của sáng chế vectơ EHV được chọn từ nhóm bao gồm EHV-1, EHV-3, EHV-4, EHV-8 và EHV-9.

Theo một khía cạnh của sáng chế vectơ EHV là vectơ EHV-1.

Theo một khía cạnh của sáng chế động vật sản xuất thực phẩm là lợn.

Theo một khía cạnh của sáng chế tác nhân gây bệnh lây nhiễm cho động vật sản xuất thực phẩm là virus cúm, tốt hơn là virus cúm lợn A.

Theo một khía cạnh của sáng chế trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh là trình tự mã hóa hemagglutinin.

Theo một khía cạnh của sáng chế trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh là trình tự mã hóa hemagglutinin và phân typ hemagglutinin của virus cúm được chọn từ nhóm bao gồm H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16, H17 và H18.

Theo một khía cạnh của sáng chế trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh là trình tự mã hóa hemagglutinin và phân typ hemagglutinin của virus cúm là H1 và/hoặc H3.

Theo một khía cạnh của sáng chế trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh là trình tự mã hóa hemagglutinin và kháng nguyên hemagglutinin cúm A có nguồn gốc từ lợn

Theo một khía cạnh của sáng chế vectơ EHV chứa ít nhất hai trình tự mã hóa kháng nguyên hemagglutinin của virus cúm.

Theo một khía cạnh của sáng chế vectơ EHV chứa ít nhất là bốn trình tự mã hóa kháng nguyên hemagglutinin của virus cúm.

Theo một khía cạnh của sáng chế vectơ EHV chứa bốn trình tự mã hóa kháng nguyên hemagglutinin của virus cúm.

Theo một khía cạnh của sáng chế, trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh là trình tự mã hóa hemagglutinin và trình tự mã hóa kháng nguyên hemagglutinin của virus cúm được chọn từ nhóm bao gồm A/swine/Italy/116114/2010(H1N2), A/swine/Italy/7680/2001(H3N2), A/swine/Gent/132/2005(H1N1), A/swine/Italy/4675/2003(H1N2), A/swine/Italy/259543/2003(H1N2), A/swine/Denmark/13772-1/2003(H1N1), A/swine/England/MD0040352R/2009(H1N1), A/swine/Hungary/13509/2007(H3N2), A/swine/Italy/13962/95(H3N2), A/swine/Cotes d'Armor/1121/00(H1N1), A/Swine/Colorado/ 1/77, A/Swine/Colorado/23619/99, A/Swine/Cote d'Armor/3633/84, A/Swine/England/ 195852/92, A/Swine/Finistere/2899/82, A/Swine/Hong Kong/10/98, A/Swine/Hong Kong/9/98, A/Swine/Hong Kong/81/78, A/Swine/Illinois/100084/01, A/Swine/Illinois/100085A/01, A/Swine/Illinois/21587/99, A/Swine/Indiana/1726/88, A/Swine/Indiana/9K035/99, A/Swine/Indiana/P12439/00, A/Swine/Iowa/30, A/Swine/Iowa/15/30, A/Swine/Iowa/533/99, A/Swine/Iowa/569/99, A/Swine/Iowa/3421/90, A/Swine/Iowa/8548-1/98, A/Swine/Iowa/930/01, A/Swine/Iowa/17672/88, A/Swine/Italy/1513-1/98, A/Swine/Italy/1523/98, A/Swine/Korea/CY02/02, A/Swine/Minnesota/55551/00, A/Swine/Minnesota/593/99, A/Swine/Minnesota/9088-2/98, A/Swine/Nebraska/1/92, A/Swine/Nebraska/209/98, A/Swine/Netherlands/12/85, A/Swine/North Carolina/16497/99, A/Swine/North Carolina/35922/98, A/Swine/North Carolina/93523/01, A/Swine/North Carolina/98225/01, A/Swine/Oedenrode/7C/96, A/Swine/Ohio/891/01, A/Swine/Oklahoma/18717/99, A/Swine/Oklahoma/18089/99, A/Swine/Ontario/01911-1/99, A/Swine/Ontario/01911-2/99, A/Swine/Ontario/41848/97, A/Swine/Ontario/97, A/Swine/Quebec/192/81, A/Swine/Quebec/192/91, A/Swine/Quebec/5393/91, A/Swine/Taiwan/7310/70, A/Swine/Tennessee/24/77,

A/Swine/Texas/4199-2/98, A/Swine/Wisconsin/125/97, A/Swine/Wisconsin/136/97, A/Swine/Wisconsin/163/97, A/Swine/Wisconsin/164/97, A/Swine/Wisconsin/166/97, A/Swine/Wisconsin/168/97, A/Swine/Wisconsin/235/97, A/Swine/Wisconsin/238/97, A/Swine/Wisconsin/457/98, A/Swine/Wisconsin/458/98, A/Swine/Wisconsin/464/98 và A/Swine/Wisconsin/14094/99.

Theo một khía cạnh của sáng chế, trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh là trình tự mã hóa hemagglutinin và trình tự mã hóa kháng nguyên hemagglutinin của virus cúm được chọn từ nhóm bao gồm A/swine/Italy/116114/2010(H1N2), A/swine/Italy/7680/2001(H3N2), A/swine/Gent/132/2005(H1N1) và A/swine/Italy/4675/2003(H1N2).

Theo một khía cạnh của sáng chế, trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh là trình tự mã hóa hemagglutinin và trình tự mã hóa kháng nguyên hemagglutinin của virus cúm mã hóa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28 và SEQ ID NO:29.

Theo một khía cạnh của sáng chế trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh là trình tự mã hóa hemagglutinin và trình tự mã hóa kháng nguyên hemagglutinin của virus cúm bao gồm trình tự axit nucleic mã hóa trình tự axit amin với độ đồng nhất ít nhất là 70% với trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28 và SEQ ID NO:29.

Theo một khía cạnh của sáng chế trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh là trình tự mã hóa hemagglutinin và trình tự mã hóa kháng nguyên hemagglutinin của virus cúm bao gồm trình tự axit nucleic mã hóa trình tự axit amin với độ đồng nhất ít nhất là 70%, ít nhất là 75%, ít nhất là 80%, ít nhất là 85%, ít nhất là 90%, ít nhất là 91%, ít nhất là 92%, ít nhất là 93%, ít nhất là 94%, ít nhất là 95%, ít nhất là 96%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% với trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28 và SEQ ID NO:29.

Theo một khía cạnh của sáng chế trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh là trình tự mã hóa N (neuraminidaza) virus cúm A và phân typ N được chọn từ nhóm bao gồm N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8, N9 và N10.

Theo một khía cạnh của sáng chế vectơ EHV, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA không chứa trình tự mã hóa kháng nguyên N (neuraminidaza) virus cúm.

Theo một khía cạnh của sáng chế vectơ EHV, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA không chứa trình tự mã hóa kháng nguyên NP (nucleoprotein) virus cúm.

Theo một khía cạnh của sáng chế vectơ EHV chứa các trình tự điều hòa bổ sung như tín hiệu kết thúc hoặc trình tự polyadenyl hóa.

Vị trí gắn chèn:

Theo một khía cạnh của sáng chế vị trí gắn chèn này là ORF1/3.

Theo một khía cạnh của sáng chế vị trí gắn chèn này là ORF70.

Theo một khía cạnh của sáng chế trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh thứ nhất liên quan đến tác nhân gây bệnh lây nhiễm cho động vật sản xuất thực phẩm được gắn chèn vào trong ORF70.

Theo một khía cạnh của sáng chế trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh thứ hai liên quan đến tác nhân gây bệnh lây nhiễm cho động vật sản xuất thực phẩm được gắn chèn vào trong ORF1/3.

Theo một khía cạnh của sáng chế việc gắn chèn vào trong ORF70 được đặc trưng bởi việc xóa, cắt, thay thế, cải biến một phần hoặc tương tự trong ORF70, nhờ đó ORF71 vẫn giữ được chức năng.

Theo một khía cạnh của sáng chế việc gắn chèn vào trong ORF70 được đặc trưng bởi việc xóa một phần khoảng 801bp trong ORF70 đối với Racl (SEQ ID NO: 20) hoặc 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% trình tự tương đồng và/hoặc đồng nhất của nó.

Theo một khía cạnh cụ thể khác của vectơ theo sáng chế việc gắn chèn vào trong ORF70 được đặc trưng bởi việc xóa một phần khoảng 801bp trong ORF70 đối với Racl (SEQ ID NO.: 20) hoặc xóa trình tự tương đồng và/hoặc đồng nhất là 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% của nó ở chủng khác bất kỳ.

Theo một khía cạnh cụ thể khác của vectơ theo sáng chế việc gắn chèn vào trong ORF70 được đặc trưng bởi việc xóa khoảng 801bp trong ORF70 đối với chủng EHV-1 kiểu đại ab4 (mã số truy cập Genbank AY665713.1), nhờ đó phần bị xóa trong trình tự hệ

gen ab4 kiểu đại được nằm giữa nucleotit 127681 và 128482 (SEQ ID NO.: 19) hoặc trình tự tương đồng và/hoặc đồng nhất là 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% của nó.

Theo khía cạnh cụ thể khác của vectơ theo sáng chế việc gắn chèn vào trong ORF70 được đặc trưng bởi việc xóa khoảng 801bp trong ORF70 đối với chủng EHV-1 kiểu đại ab4 (mã số truy cập Genbank AY665713.1), nhờ đó phần bị xóa trong trình tự hệ gen ab4 kiểu đại được nằm giữa nucleotit 127681 và 128482 (SEQ ID NO.: 19) hoặc xóa trình tự tương đồng và/hoặc đồng nhất là 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% của nó ở chủng khác bất kỳ.

Theo một khía cạnh của sáng chế vectơ EHV-1 bao gồm ít nhất một vùng chặn được chọn từ nhóm bao gồm: SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, và SEQ ID NO: 18 và trình tự tương đồng và/hoặc đồng nhất là 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% của trình tự bất kỳ trong số các trình tự này.

Theo một khía cạnh của sáng chế vectơ EHV-1 bao gồm (i) ít nhất một vùng chặn ORF70 trái được chọn từ nhóm bao gồm: SEQ ID NO.: 13, SEQ ID NO: 15, và SEQ ID NO: 17, và (ii) ít nhất một vùng chặn ORF70 trái được chọn từ nhóm bao gồm: SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, và SEQ ID NO: 18.

Vùng khởi đầu:

Theo một khía cạnh của sáng chế trình tự khởi đầu được chọn từ nhóm bao gồm: T lớn SV40, gen sớm tức thì HCMV và MCMV 1, vùng khởi đầu alpha yếu tố kéo dài của người, vùng khởi đầu polyhedrin baculovirus, mảnh chức năng của 4pgG600 (SEQ ID NO:1), tốt hơn là mảnh chức năng này là p430 (SEQ ID NO:3), mảnh chức năng của trình tự nucleotit bổ sung của 4pgG600 (SEQ ID NO:1), mảnh chức năng của 4pMCP600 (SEQ ID NO:2), tốt hơn là mảnh chức năng này là p455 (SEQ ID NO:4), mảnh chức năng của trình tự nucleotit bổ sung của 4pMCP600 (SEQ ID NO: 2).

Theo một khía cạnh của sáng chế trình tự khởi đầu bao gồm 4pgG600 (SEQ ID NO:1) hoặc 4pMCP600 (SEQ ID NO:2) hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó hoặc mảnh chức năng hoặc dẫn xuất chức năng của nó hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó.

Theo một khía cạnh của sáng chế, mảnh chức năng hoặc dẫn xuất của trình tự khởi đầu có độ tương đồng là 80%, 85%, tốt hơn là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, tốt hơn nữa là 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,9%.

Theo một khía cạnh của sáng chế, mảnh chức năng hoặc dẫn xuất của trình tự khởi đầu 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 của sáng chế, mảnh chức năng của trình tự khởi đầu là phần cắt của 4pgG600 (SEQ ID NO:1) hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó, tốt hơn là độ đồng nhất trình tự là (ít nhất là) 72% trên toàn bộ chiều dài (hoặc cao hơn).

Theo một khía cạnh của sáng chế, mảnh chức năng của trình tự khởi đầu của 4pgG600 (SEQ ID NO:1) là mảnh được gọi là 430p430 (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 của sáng chế, mảnh chức năng của trình tự khởi đầu là phần cắt của 4pMCP600 (SEQ ID NO:2) hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó, tốt hơn là độ đồng nhất trình tự là (ít nhất là) 78% trên toàn bộ chiều dài (hoặc cao hơn).

Theo một khía cạnh của sáng chế, mảnh chức năng của trình tự khởi đầu của 4pMCP600 (SEQ ID NO:2) là mảnh được gọi là 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%.

Theo một khía cạnh của sáng chế, vector EHV bao gồm một hoặc nhiều trình tự điều hòa như tín hiệu kết thúc, tín hiệu polyadenyl hóa hoặc yếu tố điều hòa như IRES và/hoặc peptit 2a.

Tổ hợp đặc thù của vùng khởi đầu và kháng nguyên:

Theo một khía cạnh của sáng chế, trình tự khởi đầu 4pgG600 (SEQ ID NO:1) hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó hoặc mảnh chức năng hoặc dẫn xuất chức năng của nó hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó được liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự

axit nucleic mã hóa trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất là 70%, ít nhất là 75%, ít nhất là 80%, ít nhất là 85%, ít nhất là 90%, ít nhất là 91%, ít nhất là 92%, ít nhất là 93%, ít nhất là 94%, ít nhất là 95%, ít nhất là 96%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% với trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO: 28.

Theo một khía cạnh của sáng chế, mảnh chức năng của trình tự khởi đầu 4pgG600 (SEQ ID NO:1) là mảnh được gọi là p430 (SEQ ID NO:3).

Theo một khía cạnh của sáng chế, trình tự khởi đầu 4pMCP600 (SEQ ID NO:2) hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó hoặc mảnh chức năng hoặc dẫn xuất chức năng của nó hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó được liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự axit nucleic mã hóa trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất là 70%, ít nhất là 75%, ít nhất là 80%, ít nhất là 85%, ít nhất là 90%, ít nhất là 91%, ít nhất là 92%, ít nhất là 93%, ít nhất là 94%, ít nhất là 95%, ít nhất là 96%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% với trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO: 27.

Theo một khía cạnh của sáng chế, mảnh chức năng của trình tự khởi đầu 4pMCP600 (SEQ ID NO:2) là mảnh được gọi là 455p455 (SEQ ID NO:4).

Theo một khía cạnh của sáng chế, trình tự khởi đầu 4pgG600 (SEQ ID NO:1) hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó hoặc mảnh chức năng hoặc dẫn xuất chức năng của nó hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó được liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự axit nucleic mã hóa trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất là 70%, ít nhất là 75%, ít nhất là 80%, ít nhất là 85%, ít nhất là 90%, ít nhất là 91%, ít nhất là 92%, ít nhất là 93%, ít nhất là 94%, ít nhất là 95%, ít nhất là 96%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% với trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO: 28 và,

trong đó trình tự khởi đầu 4pMCP600 (SEQ ID NO:2) hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó hoặc mảnh chức năng hoặc dẫn xuất chức năng của nó hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó được liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự axit nucleic mã hóa trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất là 70%, ít nhất là 75%, ít nhất là 80%, ít nhất là 85%, ít nhất là 90%, ít nhất là 91%, ít nhất là 92%, ít nhất là 93%, ít nhất là 94%, ít nhất là 95%, ít nhất là 96%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% với trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO: 27.

Theo một khía cạnh của sáng chế, mảnh chức năng của trình tự khởi đầu 4pgG600 (SEQ ID NO:1) là mảnh được gọi là p430 (SEQ ID NO:3) và, trong đó mảnh chức năng của trình tự khởi đầu 4pMCP600 (SEQ ID NO:2) là mảnh được gọi là 455p455 (SEQ ID NO:4).

Theo một khía cạnh của sáng chế, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vacxin DIVA là nhị giá.

Theo một khía cạnh của sáng chế, trình tự khởi đầu 4pgG600 (SEQ ID NO:1) hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó hoặc mảnh chức năng hoặc dẫn xuất chức năng của nó hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó được liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự axit nucleic mã hóa trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất là 70%, ít nhất là 75%, ít nhất là 80%, ít nhất là 85%, ít nhất là 90%, ít nhất là 91%, ít nhất là 92%, ít nhất là 93%, ít nhất là 94%, ít nhất là 95%, ít nhất là 96%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% với trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO: 29.

Theo một khía cạnh của sáng chế, mảnh chức năng của trình tự khởi đầu 4pgG600 (SEQ ID NO:1) là mảnh được gọi là p430 (SEQ ID NO:3).

Theo một khía cạnh của sáng chế, trình tự khởi đầu 4pMCP600 (SEQ ID NO:2) hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó hoặc mảnh chức năng hoặc dẫn xuất chức năng của nó hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó được liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự axit nucleic mã hóa trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất là 70%, ít nhất là 75%, ít nhất là 80%, ít nhất là 85%, ít nhất là 90%, ít nhất là 91%, ít nhất là 92%, ít nhất là 93%, ít nhất là 94%, ít nhất là 95%, ít nhất là 96%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% với trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO: 26.

Theo một khía cạnh của sáng chế, mảnh chức năng của trình tự khởi đầu 4pMCP600 (SEQ ID NO:2) là mảnh được gọi là 455p455 (SEQ ID NO:4).

Theo một khía cạnh của sáng chế, trình tự khởi đầu 4pgG600 (SEQ ID NO:1) hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó hoặc mảnh chức năng hoặc dẫn xuất chức năng của nó hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó được liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự axit nucleic mã hóa trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất là 70%, ít nhất là 75%, ít nhất là 80%, ít nhất là 85%, ít nhất là 90%, ít nhất là 91%, ít nhất là 92%, ít nhất là 93%, ít nhất

là 94%, ít nhất là 95%, ít nhất là 96%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% với trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO: 29, và trong đó trình tự khởi đầu 4pMCP600 (SEQ ID NO:2) hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó hoặc mảnh chức năng hoặc dẫn xuất chức năng của nó hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó được liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự axit nucleic mã hóa trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất là 70%, ít nhất là 75%, ít nhất là 80%, ít nhất là 85%, ít nhất là 90%, ít nhất là 91%, ít nhất là 92%, ít nhất là 93%, ít nhất là 94%, ít nhất là 95%, ít nhất là 96%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% với trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO: 26.

Theo một khía cạnh của sáng chế, mảnh chức năng của trình tự khởi đầu 4pgG600 (SEQ ID số 1) là mảnh được gọi là p430 (SEQ ID NO: 3) và trong đó mảnh chức năng của trình tự khởi đầu 4pMCP600 (SEQ ID NO: 2) là mảnh được gọi là 455p455 (SEQ ID NO:4).

Theo một khía cạnh của sáng chế, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vacxin DIVA là nhị giá.

Theo một khía cạnh của sáng chế, chế phẩm sinh miễn dịch này chứa vector EHV thứ nhất bao gồm trình tự khởi đầu 4pgG600 (SEQ ID NO:1) hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó hoặc mảnh chức năng hoặc dẫn xuất chức năng của nó hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó được liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự axit nucleic mã hóa trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất là 70%, ít nhất là 75%, ít nhất là 80%, ít nhất là 85%, ít nhất là 90%, ít nhất là 91%, ít nhất là 92%, ít nhất là 93%, ít nhất là 94%, ít nhất là 95%, ít nhất là 96%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% với trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO: 28 và,

trong đó trình tự khởi đầu 4pMCP600 (SEQ ID NO:2) hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó hoặc mảnh chức năng hoặc dẫn xuất chức năng của nó hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó được liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự axit nucleic mã hóa trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất là 70%, ít nhất là 75%, ít nhất là 80%, ít nhất là 85%, ít nhất là 90%, ít nhất là 91%, ít nhất là 92%, ít nhất là 93%, ít nhất là 94%, ít nhất là 95%, ít nhất là 96%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% với trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO: 27 và

trong đó chế phẩm sinh miễn dịch này chứa vector EHV thứ hai bao gồm trình tự khởi đầu 4pgG600 (SEQ ID NO:1) hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó hoặc mảnh chức năng hoặc dẫn xuất chức năng của nó hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó được liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự axit nucleic mã hóa trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất là 70%, ít nhất là 75%, ít nhất là 80%, ít nhất là 85%, ít nhất là 90%, ít nhất là 91%, ít nhất là 92%, ít nhất là 93%, ít nhất là 94%, ít nhất là 95%, ít nhất là 96%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% với trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO: 29, và

trong đó trình tự khởi đầu 4pMCP600 (SEQ ID NO:2) hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó hoặc mảnh chức năng hoặc dẫn xuất chức năng của nó hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó được liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự axit nucleic mã hóa trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất là 70%, ít nhất là 75%, ít nhất là 80%, ít nhất là 85%, ít nhất là 90%, ít nhất là 91%, ít nhất là 92%, ít nhất là 93%, ít nhất là 94%, ít nhất là 95%, ít nhất là 96%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% với trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO: 26.

Theo một khía cạnh của sáng chế, mảnh chức năng của trình tự khởi đầu 4pgG600 (SEQ ID NO:1) là mảnh được gọi là p430 (SEQ ID NO:3) và trong đó mảnh chức năng của trình tự khởi đầu 4pMCP600 (SEQ ID số 2) là mảnh được gọi là 455p455 (SEQ ID NO:4).

Theo một khía cạnh của sáng chế, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vacxin DIVA là tứ giá.

Theo một khía cạnh của sáng chế, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vacxin DIVA này được bào chế để dùng liều đơn.

Tốt hơn là, liều đơn có tổng thể tích nằm trong khoảng từ 0,2 ml đến 2,5 ml, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,2 ml đến 2,0 ml, thậm chí tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,2 ml đến 1,75 ml, cũng tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,2 ml đến 1,5 ml, thậm chí tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,4 ml đến 1,25 ml, thậm chí tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,4 ml đến 1,0 ml với liều đơn 0,5 ml hoặc liều đơn 1,0 ml được ưu tiên nhất. Liều đơn được ưu tiên nhất có tổng thể tích là 0,5 ml, 1 ml, 1,5 ml hoặc 2 ml.

Cũng đã chỉ ra rằng một liều chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế có hiệu quả sau khi sử dụng liều đơn của chế phẩm sinh miễn dịch này.

Theo một khía cạnh của sáng chế, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA này được dùng trong cơ hoặc trong mũi.

Theo một khía cạnh của sáng chế, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA an toàn cho lợn trong vòng sáu tuần tuổi đầu tiên, trong vòng hai tuần tuổi đầu tiên, trong vòng tuần tuổi thứ nhất hoặc trong vòng ngày tuổi thứ nhất.

Theo một khía cạnh của sáng chế, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA còn chứa chất mang được dùng.

Theo một khía cạnh của sáng chế, chất mang được dùng là nước dùng cho dung dịch tiêm, môi trường nuôi cấy tế bào hoặc chất đệm huyền phù lại.

Theo một khía cạnh của sáng chế, chất đệm huyền phù lại là dung dịch muối đệm phosphat.

Theo một khía cạnh của sáng chế chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA chứa 1×10^4 đến 1×10^9 liều gây nhiễm mô nuôi cấy 50 (TCID₅₀), tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1×10^4 đến 1×10^8 TCID₅₀, còn tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 1×10^4 đến 1×10^7 TCID₅₀ của vector EHV.

Theo một khía cạnh của sáng chế, chế phẩm sinh miễn dịch này là vaccin.

Theo một khía cạnh của sáng chế, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA là vaccin đa giá.

Theo một khía cạnh của sáng chế, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA là vaccin nhị giá, vaccin tứ giá, vaccin 6 trong 1 hoặc vaccin 7 trong 1.

Theo một khía cạnh của sáng chế, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA là vaccin nhị giá hoặc vaccin tứ giá.

Theo một khía cạnh của sáng chế, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA hữu hiệu trong điều trị và/hoặc phòng ngừa các triệu chứng lâm sàng gây ra bởi virus cúm lợn A ở động vật sản xuất thực phẩm có nhu cầu.

Theo một khía cạnh của sáng chế, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA bảo vệ chống lại thử thách cùng loại và/hoặc khác loại với virus cúm lợn A.

Theo một khía cạnh của sáng chế, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA bảo vệ chống lại thử thách bằng virus cúm lợn A có kiểu huyết thanh H1 và/hoặc H3.

Bộ kit

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 phòng. Gói hoặc thiết bị phân phối có thể kèm theo hướng dẫn sử dụng tốt hơn là để dùng cho động vật sản xuất thực phẩm, 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 được phẩm hoặc sản phẩm sinh học, thông báo phản ánh sự chấp thuận của cơ quan này về việc sản xuất, sử dụng hoặc bán để dùng cho động vật.

Sáng chế đề cập đến bộ kit bao gồm chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA như được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một khía cạnh của sáng chế bộ kit này còn bao gồm tờ hướng dẫn điều trị và/hoặc phòng ngừa virus cúm lợn A.

Phương pháp điều trị

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

Tốt hơn là, việc gây miễn dịch dẫn đến làm giảm tỷ lệ mắc phải việc lây nhiễm virus cúm lợn A đặc thù trong đàn hoặc làm giảm mức độ nghiêm trọng của các dấu hiệu lâm sàng gây ra bởi hoặc có liên quan đến nhiễm virus cúm lợn A 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 cúm lợn A 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 cúm lợn A. Sẽ được hiểu rằng, quãng thời gian nêu trên sẽ kéo dài trên 2 tháng, tốt hơn trên 3 tháng, tốt hơn

nửa 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 được gây miễn dịch. Tuy nhiên, thuật ngữ này đòi hỏi rằng một phần đáng kể động vật trong đàn được gây miễn dịch một cách hiệu quả.

Tốt hơn là, một đàn động vật sản xuất thực phẩm thông thường gồm các động vật dự định trong sáng chế này, tức là không được gây miễn dịch, sẽ phát triển các dấu hiệu lâm sàng thường được gây ra bởi hoặc có liên quan đến nhiễm virus cúm lợn A. Nhóm động vật sản xuất thực phẩm trong đàn có được gây miễn dịch một cách hiệu quả hay không có thể được xác định mà không cần làm gì thêm bởi người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực này. Tốt hơn, việc gây miễn dịch sẽ có hiệu quả nếu như các dấu hiệu lâm sàng ở ít nhất 33%, ít nhất 50%, ít nhất 60%, ít nhất là 70%, ít nhất 80%, ít nhất 90%, thậm chí tốt hơn nữa ở ít nhất 95% và tốt nhất ở 100% động vật trong đàn đã nêu giảm về tỷ lệ mắc phải hoặc mức độ nghiêm trọng ít nhất 10%, tốt hơn nữa bởi ít nhất 20%, thậm chí tốt hơn nữa bởi ít nhất 30%, thậm chí tốt hơn nữa bởi ít nhất 40%, thậm chí tốt hơn nữa bởi ít nhất 50%, thậm chí tốt hơn nữa bởi ít nhất 60%, thậm chí tốt hơn nữa bởi ít nhất là 70%, thậm chí tốt hơn nữa bởi ít nhất 80%, thậm chí tốt hơn nữa bởi ít nhất 90%, thậm chí tốt hơn nữa bởi ít nhất 95% và tốt nhất bởi 100% so với các động vật sản xuất thực phẩm không được gây miễn dịch hoặc được gây miễn dịch bằng chế phẩm sinh miễn dịch đã có sẵn trước sáng chế nhưng sau đó bị nhiễm virus cúm lợn A đặc thù.

Sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị hoặc điều trị dự phòng các triệu chứng lâm sàng gây ra bởi virus cúm A ở động vật sản xuất thực phẩm có nhu cầu, phương pháp này bao gồm bước dùng cho động vật sản xuất thực phẩm lượng có tác dụng điều trị bệnh của chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vacxin DIVA 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 sản xuất thực phẩm không được điều trị (không được chủng ngừa) nhưng sau đó bị nhiễm virus cúm A đặc thù.

Sáng chế đề cập đến phương pháp làm giảm nồng độ virus chuẩn trong phổi của động vật sản xuất thực phẩm có nhu cầu, so với động vật sản xuất thực phẩm cùng loài

thuộc nhóm đối chứng không được chủng ngừa, phương pháp này bao gồm bước dùng cho động vật sản xuất thực phẩm lượng có tác dụng điều trị bệnh của chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA như được mô tả trong bản mô tả này. Tuy nhiên, nên hiểu rằng virus này là virus cúm A, tốt hơn là virus cúm lợn A.

Tốt hơn là, nồng độ virus chuẩn trong phổi được giảm ít nhất là 50%, còn tốt hơn nữa là ít nhất là khoảng 60%, vẫn còn tốt hơn nữa là ít nhất là khoảng 70%, còn tốt hơn nữa là ít nhất là khoảng 80%, còn tốt hơn nữa là ít nhất là khoảng 90%, vẫn còn tốt hơn nữa là ít nhất là khoảng 95% tốt nhất là 100% so với động vật sản xuất thực phẩm thuộc cùng loài trong nhóm đối chứng không được chủng ngừa mà sau đó bị nhiễm virus cúm A đặc thù.

Thuận lợi là, dữ liệu thử nghiệm được nêu trong sáng chế bộc lộ sự an toàn và hiệu quả của chế phẩm sinh miễn dịch được nêu ở đây khi được dùng cho lợn. Thực tế là, lợn được chủng ngừa bằng chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế được giảm các triệu chứng lâm sàng có liên quan đến bệnh so với lợn con không được chủng ngừa như nồng độ virus chuẩn trong phổi giảm sau thử thách nhiễm virus.

Sáng chế đề cập đến phương pháp chủng ngừa cho động vật sản xuất thực phẩm có nhu cầu có kháng thể kháng virus cúm lợn A bao gồm bước dùng cho động vật sản xuất thực phẩm này lượng có tác dụng điều trị bệnh của chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA như được mô tả trong bản mô tả này.

Tuy nhiên, kháng thể kháng virus cúm lợn A có thể có mặt trong lợn con không được chủng ngừa do lợn con đã tạo ra để đáp ứng với việc nhiễm virus cúm lợn A. Theo cách khác, kháng thể kháng virus cúm lợn A ở lợn con không được chủng ngừa là kháng thể có nguồn gốc từ lợn mẹ được tạo ra để đáp ứng với việc chủng ngừa cho lợn nái bằng vaccin virus cúm lợn A hoặc đáp ứng với việc nhiễm virus cúm lợn A của lợn nái. Các kháng thể có nguồn gốc từ mẹ được truyền thụ động từ những lợn nái này sang lợn con qua sữa non và sữa.

Sự can thiệp của kháng thể thu được từ mẹ vào kháng nguyên trong vaccin có thể làm giảm hoặc thậm chí loại trừ đáp ứng miễn dịch đối với vaccin sống, cũng như là vaccin đã được làm bất hoạt. Mức độ can thiệp khác nhau của kháng thể thu được từ mẹ lên đáp

ứng miễn dịch được gây ra bởi vaccin đã được báo cáo đối với vaccin sống, cũng như là đối với các vaccin không tái bản (nghĩa là vaccin dưới đơn vị hoặc đã được làm bất hoạt).

Vì thế, vaccin IAV được mô tả trong bản mô tả này có thể được áp dụng thành công cho lợn con với sự có mặt của kháng thể có nguồn gốc từ mẹ kháng IAV lợn và tạo ra sự bảo vệ chống nhiễm IAV lợn.

Ngoài ra, việc chủng ngừa cho lợn nái bằng vaccin IAV lợn như được mô tả trong bản mô tả này tạo ra tính miễn dịch cho lợn nái và chuyển kháng thể có nguồn gốc từ mẹ sang cho lợn con.

Vì thế, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra tính miễn dịch có nguồn gốc từ mẹ kháng virus cúm A ở động vật non sản xuất thực phẩm bao gồm bước dùng cho động vật mẹ của động vật non sản xuất thực phẩm lượng có tác dụng điều trị bệnh của chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA như được mô tả trong bản mô tả này trong khi động vật mẹ đang mang thai động vật non sản xuất thực phẩm.

Do vaccin IAV lợn được mô tả trong bản mô tả này có thể được áp dụng thành công cho lợn con khi có mặt kháng thể có nguồn gốc từ mẹ vaccin này có thể được sử dụng để chủng ngừa cho lợn nái và sau đó là chủng ngừa cho lợn con được đẻ ra từ lợn nái này. Lợn nái được chủng ngừa truyền tính miễn dịch có nguồn gốc từ mẹ bao gồm kháng thể cho lợn con. Tuy nhiên, do vaccin IAV lợn được mô tả trong bản mô tả này không can thiệp vào các kháng thể có nguồn gốc từ mẹ, lợn con có thể được chủng ngừa bằng vaccin này ở độ tuổi sớm hơn. Ngoài ra, bằng cách chủng ngừa cho lợn nái bằng vaccin như được mô tả trong bản mô tả này hoặc vaccin IAV lợn khác bất kỳ lợn nái cũng như lợn con non được đẻ ra từ lợn nái này, việc bảo vệ chống nhiễm virus cúm A được tăng lên. Trong những ngày đầu tiên đến vài tuần tuổi lợn con được bảo vệ bởi tính miễn dịch có nguồn gốc từ mẹ. Ngoài ra, bằng cách chủng ngừa sớm cho lợn con, lợn con thu được tính miễn dịch kháng nhiễm virus cúm A và vì thế được bảo vệ mà không xuất hiện một khoảng trống miễn dịch xuất hiện từ khi mất dần tính miễn dịch có nguồn gốc từ mẹ cho đến khi bắt đầu chủng ngừa.

Sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra sự bảo vệ gia tăng chống nhiễm virus cúm A ở động vật non sản xuất thực phẩm có nhu cầu, trong đó

- a) động vật mẹ của động vật non sản xuất thực phẩm này được chủng ngừa bằng lượng có tác dụng điều trị bệnh của chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA như được mô tả trong bản mô tả này trong khi động vật mẹ đang mang thai động vật non sản xuất thực phẩm này và/hoặc
- b) động vật non sản xuất thực phẩm này được chủng ngừa bằng lượng có tác dụng điều trị bệnh của chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA trong vòng ba tuần tuổi.

Tốt hơn là, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA này được dùng cho lợn nái đang mang thai ít nhất một lần trước khi đẻ, tốt hơn là sau khi gây miễn dịch cơ bản bằng một, tốt hơn nữa là hai lần chủng ngừa (“liều nhắc lại”). Khi chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA này được dùng cho lợn nái ba lần, lần gây miễn dịch cơ bản lần thứ nhất cần xảy ra trong khoảng 116 và 60 ngày trước khi đẻ một lứa lợn con, tốt hơn là trong khoảng 116 và 58 ngày trước khi đẻ một lứa lợn con, và tốt nhất là trong khoảng 116 và 56 ngày trước khi đẻ một lứa lợn con. Lần gây miễn dịch cơ bản thứ hai nên xảy ra trong khoảng 95 và 40 ngày trước khi đẻ một lứa lợn con, tốt hơn là trong khoảng 95 và 38 ngày trước khi đẻ một lứa lợn con, và tốt nhất là trong khoảng 95 và 35 ngày trước khi đẻ một lứa lợn con. Lần dùng cuối cùng tăng cường trước khi đẻ cần xảy ra trong khoảng 10 và 20 ngày trước khi đẻ một lứa lợn con, tốt hơn là trong khoảng 12 và 18 ngày trước khi đẻ một lứa lợn con, và tốt nhất là trong khoảng 14 trước khi đẻ một lứa lợn con.

Chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA được dùng cho lợn con tốt hơn là trước khi chúng đạt ba tuần tuổi. Tốt hơn là, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA được dùng cho mỗi lợn con lúc 1 ngày tuổi đến 21 ngày tuổi, tốt hơn là, trong khoảng từ 1 ngày tuổi đến 10 ngày tuổi, còn tốt hơn là, trong khoảng từ 1 ngày tuổi đến 9 ngày tuổi, còn tốt hơn nữa là trong khoảng từ 1 ngày tuổi đến 8 ngày tuổi, còn tốt hơn nữa là trong khoảng từ 1 ngày tuổi đến 7 ngày tuổi, còn tốt hơn nữa là trong khoảng từ 1 ngày tuổi đến 6 ngày tuổi, còn tốt hơn nữa là trong khoảng từ 1 ngày tuổi đến 5 ngày tuổi, còn tốt hơn nữa là trong khoảng từ 1 ngày tuổi đến 4 ngày tuổi, còn tốt hơn nữa là trong khoảng từ 1 ngày tuổi đến 3 ngày tuổi, còn tốt hơn nữa là 1 hoặc 2 ngày tuổi, và tốt nhất là 1 ngày tuổi.

Tuy nhiên, chế phẩm sinh miễn dịch có thể được dùng cho các con lợn con ở hai hoặc nhiều hơn hai liều, với liều thứ nhất được dùng trước khi dùng liều thứ hai (liều tăng cường). Tốt hơn là, liều thứ nhất được dùng trong vòng hai tuần tuổi đầu tiên, tốt hơn nữa

là trong vòng tuần tuổi đầu tiên và còn tốt hơn nữa là trong ngày tuổi đầu tiên. Tốt hơn là, liều thứ hai được dùng ít nhất 15 ngày sau liều thứ nhất. Tốt hơn nữa là, liều thứ hai được dùng trong khoảng từ 15 đến 40 ngày sau liều thứ nhất. Thậm chí tốt hơn nữa là, liều thứ hai được dùng ít nhất 17 ngày sau liều thứ nhất. Cũng tốt hơn nữa là, liều thứ hai được dùng trong khoảng 17 đến 30 ngày sau liều thứ nhất. Thậm chí tốt hơn nữa là, liều thứ hai được dùng ít nhất 19 ngày sau liều thứ nhất. Còn tốt hơn nữa là, liều thứ hai được dùng trong khoảng 19 đến 25 ngày sau liều thứ nhất. Tốt nhất là liều thứ hai được dùng ít nhất 21 ngày sau liều thứ nhất. Theo một khía cạnh được ưu tiên của phác đồ dùng hai lần, cả hai liều thứ nhất và thứ hai của chế phẩm sinh miễn dịch được dùng cùng một lượng. Tốt hơn là, mỗi liều với lượng được ưu tiên như đã chỉ ra ở trên, với liều 1 ml cho liều thứ nhất và liều thứ hai là được ưu tiên nhất. Ngoài phác đồ liều thứ nhất và liều thứ hai, phương án thay thế bao gồm các liều tiếp theo nữa. Ví dụ, liều thứ ba, thứ tư hoặc thứ năm có thể được dùng theo các khía cạnh này. Tốt hơn là, phác đồ các liều thứ ba, thứ tư và thứ năm tiếp theo được dùng với cùng lượng như liều thứ nhất, với khoảng thời gian giữa các liều phù hợp với thời gian giữa liều thứ nhất và liều thứ hai nêu trên. Vì thế, phương pháp này đề cập đến việc chủng ngừa cho lợn nái mang thai cũng như lợn con được sinh ra.

Theo một khía cạnh của sáng chế động vật sản xuất thực phẩm là lợn, lợn con hoặc lợn nái.

Theo một khía cạnh của sáng chế virus cúm A là virus cúm lợn A.

Theo một khía cạnh của sáng chế chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA được dùng một lần.

Cần hiểu rằng liều đơn là được dùng chỉ một lần. Như được chỉ ra trong phần ví dụ, chế phẩm sinh miễn dịch như được đề xuất ở đây đã được chứng minh là hữu hiệu sau khi dùng liều đơn.

Tốt hơn là, liều đơn có tổng thể tích nằm trong khoảng từ 0,2 ml đến 2,5 ml, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,2 ml đến 2,0 ml, thậm chí tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,2 ml đến 1,75 ml, cũng tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,2 ml đến 1,5 ml, thậm chí tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,4 ml đến 1,25 ml, thậm chí tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,4 ml đến 1,0 ml với liều đơn 0,5 ml hoặc liều đơn 1,0 ml được ưu tiên nhất. Liều đơn được ưu tiên nhất có tổng thể tích là 0,5 ml, 1 ml, 1,5 ml hoặc 2 ml.

Theo một khía cạnh của sáng chế chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vacxin DIVA được dùng cho động vật sản xuất thực phẩm trong vòng sáu tuần tuổi đầu tiên, trong vòng hai tuần tuổi đầu tiên, trong vòng tuần tuổi thứ nhất hoặc trong vòng ngày tuổi thứ nhất.

Tốt hơn là, động vật sản xuất thực phẩm được gây miễn dịch là động vật trong khoảng 1 ngày tuổi đến 40 ngày tuổi, 1 ngày tuổi đến 30 ngày tuổi, 1 ngày tuổi đến 21 ngày tuổi, tốt hơn nữa là, động vật sản xuất thực phẩm được gây miễn dịch này là động vật trong khoảng 1 ngày tuổi đến 10 ngày tuổi, thậm chí tốt hơn nữa là, trong khoảng 1 ngày tuổi đến 9 ngày tuổi, thậm chí tốt hơn nữa là trong khoảng 1 ngày tuổi đến 8 ngày tuổi, thậm chí tốt hơn nữa là trong khoảng 1 ngày tuổi đến 7 ngày tuổi, thậm chí tốt hơn nữa là trong khoảng 1 ngày tuổi đến 6 ngày tuổi, thậm chí tốt hơn nữa là trong khoảng 1 ngày tuổi đến 5 ngày tuổi, thậm chí tốt hơn nữa là trong khoảng 1 ngày tuổi đến 4 ngày tuổi, thậm chí tốt hơn nữa là trong khoảng 1 ngày tuổi đến 3 ngày tuổi, thậm chí tốt hơn nữa là 1 hoặc 2 ngày tuổi, và tốt nhất là 1 ngày tuổi hoặc 0 ngày tuổi.

Tốt hơn là, động vật sản xuất thực phẩm được gây miễn dịch là động vật sản xuất thực phẩm 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 hoặc 21 ngày tuổi. Tốt hơn nữa là, động vật sản xuất thực phẩm được gây miễn dịch này là động vật sản xuất thực phẩm 1, 2, 3, 4, 5, 6 hoặc 7 ngày tuổi. Tuy nhiên, cần phải hiểu rằng sau khi chủng ngừa cho động vật sản xuất thực phẩm vài ngày tuổi, cần vài ngày để hệ miễn dịch của động vật sản xuất thực phẩm xây dựng được sự miễn dịch chống lại sự nhiễm virus cúm lợn A. Vì vậy, tốt hơn là, động vật sản xuất thực phẩm được gây miễn dịch trong vòng ngày tuổi đầu tiên.

Theo một khía cạnh của sáng chế, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vacxin DIVA được dùng hai liều.

Như được chỉ ra trong phần ví dụ, chế phẩm sinh miễn dịch như được đề xuất ở đây đã được chứng minh là hữu hiệu sau khi dùng hai liều.

Tuy nhiên, chế phẩm sinh miễn dịch có thể được dùng ở hai hoặc nhiều hơn hai liều, với liều thứ nhất được dùng trước khi dùng liều thứ hai (liều tăng cường). Tốt hơn là, liều thứ nhất được dùng trong vòng hai tuần tuổi đầu tiên, tốt hơn nữa là trong vòng tuần tuổi đầu tiên và còn tốt hơn nữa là trong ngày tuổi đầu tiên. Tốt hơn là, liều thứ hai được dùng ít nhất 15 ngày sau liều thứ nhất. Tốt hơn nữa là, liều thứ hai được dùng trong khoảng từ

15 đến 40 ngày sau liều thứ nhất. Thậm chí tốt hơn nữa là, liều thứ hai được dùng ít nhất 17 ngày sau liều thứ nhất. Còn tốt hơn nữa là, liều thứ hai được dùng trong khoảng 17 đến 30 ngày sau liều thứ nhất. Thậm chí tốt hơn nữa là, liều thứ hai được dùng ít nhất 19 ngày sau liều thứ nhất. Cũng tốt hơn nữa là, liều thứ hai được dùng trong khoảng 19 đến 25 ngày sau liều thứ nhất. Tốt nhất là liều thứ hai được dùng ít nhất 21 ngày sau liều thứ nhất. Theo một khía cạnh được ưu tiên của phác đồ dùng hai lần, cả hai liều thứ nhất và thứ hai của chế phẩm sinh miễn dịch được dùng cùng một lượng. Tốt hơn là, mỗi liều với lượng được ưu tiên như đã chỉ ra ở trên, với liều 1 ml cho liều thứ nhất và liều thứ hai là được ưu tiên nhất. Ngoài phác đồ liều thứ nhất và liều thứ hai, phương án thay thế bao gồm các liều tiếp theo nữa. Ví dụ, liều thứ ba, thứ tư hoặc thứ năm có thể được dùng theo các khía cạnh này. Tốt hơn là, phác đồ các liều thứ ba, thứ tư và thứ năm tiếp theo được dùng với cùng lượng như liều thứ nhất, với khoảng thời gian giữa các liều phù hợp với thời gian giữa liều thứ nhất và liều thứ hai nêu trên.

Theo một khía cạnh của sáng chế chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA được dùng cho động vật sản xuất thực phẩm trong tuần tuổi đầu tiên và lần thứ hai trong vòng tuần tuổi thứ hai, ba hoặc bốn.

Theo một khía cạnh của sáng chế chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA này được dùng trong cơ hoặc trong mũi.

Chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA, tốt hơn là, được dùng khu trú hoặc toàn thân. Đường dùng thích hợp thường được sử dụng là dùng qua đường miệng hoặc ngoài đường tiêu hóa, như dùng trong mũi, trong tĩnh mạch, trong cơ, trong màng bụng, dưới da, cũng như là xông hít. Tuy nhiên, tùy thuộc vào bản chất và phương thức tác động của hợp chất, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA cũng có thể được sử dụng qua các đường dùng khác. Tuy nhiên, tốt nhất là chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA được dùng trong cơ hoặc trong mũi.

Theo một khía cạnh của sáng chế, động vật sản xuất thực phẩm là âm tính với kháng thể kháng virus cúm lợn A.

Theo một khía cạnh của sáng chế, động vật sản xuất thực phẩm dương tính với kháng thể kháng virus cúm lợn A. Tốt hơn là, hiệu giá kháng thể kháng virus cúm lợn A được xác định bằng thử nghiệm ức chế hemagglutinin và/hoặc thử nghiệm trung hòa virus

và tương ứng nằm trong khoảng từ 1:2 đến 1:2,048, nằm trong khoảng từ 1:2 đến 1:1,024, nằm trong khoảng từ 1:2 đến 1:512, nằm trong khoảng từ 1:2 đến 1:256, nằm trong khoảng từ 1:2 đến 1:128, nằm trong khoảng từ 1:2 đến 1:64, nằm trong khoảng từ 1:2 đến 1:32, nằm trong khoảng từ 1:2 đến 1:16, nằm trong khoảng từ 1:64 đến 1:2,048, nằm trong khoảng từ 1:64 đến 1:1024, hoặc nằm trong khoảng từ 1:64 đến 1:512. Theo cách khác hoặc ngoài ra, hiệu giá kháng thể kháng virus cúm lợn A được xác định bằng thử nghiệm ELISA mà được đánh giá bằng cách sử dụng các giá trị ngưỡng đặc trưng thử nghiệm được thiết lập hoặc đề xuất tương ứng với các mẫu dương tính và âm tính với kháng thể kháng virus cúm lợn A.

Cách xác định kháng thể kháng virus cúm lợn A có nguồn gốc từ mẹ đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực biết rõ.

Tốt hơn là, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccine DIVA chứa 1×10^4 đến 1×10^9 TCID₅₀, tốt hơn là trong khoảng từ 1×10^4 đến 1×10^8 TCID₅₀, còn tốt hơn nữa là 1×10^4 đến 1×10^7 TCID₅₀ vector EHV.

Theo một khía cạnh của sáng chế, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccine DIVA chứa 1×10^4 đến 1×10^7 TCID₅₀ vector EHV.

Theo một khía cạnh của sáng chế, phương pháp này đạt được sự cải thiện về các thông số hiệu quả được chọn từ nhóm bao gồm: giảm sự giảm thể trọng, tải lượng virus trong phổi giảm, giảm tổn thương phổi, giảm và/hoặc rút ngắn sự phát tán virus, giảm nhiệt độ trực tràng, giảm các triệu chứng lâm sàng (cụ thể là các triệu chứng rối loạn hô hấp), tăng sự cảm ứng (trung hòa) kháng thể kháng virus cúm lợn A, tăng kích thích tế bào T kháng virus cúm lợn A, tăng kích thích tế bào B kháng virus cúm lợn A, và giảm cytokin tiền viêm, ví dụ IL1 β , trong phổi, hoặc tổ hợp của các thông số này, so với động vật sản xuất thực phẩm của nhóm đối chứng cùng loài không được chủng ngừa.

Theo một khía cạnh của sáng chế, việc điều trị hoặc điều trị dự phòng dẫn đến làm rút ngắn giai đoạn mang virus so với động vật sản xuất thực phẩm trong nhóm đối chứng cùng loài không được điều trị.

Tốt hơn là, việc điều trị hoặc điều trị dự phòng dẫn đến việc làm rút ngắn giai đoạn mang virus khoảng ít nhất là 50%, còn tốt hơn nữa là ít nhất là khoảng 60%, vẫn còn tốt

hơn nữa là ít nhất là khoảng 70%, còn tốt hơn nữa là ít nhất là khoảng 80%, còn tốt hơn nữa là ít nhất là khoảng 90%, vẫn còn tốt hơn nữa là ít nhất là khoảng 95% tốt nhất là 100% so với động vật sản xuất thực phẩm của nhóm đối chứng cùng loài không được điều trị sau đó bị nhiễm virus cúm lợn A đặc thù.

Tốt hơn là, việc điều trị hoặc điều trị dự phòng dẫn đến việc làm giảm sự phát tán của virus cúm lợn A từ ngày 5 sau khi thử thách hoặc nhiễm, tốt hơn nữa là từ ngày 4 sau khi thử thách hoặc lây nhiễm, tốt hơn nữa là từ ngày 3 sau khi thử thách hoặc lây nhiễm và tốt nhất là từ ngày 1 hoặc 2 sau khi thử thách hoặc lây nhiễm virus cúm lợn A so với động vật sản xuất thực phẩm của nhóm đối chứng cùng loài không được chủng ngừa.

Theo một khía cạnh của sáng chế, việc điều trị hoặc điều trị dự phòng dẫn đến việc làm giảm sự phát tán của virus cúm A từ ngày 1 sau khi thử thách (lây nhiễm).

Theo một khía cạnh của sáng chế, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA bảo vệ chống lại thử thách cùng loại và/hoặc khác loại với virus cúm A.

Theo một khía cạnh của sáng chế, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA bảo vệ chống lại thử thách bằng virus cúm A có kiểu huyết thanh H1 và/hoặc H3.

Sáng chế cũng đề cập đến vector EHV, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA như được mô tả trong bản mô tả này cho mục đích trị liệu.

Sáng chế cũng đề cập đến vector EHV, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA như được mô tả trong bản mô tả này để dùng làm chất sinh miễn dịch hoặc vaccin

Sáng chế cũng đề cập đến vector EHV, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA như được mô tả trong bản mô tả này để dùng làm thuốc.

Sáng chế cũng đề cập đến việc sử dụng vector EHV, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA như được mô tả trong bản mô tả này để sản xuất thuốc

Sáng chế cũng đề cập đến việc sử dụng vector EHV, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA như được mô tả trong bản mô tả này để điều trị và/hoặc phòng ngừa nhiễm virus cúm lợn A ở động vật sản xuất thực phẩm.

DIVA

Ưu điểm chính của vaccin DIVA hữu hiệu là nó cho phép phát hiện động vật sản xuất thực phẩm (tốt hơn là lợn) vừa bị nhiễm hoặc đã nhiễm một thời gian (ít nhất là khoảng 3 tuần) trước khi lấy mẫu trong nhóm động vật được chủng ngừa, và vì thế tạo ra khả năng kiểm soát việc lây lan hoặc xuất hiện lại của tác nhân gây bệnh (tốt hơn là virus cúm lợn) trong nhóm động vật. Vì thế, có thể tuyên bố với mức độ tin cậy nhất định rằng nhóm lợn được chủng ngừa không có virus cúm lợn A trên cơ sở các kết quả thử nghiệm trong phòng thí nghiệm.

Vaccin đầu chuẩn tạo điều kiện cho việc sử dụng nhanh chóng và hiệu quả và cho phép phân biệt động vật bị nhiễm virus gây bệnh (liên quan đến bệnh) và động vật được chủng ngừa.

Chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo sáng chế không chứa trình tự mã hóa kháng nguyên bất kỳ mã hóa trình tự mã hóa kháng nguyên N (neuraminidaza) virus cúm và/hoặc trình tự mã hóa kháng nguyên NP (nucleoprotein) virus cúm.

Ngược lại, sau khi lây nhiễm cho động vật bằng virus cúm lợn A kiểu đại hoặc được chủng ngừa bằng vaccin sống được cải biến hoặc được chủng ngừa bằng vaccin virus toàn phần bất hoạt hoặc có kháng thể có nguồn gốc từ mẹ còn lại, động vật bị nhiễm/được chủng ngừa sản xuất/có kháng thể đặc hiệu kháng N (neuraminidaza) và/hoặc NP (nucleoprotein). Tuy nhiên, ở các động vật được chủng ngừa bằng chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế kháng thể đặc hiệu kháng N (neuraminidaza) và/hoặc NP (nucleoprotein) không thể phát hiện được.

Bằng các thử nghiệm miễn dịch ví dụ và/hoặc thử nghiệm phân tích bộ gen của các động vật chỉ được chủng ngừa bằng chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế có thể phân biệt được với các động vật bị nhiễm virus cúm lợn kiểu đại hoặc được chủng ngừa bằng vaccin sống được cải biến hoặc được chủng ngừa bằng vaccin virus toàn phần bất hoạt hoặc có kháng thể có nguồn gốc từ mẹ còn lại trong đó các động vật chỉ được chủng ngừa bằng chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế không có kháng thể đặc hiệu bất kỳ kháng N (neuraminidaza) và/hoặc NP (nucleoprotein) và trình tự mã hóa đặc hiệu N (neuraminidaza) và/hoặc NP (nucleoprotein) virus cúm lợn A bất kỳ tương ứng.

Sáng chế đề cập đến phương pháp phân biệt động vật sản xuất thực phẩm bị nhiễm virus cúm lợn A với động vật sản xuất thực phẩm được chủng ngừa bằng chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA như được mô tả trong bản mô tả này, bao gồm các bước

- a) lấy mẫu từ động vật sản xuất thực phẩm, và
- b) phân tích mẫu này bằng thử nghiệm miễn dịch và/hoặc thử nghiệm phân tích bộ gen.

Theo một khía cạnh của sáng chế, thử nghiệm miễn dịch bao gồm việc thử nghiệm mẫu có chứa kháng thể nhận diện đặc hiệu protein N (neuraminidaza) hoặc protein NP (nucleoprotein) của virus cúm lợn.

Theo một khía cạnh của sáng chế, động vật sản xuất thực phẩm bị nhiễm virus cúm lợn A nếu kháng thể nhận diện đặc hiệu protein N (neuraminidaza) hoặc protein NP (nucleoprotein) của virus cúm lợn được phát hiện.

Theo một khía cạnh của sáng chế, thử nghiệm phân tích bộ gen bao gồm việc thử nghiệm mẫu có chứa các trình tự đặc hiệu virus cúm lợn A mã hóa N (neuraminidaza) và/hoặc NP (nucleoprotein) hay không.

Theo một khía cạnh của sáng chế, động vật sản xuất thực phẩm bị nhiễm virus cúm lợn A nếu trình tự đặc hiệu virus cúm lợn A mã hóa N (neuraminidaza) và/hoặc NP (nucleoprotein) được phát hiện.

Theo một khía cạnh của sáng chế, thử nghiệm miễn dịch là EIA (thử nghiệm miễn dịch enzym) hoặc ELISA (thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym), hoặc, trong đó thử nghiệm phân tích bộ gen là PCR (phản ứng chuỗi polymeraza), RT-PCR (phản ứng chuỗi polymeraza phiên mã ngược) hoặc PCR thời gian thực (phản ứng chuỗi polymeraza).

Theo một khía cạnh của sáng chế, động vật sản xuất thực phẩm là lợn.

Theo một khía cạnh của sáng chế, mẫu là mẫu huyết thanh.

Tốt hơn là, kháng thể đặc hiệu N (neuraminidaza) và/hoặc NP (nucleoprotein) của SIAV kiểu đại được sử dụng để phát hiện kháng nguyên SIAV trong các lát cắt đường hô hấp từ lợn nghi ngờ bị nhiễm SIAV hoặc lợn được chủng ngừa bằng vaccin theo sáng chế. Trong trường hợp này, chỉ có mẫu từ lợn bị nhiễm hoặc được chủng ngừa bằng vaccin

sống được cải biến hoặc được chủng ngừa bằng vaccin virus toàn phần bất hoạt hoặc có kháng thể có nguồn gốc từ mẹ còn lại sẽ thể hiện kết quả dương tính bởi kháng thể đặc hiệu N (neuraminidaza) và/hoặc NP (nucleoprotein) này. Ngược lại, mẫu từ lợn được chủng ngừa bằng vaccin theo sáng chế sẽ thể hiện là không có kết quả bởi kháng thể đặc hiệu N (neuraminidaza) và/hoặc NP (nucleoprotein) do không có mặt kháng nguyên này (chỉ có hemagglutinin) trong vaccin theo sáng chế.

Tuy nhiên, epitop của N (neuraminidaza) và/hoặc NP (nucleoprotein) được bảo tồn tiến hóa và đặc hiệu với SIAV và đích cho kháng thể trung hòa.

Vì thế, thử nghiệm có thể, ví dụ bao gồm các lỗ với epitop N (neuraminidaza) và/hoặc NP (nucleoprotein) của SIAV kiểu đại được liên kết ngang với các đĩa thử nghiệm vi lỗ. Việc tạo liên kết ngang được thực hiện qua protein neo như, ví dụ, poly-L-lysin. Hệ thống biểu hiện để thu được epitop N (neuraminidaza) và/hoặc NP (nucleoprotein) kiểu đại là đã biết với người có kỹ năng trung bình trong lĩnh vực này. Theo cách khác, epitop N (neuraminidaza) và/hoặc NP (nucleoprotein) có thể được tổng hợp theo cách hóa học.

Các động vật chỉ được chủng ngừa bằng vaccin theo sáng chế không tạo ra kháng thể kháng epitop N (neuraminidaza) và/hoặc NP (nucleoprotein) kiểu đại. Tuy nhiên, các động vật này tạo ra kháng thể kháng epitop HA (hemagglutinin) theo sáng chế. Kết quả là, không có kháng thể nào gắn kết với lỗ được phủ bằng epitop N (neuraminidaza) và/hoặc NP (nucleoprotein) kiểu đại. Ngược lại, nếu lỗ được phủ bằng epitop HA theo sáng chế kháng thể gắn kết với epitop HA được thể.

Theo một khía cạnh của sáng chế ELISA là ELISA gián tiếp, ELISA kiểu bán kẹp, ELISA cạnh tranh hoặc ELISA phong bế.

Tuy nhiên, các kỹ thuật ELISA khác cũng được người có kỹ năng trung bình trong lĩnh vực này biết rõ. Các kỹ thuật ELISA được mô tả làm ví dụ trong ấn phẩm Wensvoort G. et al., 1988 (Vet. Microbiol. 17(2): 129-140), by Robiolo B. et al., 2010 (J. Virol. Methods. 166(1 -2): 21-27) and by Colijn, E.O. et al., 1997 (Vet. Microbiology 59: 15-25).

Tốt hơn là, thử nghiệm để phân biệt động vật bị nhiễm SIAV trên thực địa hoặc được chủng ngừa bằng vaccin sống được cải biến hoặc được chủng ngừa bằng vaccin virus toàn phần bất hoạt hoặc có kháng thể có nguồn gốc từ mẹ còn lại và động vật chỉ được

chủng ngừa bằng vacxin theo sáng chế được thực hiện bằng cách phân lập ARN của tế bào hô hấp và enzym phiên mã ngược sau đó khuếch đại ADN bổ trợ. Bằng cách sử dụng các đoạn môi đặc hiệu với N (neuraminidaza) và/hoặc NP (nucleoprotein) PCR có thể được thực hiện. Trong trường hợp lợn bị nhiễm SIAV kiểu đại nếu có tín hiệu PCR dương tính. Tuy nhiên, nếu không có trình tự đặc hiệu N (neuraminidaza) và/hoặc NP (nucleoprotein) có thể được khuếch đại động vật được chủng ngừa bằng vacxin theo sáng chế.

Ngoài ra, đoạn môi và/hoặc mẫu dò kỹ thuật trên cơ sở thời gian thực có thể được sử dụng để nhận diện N (neuraminidaza) và/hoặc NP (nucleoprotein) và/hoặc HA (hemagglutinin) đặc trưng. Tuy nhiên, các phương pháp này đã được biết rõ trong lĩnh vực này.

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, thử nghiệm phân tích bộ gen là PCR (phản ứng chuỗi polymeraza), RT-PCR (phản ứng chuỗi polymeraza enzym phiên mã ngược) hoặc PCR (phản ứng chuỗi polymeraza) thời gian thực.

Mô tả chi tiết sáng chế

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 kỹ năng 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); Oligonucleotit 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, cosmid, hoặc plasmid. Vector như được sử dụng trong bản mô tả này có thể bao gồm hoặc chứa AN 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 vectors 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 (recombinant baculovirus); 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 (recombinant herpesvirus); 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 (recombinant adenovirus); Grunhaus et al., 1992, "Adenovirus as cloning vectors," 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, relating to DNA expression vectors, inter alia. 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), (DNA vector systems); Szoka et al., U.S. patent No. 4,394,448 (method of inserting DNA into living cells); 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 plasmid, 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 gắn chèn, 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.

Theo khía cạnh cụ thể của phần mô tả, 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-3, EHV-4, EHV-8 và EHV-9. Các vector virus được ưu tiên bao gồm vector virus herpes như thu được từ EHV-1 hoặc EHV-4.

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 tái bản độc lập của 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 gắn chèn 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”, trình tự ADN bổ trợ hoặc “trình tự ADN” như được sử dụng trong bản mô tả này đề cập đến oligonucleotit, nucleotit hoặc polynucleotit và mảnh và phần chức năng của nó và ADN hoặc ARNA có nguồn gốc từ hệ gen hoặc có tổng hợp, mà có thể là mạch đơn hoặc mạch kép và là mạch có nghĩa hoặc 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, thymine, 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 vùng khởi đầu, trình tự khởi đầu, yếu tố lõi cần cho sự tương tác cơ bản của polymeraza ARN và yếu tố phiên mã, yếu tố ngược chiều, yếu tố tăng cường, và yếu tố đáp ứng. Các yếu tố điều hòa làm ví dụ ở sinh vật nhân sơ bao gồm vùng 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, trình tự kiểm soát phiên mã và dịch mã, như vùng 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 chiều 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 chiều 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 vector 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 chiều có thể được xác định dễ dàng bằng cách thay đổi khoảng cách và xác định sự biểu hiện đo như là một 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 “vùng 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, vùng 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 vùng 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 vùng khởi đầu bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, vùng 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. Vùng khởi đầu có thể cảm ứng,

kiểm chế và/hoặc mặc định. Vùng khởi đầu mặc định 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 vùng khởi đầu đã được người có kỹ năng trung bình trong lĩnh vực này biết rõ là ví dụ gen cực sớm 1 T lớn SV40, HCMV và MCMV, vùng khởi đầu alpha yếu tố kéo dài của người, vùng khởi đầu polyhedrin của baculovirus.

Như được sử dụng trong bản mô tả này trong ngữ cảnh của sáng chế thuật ngữ vùng khởi đầu đặc biệt để chỉ mảnh chức năng ví dụ phần cắt của 4pgG600 (SEQ ID NO:1) hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó, tốt hơn là độ đồng nhất trình tự là (ít nhất là) 72% (hoặc lớn hơn) trên toàn bộ chiều dài. Ngoài ra, như được sử dụng trong bản mô tả này trong ngữ cảnh của sáng chế thuật ngữ vùng khởi đầu để chỉ mảnh chức năng, ví dụ phần cắt của 4pMCP600 (SEQ ID NO:2) hoặc trình tự nucleotit bổ sung 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 “trình tự khởi đầu” đề cập đến p430 (SEQ ID NO:3) hoặc p455 (SEQ ID NO: 4). 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 vùng 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 vùng 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 vùng khởi đầu. Nó cũng có thể có các đoạn trùng lặp về mặt vật lý và chức năng với vùng 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 vùng 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 thể. Ngoài ra chúng có thể bao gồm việc bớt hoặc thêm các vị trí tác động *cis* như vị trí cung cấp cắt nối (ảnh), 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, 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 dịch mã từ trình tự được chọn có thể được định lượng bằng kỹ thuật lai thấm 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, thấm 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" đề 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 vùng 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 loại 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.

Việc biểu hiện tăng, độ chuẩn hoặc năng suất có thể đạt được bằng cách sử dụng vector 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 dấu chuẩn chọn lọc bổ sung, một hoặc nhiều protein huỳnh quang (ví dụ GFP) hoặc dấu 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 loại và/hoặc ngoại sinh, cải thiện độ ổn định (thời gian bán hủy) của mRNA hoặc protein, cải thiện sự khởi

đầu dịch mã mARN, tăng liều lượng gen bằng việc sử dụng plasmid episom (dựa trên việc sử dụng trình tự virut làm vùng khởi đầu sao chép, ví dụ SV40, polyoma, adenovirut, EBV hoặc BPV), việc sử dụng trình tự thúc đẩy khuếch đại hoặc hệ thống khuếch đại in vitro trên cơ sở các chuỗi khảm 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 thấm tách Western, thấm 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 vùng khởi đầu” được xác định gián tiếp bằng cách định lượng mARN được dịch mã dưới sự kiểm soát của vùng khởi đầu tương ứng. mARN được định lượng bằng RTqPCR theo tiêu chuẩn nội sinh.

Thuật ngữ “tải lượng virut” đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực biết rõ. Thuật ngữ tải lượng virut có thể dùng thay cho thuật ngữ nồng độ virut chuẩn trong bản mô tả này. Tải lượng virut hoặc nồng độ virut chuẩn là thước đo mức độ nghiêm trọng của sự nhiễm virut chủ động, và có thể được xác định bằng các phương pháp đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực biết rõ. Việc xác định có thể dựa trên sự phát hiện protein virut như bằng cách gắn kết kháng thể với protein virut và sau đó phát hiện hoặc, theo cách khác, bằng cách phát hiện axit nucleic thuộc virut bằng phương pháp khuếch đại như RT-PCR. Việc kiểm tra định lượng virion kèm theo ARN virut trong huyết tương bằng phương pháp khuếch đại axit nucleic là một thông số được sử dụng rộng rãi để đánh giá tình trạng và mức độ tiến triển của bệnh gây ra bởi retrovirut, và để đánh giá tính hữu hiệu của việc can thiệp nhằm mục đích phòng ngừa và điều trị. Ví dụ, tải lượng virut hoặc nồng độ virut chuẩn có thể được tính bằng cách ước lượng số lượng virut sống trong dịch thể liên quan như số lượng bản sao ARN trên một mililit huyết tương. Tốt hơn là, thuật ngữ “tải lượng virut” hoặc “nồng độ virut chuẩn” là thông số đơn vị lây nhiễm cho mỗi thể tích chế phẩm virut. Nồng độ virut chuẩn 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 vùng khởi đầu ngược chiều 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 mRNA. 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 mRNA 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 gắn chèn 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 gắn chèn 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", "trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh" so với tế bào chủ, khi nó là từ loài (virus) khác. Do đó, vùng

khởi đầu trên cơ sở EHV-4 theo sáng chế là ngoại sinh về khía cạnh vectơ virus EHV-1. Như được sử dụng trong bản mô tả này liên quan đến trình tự hoặc gen quan tâm như kháng nguyên thuật ngữ “ngoại sinh” hoặc “trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh” có nghĩa là trình tự hoặc gen quan tâm này, cụ thể là kháng nguyên được biểu hiện ngoại phạm vi loài tự nhiên của nó. Do đó, kháng nguyên H3 từ IAV lợn là một ví dụ về kháng nguyên ngoại sinh về mặt 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 gắn chèn vào trong tế bào chủ và protein hoặc ARN tương ứng được mã hóa theo đó để chỉ “khác loại”, “trình tự khác loại”, “gen khác loại”, “trình tự mã hóa khác loại”, “gen chuyển” hoặc “protein khác loại” 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, vùng 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 loại. Như được sử dụng trong bản mô tả này về mặt trình tự hoặc gen quan tâm như kháng nguyên, thuật ngữ “khác loại” 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 loại 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, gắn chèn, 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 loại” 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 loại 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 loại 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 loại” có nghĩa là vector chứa trình tự polynucleotit khác loại hoặc ngoại sinh. Thuật ngữ “vector tái tổ hợp” có nghĩa là vector chứa trình tự polynucleotit khác loại 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, vùng 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, vùng khởi đầu được liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự mã hóa nếu vùng 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 petít tín hiệu tiết, liên kề và trong khung đọc. Tuy nhiên, mặc dù vùng 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 liên kề với nó. Các yếu tố tăng cường không phải liên 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 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 vùng 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 vùng khởi đầu. Tế bào bị nhiễm vector virus mang cat-xet biểu hiện khi vùng 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 ADNaza 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 môi cho gen chuyển thông báo và song song với đoạn môi cho gen thiết yếu của vector 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 của vùng khởi đầu của các vùng 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 “độ 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 mức tương đồng về mặt trình tự là 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% gốc axit amin hoặc nucleotit trong trình tự tham chiếu cần phải khớp với hoặc bao gồm sự thay thế có bảo toàn bằng một axit amin hoặc nucleotit khác, hoặc một số lượng 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 gắn chen 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.

“Độ 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. Độ 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, độ 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 độ đồng nhất vị trí như vậy được chia cho tổng số nucleotit hoặc các gốc trong trình tự tham chiếu để thu được độ đồng nhất trình tự tính theo %. Độ 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 độ 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 độ đồng nhất trình tự được mã hóa trong các chương trình máy tính sẵn có công khai, các chương trình này xác định độ 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 and 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 gắn chen 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 kế 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 gắn chen 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 and 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 Blosum 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 ngựa. 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 herpes ở ngựa” hoặc “virus herpes ở ngựa” hoặc “EHV” có nghĩa là thành viên thuộc họ *Herpesviridae* gây ảnh hưởng cho ngựa. Đến nay có tám loài virus herpes ở ngựa khác nhau được xác định, nằm trong số đó thuộc phân họ *Alphaherpesvirinae* (EHV-1, EHV-3, EHV-4, EHV-8 và EHV-9) và ba trong số đó thuộc *Gammapherpesvirinae*. (<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 giống *Alphaherpesvirinae* trong họ *Herpesviridae*.

Thuật ngữ “hai hay nhiều vector EHV” bao gồm hai, ba, bốn, năm hoặc sáu vector EHV.

Thuật ngữ “được gắn chèn vào trong ORF70” và “vị trí gắn chèn là ORF70” có nghĩa là mảnh ADN được gắn chèn vào trong ADN hệ gen ở vị trí mã hóa khung đọc mở Equid herpesvirus 1 70. Việc gắn chèn 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 gắn chèn vào trong ORF1/3” và “vị trí gắn chèn là ORF1/3” có nghĩa là mảnh ADN được gắn chèn trong hệ gen virus ở vị trí mà bằng cách vô tình xóa

khi đi qua 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. Vị trí gắn chèn 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 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. Tốt hơn là, chế phẩm sinh miễn dịch gây ra đáp ứng miễn dịch và, tốt hơn nữa là, tạo ra miễn dịch bảo vệ chống lại một hoặc nhiều triệu chứng lâm sàng của nhiễm SIV lợn. Vật chủ còn được mô tả là “động vật sản xuất thực phẩm”. Trong trường hợp ở đó vật chủ biểu hiện đáp ứng miễn dịch bảo vệ tới mức gia tăng tính kháng đối với sự nhiễm mới và/hoặc giảm mức độ nghiêm trọng về mặt lâm sàng của bệnh, chế phẩm sinh miễn dịch được mô tả như là “vaccin”.

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. Ngoài ra, thuật ngữ “trình tự mã hóa kháng nguyên” đề cập đến các trình tự mã hóa kháng nguyên. Tốt hơn là trình tự mã hóa kháng nguyên là trình tự axit nucleic như trình tự ADN bổ trợ. Tuy nhiên, thuật ngữ “trình tự axit nucleic” đã được định nghĩa trong bản mô tả này.

Thuật ngữ “ít nhất một trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh” cũng bao gồm nhiều hơn một trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh. Vì thế, người ta hiểu rằng thuật ngữ “ít nhất một trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh” bao gồm hai, ba, bốn, năm hoặc sáu trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh. Do đó, thuật ngữ “ít nhất hai trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh” bao gồm ba, bốn, năm hoặc sáu trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh.

Thuật ngữ “trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh khác” là các trình tự khác nhau về trình tự của nó với nhau.

“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 hoặc các mảnh bị cắt và/hoặc được thể 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; and 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 sườn, 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; and 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 "gây miễn dịch" đề cập đến việc gây miễn dịch chủ động bằng cách đưa chế phẩm sinh miễn dịch vào động vật sản xuất thực phẩm cần được gây miễn dịch, bằng cách đó gây ra đáp ứng miễn dịch chống lại kháng nguyên chứa trong chế phẩm sinh miễn dịch này.

Thuật ngữ “có nhu cầu” hoặc “cần”, như được sử dụng ở đây có nghĩa là việc sử dụng/điều trị có liên quan đến việc tăng cường hoặc cải thiện sức khỏe hoặc triệu chứng lâm sàng hoặc ảnh hưởng chữa bệnh tích cực khác lên sức khỏe của động vật mà nhận chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế.

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 được 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 cách 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 được 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 particles - VLP). Vì thế, vacxin có thể là vacxin dưới đơn vị hoặc vacxin chết (KV) hoặc bất hoạt.

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 được 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 có độc tính hoặc không có độc tính 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 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, glutaraldehyt, 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. 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, thuật ngữ "đã bất hoạt" trong ngữ cảnh này nghĩa là virus không còn khả năng sao chép *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.

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 vector 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 đậm 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 được 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 dexten; 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) and Todd et al., *Vaccine* 15:564-570 (1997). Tá dược được nêu làm ví dụ là nhũ tương SPT được mô tả ở trang 147 trong tài liệu “Vaccine 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 thế 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 dược thích hợp khác bao gồm, nhưng không giới hạn ở, hệ tá dược 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 vectơ 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 tác nhân gây 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, tác nhân gây bệnh được làm giảm độc lực, không độc như ví dụ vectơ virus được làm giảm độc lực theo sáng chế, đặc biệt là vectơ 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.

Thuật ngữ “điều trị và/hoặc phòng ngừa” dùng để chỉ sự giảm tỷ lệ mắc phải sự nhiễm virus cúm lợn A đặc thù trong đàn hoặc giảm mức độ nghiêm trọng của triệu chứng lâm sàng gây ra bởi hoặc có liên quan đến nhiễm virus cúm lợn A đặc thù. Vì vậy, thuật ngữ “điều trị và/hoặc phòng ngừa” cũng dùng để chỉ sự giảm số lượng động vật trong đàn bị nhiễm virus cúm lợn A đặc thù (= sự giảm tỷ lệ mắc phải sự nhiễm virus cúm lợn A đặc thù) hoặc để chỉ sự giảm mức độ nghiêm trọng của triệu chứng lâm sàng thường có liên quan đến hoặc gây ra bởi sự nhiễm virus cúm lợn A ở một nhóm gồm các động vật mà các động vật này nhận một lượng hữu hiệu chế phẩm sinh miễn dịch như được đề xuất trong bản mô tả này so với nhóm gồm các động vật mà các động vật này không nhận chế phẩm sinh miễn dịch này.

“Điều trị và/hoặc phòng ngừa” thường bao gồm sử dụng lượng hữu hiệu chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế cho đối tượng hoặc đàn gồm các động vật cần điều trị và/hoặc phòng ngừa hoặc động vật mà có thể có lợi từ việc điều trị/phòng ngừa này. Thuật ngữ “điều trị” dùng để chỉ việc sử dụng lượng hữu hiệu chế phẩm sinh miễn dịch khi động vật hoặc ít nhất một số động vật thuộc đàn đã bị nhiễm virus cúm lợn A này và trong đó các động vật đã thể hiện một số triệu chứng lâm sàng gây ra bởi hoặc có liên quan đến sự nhiễm virus cúm lợn A này. Thuật ngữ “phòng ngừa” dùng để chỉ việc dùng cho động vật trước khi động vật này bị nhiễm virus cúm lợn A hoặc ít nhất trong đó động vật này hoặc không động vật nào trong số các động vật trong nhóm gồm các động vật không thể hiện triệu chứng lâm sàng bất kỳ được gây ra bởi hoặc có liên quan đến sự nhiễm virus cúm lợn A này. Thuật ngữ “phòng ngừa” và “ngăn ngừa” được sử dụng thay đổi cho nhau trong đơn sáng chế này.

Thuật ngữ “triệu chứng lâm sàng” như được sử dụng ở đây dùng để chỉ triệu chứng nhiễm virus cúm lợn A của động vật. Triệu chứng lâm sàng của sự nhiễm tùy thuộc vào tác nhân gây bệnh được lựa chọn. Ví dụ về các triệu chứng lâm sàng như vậy bao gồm, nhưng không giới hạn ở, suy hô hấp, viêm tai, lông xù, sốt nhẹ, trầm cảm, và thèm ăn giảm. Tuy nhiên, triệu chứng lâm sàng cũng bao gồm, nhưng không giới hạn ở, triệu chứng lâm sàng mà có thể quan sát trực tiếp từ động vật sống. Ví dụ về triệu chứng lâm sàng mà có thể quan sát trực tiếp từ động vật sống bao gồm chảy nước mắt và nước mũi, hôn mê, ho, thở khò khè, tim đập mạnh, sốt tăng, giảm cân, mất nước, đi khắp khiêng, còi cọc, da xanh, không phát triển và các triệu chứng tương tự.

Tốt hơn là, các triệu chứng lâm sàng làm giảm tỷ lệ mắc hoặc mức độ nghiêm trọng ở động vật được điều trị so với động vật không được điều trị hoặc được điều trị bằng chế phẩm sinh miễn dịch mà có trước sáng chế nhưng sau đó bị nhiễm virus cúm lợn A đặc thù để chỉ việc làm giảm về giảm thể trọng, hạ tải lượng virus trong phổi, giảm tổn thương phổi, giảm và/hoặc rút ngắn sự phát tán virus, giảm nhiệt độ trực tràng, giảm các triệu chứng lâm sàng (cụ thể là các triệu chứng rối loạn hô hấp), tăng cảm ứng (trung hòa) kháng thể kháng virus cúm lợn A, tăng kích thích tế bào T kháng virus cúm lợn A, tăng kích thích tế bào B kháng virus cúm lợn A, và giảm cytokin tiền viêm, ví dụ IL1 β , trong phổi, hoặc tổ hợp của chúng.

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. Lượng hữu hiệu như vậy có khả năng làm giảm tỷ lệ mắc phải nhiễm virus cúm lợn A đặc thù trong đàn hoặc làm giảm mức độ nghiêm trọng của triệu chứng lâm sàng của nhiễm virus cúm lợn A đặc thù. 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 vacxin mong muốn. Thông thường, “đáp ứng miễn dịch” hoặc “đáp ứng về miễn dịch” bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, một hoặc nhiều 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 về tải lượng virus toàn bộ và/hoặc giảm về 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 sự trung hòa kháng thể và/hoặc chuyển đổi 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 dụng có hại hơn so với kỳ vọng ở một đối tượng không được gây miễn dịch mà động vật này đã được tiếp xúc với bệnh hoặc lây nhiễm. Tức là, mức độ nghiêm trọng của các tác động gây hại của lây nhiễm được giảm thiểu ở động vật được chủng ngừa. Lây nhiễm có thể được làm giảm, làm chậm lại hoặc có thể được ngăn chặn hoàn toàn, ở động vật được chủng ngừa. 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. “Đáp ứng miễn dịch bảo vệ” hoặc “miễn dịch bảo vệ” sẽ được biểu hiện bởi sự giảm hoặc sự không có triệu chứng lâm sàng thường được biểu lộ bởi vật chủ bị nhiễm, thời gian hồi phục nhanh hơn và/hoặc khoảng thời gian lây nhiễm giảm hoặc chuẩn độ tác nhân gây bệnh giảm trong các mô hoặc dịch thể hoặc chất bài tiết của vật chủ bị nhiễm.

Ở đây, thuật ngữ "giảm về tỷ lệ mắc và/hoặc mức độ nghiêm trọng của các triệu chứng lâm sàng" hoặc "giảm về các triệu chứng lâm sàng" có nghĩa là, nhưng không bị giới hạn bởi, giảm về số lượng động vật bị nhiễm trong nhóm, giảm hoặc loại trừ số lượng động vật biểu hiện các triệu chứng lâm sàng của lây nhiễm hoặc giảm về mức độ nghiêm trọng của các triệu chứng lâm sàng bất kỳ có mặt trong một hoặc nhiều động vật, so với lây nhiễm hiệu đại. 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 tác nhân gây 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 động vật tiếp nhận chế phẩm trị liệu theo sáng chế ít nhất 10% so với các động vật không được tiếp nhận chế phẩm và trở nên bị lây nhiễm. Tốt hơn nữa các dấu hiệu lâm sàng được giảm ở động vật 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 bị giới hạn bởi, làm giảm có ý nghĩa thống kê về một hoặc nhiều triệu chứng lâm sàng có liên quan đến nhiễm trùng bởi một tác nhân lây nhiễm, tốt hơn là PEDV, một cách tương ứng, ở nhóm động vật 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 bị giới hạn bởi, tần suất về tỷ lệ mắc của ít nhất một triệu chứng lâm sàng ở nhóm động vật được chủng ngừa ít nhất 10%, tốt hơn 20%, tốt hơn nữa 30%, thậm chí tốt hơn nữa 50%, và thậm chí tốt hơn nữa 70% thấp hơn so nhóm đối chứng không được chủng ngừa sau khi cảm nhiễm bởi tác nhân lây nhiễm.

Thuật ngữ “mầm bệnh” đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực biết rõ. Tuy nhiên, thuật ngữ “mầm bệnh” bao gồm vi khuẩn và virus.

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 lợn. Thuật ngữ “động vật sản xuất thực phẩm” không bao gồm, động vật thuộc họ Equidae như ngựa.

“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 là 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 “phát tán” dùng để chỉ sự tiết nước mũi và ngoài ra dùng để chỉ các dạng sol khí được tạo ra bởi ho hoặc hắt hơi. Vì vậy, việc phát tán có thể được xác định bằng cách kiểm tra nồng độ virus chuẩn trong gạc mũi hoặc bằng cách kiểm tra nồng độ virus chuẩn trong phổi. Thuật ngữ “phát tán” còn bao hàm việc truyền virus sang động vật dễ bị

mắc (nghĩa là miễn cảm). Cách xác định mức độ phát tán virus được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực biết rõ.

Thuật ngữ “kháng thể kháng virus cúm lợn A” đề cập đến kháng thể đặc hiệu với virus cúm lợn A. Ví dụ về kháng thể kháng virus cúm lợn A như vậy bao gồm, nhưng không giới hạn ở kháng thể thu được từ mẹ bằng cách chủng ngừa lợn nái bằng vắc xin virus cúm lợn A hoặc kháng thể thu được từ mẹ bằng cách gây nhiễm virus cúm lợn A cho lợn nái. Ngoài ra, kháng thể kháng virus cúm lợn A ở lợn con có thể được phát triển để đáp ứng lại sự nhiễm virus cúm lợn A của lợn con. Thuật ngữ “kháng thể kháng virus cúm lợn A” sẽ cũng có nghĩa, nhưng không giới hạn ở, lợn con có hoặc được tiếp xúc với (truyền kháng thể từ mẹ một cách thụ động) hiệu giá kháng thể kháng virus cúm lợn A có thể phát hiện được, tốt hơn là ít nhất 1:10, tốt hơn nữa là lớn hơn 1:20, thậm chí tốt hơn nữa là lớn hơn 1:40, thậm chí tốt hơn nữa là lớn hơn 1:80, thậm chí tốt hơn nữa là bằng 1:160, thậm chí tốt hơn nữa là lớn hơn 1:320, và tốt nhất là lớn hơn 1:640. Tốt hơn là, hiệu giá kháng thể kháng virus cúm lợn A có thể được phát hiện và định lượng trong thử nghiệm miễn dịch kháng virus cúm lợn A đặc hiệu như thử nghiệm ức chế ngưng kết hồng cầu, thử nghiệm ELISA hoặc trung hòa huyết thanh.

“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 khôi phục hiệu lực của vắc xin trên cơ sở vi khuẩn 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 vắc xin.

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

Chế phẩm theo sáng chế chứa lượng gây miễn dịch hữu hiệu của một hoặc nhiều thành phần sinh miễn dịch và chất dẫn thuốc được dụng. Vacxin chứa lượng gây miễn dịch hữu hiệu của một hoặc nhiều thành phần sinh miễn dịch và chất dẫn thuốc được dụng. 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 cacbonat 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 1×10^4 đến 1×10^9 (xem nồng độ virus chuẩn ở trên). Theo một khía cạnh cụ thể của sáng chế, liều lượng là khoảng 1×10^4 đến 1×10^7 TCID₅₀.

Định nghĩa kháng nguyên

Thuật ngữ "virus cúm lợn" được biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Thuật ngữ virus cúm lợn dùng để chỉ virus cúm typ A hoặc typ C từ họ orthomyxovirus mà gây cúm lợn. Trong khi orthomyxovirus có ba nhóm: typ A, typ B và typ C, chỉ có virus cúm typ A và typ C là gây bệnh cho lợn. Tốt hơn là, virus cúm lợn là virus cúm lợn A. Các phân typ của virus cúm lợn bao gồm H1N1, H1N2, H3N2, và H3N1. H9N2 và H5N1 cũng có thể được tìm thấy ở lợn. Tốt hơn là, virus cúm lợn là virus cúm mà được phân lập từ lợn.

Các thuật ngữ “HA” hoặc “H”, “NA” hoặc “N” và “NP” đã biết với người có kỹ năng trung bình trong lĩnh vực này. Tuy nhiên, thông thường, virus cúm typ A được chia thành các phân typ 17 H (hemagglutinin) và 10 N (neuraminidaza) mà có thể tạo ra nhiều tổ hợp có thể có (có tên gọi như là H1N1, H1N2....H2N1, H2N2....H5N1, H5N2.... và v.v.). H (hemagglutinin) và N (neuraminidaza) là các glycoprotein bề mặt trong các virus cúm A như SIAV. Ngoài ra, N là đích kháng nguyên chính của kháng thể trung hòa. Ngoài ra, NP (nucleoprotein) tạo thành nucleocapsit.

Các định nghĩa về DIVA

Thuật ngữ “DIVA (phân biệt động vật bị nhiễm và động vật được chủng ngừa) chỉ vacxin mà có thể được sử dụng để phân biệt động vật được chủng ngừa với động vật bị nhiễm theo cách tự nhiên.

Thuật ngữ “mẫu” chỉ mẫu dịch thể, mẫu của tế bào được tách hoặc mẫu từ mô hoặc cơ quan. Các mẫu dịch thể có thể thu được bằng các kỹ thuật đã biết và bao gồm, tốt hơn là, các mẫu máu, huyết tương, huyết thanh hoặc nước tiểu, tốt hơn là, các mẫu máu, huyết tương hoặc huyết thanh. Các mẫu mô hoặc cơ quan có thể thu được từ mô hoặc cơ quan bất kỳ bằng cách, ví dụ, sinh thiết. Các tế bào được tách có thể thu được từ dịch thể hoặc mô hoặc cơ quan bằng cách kỹ thuật tách như ly tâm hoặc phân loại tế bào.

Thuật ngữ “thu được” có thể bao gồm bước phân lập và/hoặc tinh chế đã biết với người có kỹ năng trung bình trong lĩnh vực này, tốt hơn là bằng cách sử dụng kết tủa, cột, v.v.

Thuật ngữ “thử nghiệm miễn dịch” và “thử nghiệm phân tích bộ gen” là cơ sở để phân biệt các động vật được chủng ngừa bằng chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế và động vật bị nhiễm virus cúm lợn có trong tự nhiên (được liên quan đến bệnh). Các ví dụ về thử nghiệm miễn dịch bao gồm phương pháp phát hiện miễn dịch enzym hoặc hóa học miễn dịch như ELISA (thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym), EIA (thử nghiệm miễn dịch enzym), RIA (thử nghiệm miễn dịch phóng xạ), thử nghiệm miễn dịch enzym dạng bánh kẹp, thử nghiệm kháng thể huỳnh quang (FAT) thử nghiệm miễn dịch bánh kẹp đo mức phát quang điện hóa (ECLIA), thử nghiệm miễn dịch tăng cường phân ly lantanit flo (DELFI) hoặc thử nghiệm miễn dịch pha rắn, thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang (IFT), nhuộm hóa mô miễn dịch, phân tích thẩm tách Western hoặc các phương pháp thích

hợp khác mà người có kỹ năng trong lĩnh vực này có thể sử dụng. Phụ thuộc vào thử nghiệm được sử dụng, kháng nguyên hoặc kháng thể có thể được đánh dấu bằng enzym, phân tử mang huỳnh quang hoặc chất đồng vị phóng xạ. Ví dụ xem trong Coligan et al. *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons Inc., New York, N.Y. (1994); and Frye et al., *Oncogen* 4: 1153-1157, 1987.

Thuật ngữ “thử nghiệm phân tích bộ gen” đề cập đến phương pháp phân tích bộ gen dựa trên phản ứng chuỗi polymeraza (PCR), phản ứng chuỗi polymeraza phiên mã ngược (RT-PCR), PCR thời gian thực (r-PCR) hoặc PCR phiên mã ngược thời gian thực (rRT-PCR), Templex-PCR, khuếch đại trên cơ sở trình tự axit nucleic (NASBA), và phương pháp khuếch đại đẳng nhiệt bằng cách sử dụng polymeraza và oligonucleotit cụ thể làm đoạn mồi. Các phương pháp khuếch đại nêu trên đã được biết rõ trong lĩnh vực này.

Các phương án

Các phương án sau đây được mô tả trong bản mô tả này:

Sáng chế đề xuất các phương án sau đây:

Hợp chất

1. Vector EHV chứa

- (i) ít nhất một trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh liên quan đến tác nhân gây bệnh lây nhiễm cho động vật sản xuất thực phẩm,
- (ii) trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh này được gắn chèn vào trong ORF70,
- (iii) trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh này được liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự khởi đầu.

2. Chế phẩm sinh miễn dịch chứa Vector EHV theo phương án 1 và tùy ý chất mang được dùng.

3. Chế phẩm sinh miễn dịch chứa Vector EHV bao gồm

- (i) ít nhất một trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh liên quan đến tác nhân gây bệnh lây nhiễm cho động vật sản xuất thực phẩm,
- (ii) trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh này được gắn chèn vào trong ORF70,

(iii) trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh này được liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự khởi đầu.

4. Vector EHV chứa

- (i) ít nhất một trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh liên quan đến tác nhân gây bệnh lây nhiễm cho động vật sản xuất thực phẩm,
- (ii) trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh này được gắn chèn vào trong vị trí gắn chèn,
- (iii) trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh này được liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự khởi đầu chứa 4pgG600 (SEQ ID NO:1) hoặc 4pMCP600 (SEQ ID NO:2) hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó hoặc mảnh chức năng hoặc dẫn xuất chức năng của nó hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó.

5. Chế phẩm sinh miễn dịch chứa vector EHV theo phương án 4 và tùy ý chất mang được dụng.

6. Chế phẩm sinh miễn dịch chứa vector EHV bao gồm

- (i) ít nhất một trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh liên quan đến tác nhân gây bệnh lây nhiễm cho động vật sản xuất thực phẩm,
- (ii) trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh này được gắn chèn vào trong vị trí gắn chèn,
- (iii) trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh này được liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự khởi đầu chứa 4pgG600 (SEQ ID NO:1) hoặc 4pMCP600 (SEQ ID NO:2) hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó hoặc mảnh chức năng hoặc dẫn xuất chức năng của nó hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó.

7. Vector EHV chứa

- (i) ít nhất hai trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh liên quan đến tác nhân gây bệnh lây nhiễm cho động vật sản xuất thực phẩm,
- (ii) trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh này được gắn chèn vào trong các vị trí gắn chèn,

(iii) trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh này được liên kết theo kiểu hoạt động được với các trình tự khởi đầu.

8. Chế phẩm sinh miễn dịch chứa vector EHV theo phương án 7 và tùy ý chất mang được dùng.

9. Chế phẩm sinh miễn dịch chứa vector EHV bao gồm

(i) ít nhất hai trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh liên quan đến tác nhân gây bệnh lây nhiễm cho động vật sản xuất thực phẩm,

(ii) trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh này được gắn chèn vào trong các vị trí gắn chèn,

(iii) trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh này được liên kết theo kiểu hoạt động được với các trình tự khởi đầu.

10. Chế phẩm sinh miễn dịch chứa hai hay nhiều vector EHV theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 9.

11. Chế phẩm sinh miễn dịch theo phương án 10, trong đó chế phẩm sinh miễn dịch chưa hai vector EHV.

12. Chế phẩm sinh miễn dịch theo phương án 10, trong đó hai hay nhiều vector EHV chứa các trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh khác nhau.

13. Vacxin DIVA chứa một hoặc nhiều vector EHV theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 12.

14. Vector EHV, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vacxin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 13, trong đó vector EHV là vector tái tổ hợp.

15. Vector EHV, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vacxin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 14, trong đó vector EHV là RacH hoặc RacH SE.

16. Vector EHV, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vacxin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 14, trong đó vector EHV được chọn từ nhóm bao gồm EHV-1, EHV-3, EHV-4, EHV-8 và EHV-9.

17. Vector EHV, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vacxin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 16, trong đó vector EHV là EHV-1.

18. Vectơ EHV, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 17, trong đó động vật sản xuất thực phẩm là lợn.

19. Vectơ EHV, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 18, trong đó tác nhân gây bệnh lây nhiễm cho động vật sản xuất thực phẩm là virus cúm, tốt hơn là virus cúm lợn A.

20. Vectơ EHV, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 19, trong đó trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh là trình tự mã hóa hemagglutinin.

21. Vectơ EHV, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 20, trong đó trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh là trình tự mã hóa hemagglutinin và phân typ hemagglutinin của virus cúm được chọn từ nhóm bao gồm H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16, H17 và H18.

22. Vectơ EHV, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 21, trong đó trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh là trình tự mã hóa hemagglutinin và phân typ hemagglutinin của virus cúm là H1 và/hoặc H3.

23. Vectơ EHV, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 22, trong đó trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh là trình tự mã hóa hemagglutinin và kháng nguyên hemagglutinin cúm A có nguồn gốc từ lợn.

24. Vectơ EHV, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 23, trong đó vectơ EHV chứa ít nhất hai trình tự mã hóa kháng nguyên hemagglutinin của virus cúm.

25. Vectơ EHV, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 24, trong đó vectơ EHV chứa ít nhất là bốn trình tự mã hóa kháng nguyên hemagglutinin của virus cúm.

26. Vector EHV, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 25, trong đó vector EHV bao gồm bốn trình tự mã hóa kháng nguyên hemagglutinin của virus cúm.

27. Vector EHV, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 26, trong đó trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh là trình tự mã hóa hemagglutinin và trình tự mã hóa kháng nguyên hemagglutinin của virus cúm được chọn từ nhóm bao gồm A/swine/Italy/116114/2010(H1N2), A/swine/Italy/7680/2001(H3N2), A/swine/Gent/132/2005(H1N1), A/swine/Italy/4675/2003(H1N2), A/swine/Italy/259543/2003(H1N2), A/swine/Denmark/13772-1/2003(H1N1), A/swine/England/MD0040352R/2009(H1N1), A/swine/Hungary/13509/2007(H3N2), A/swine/Italy/13962/95(H3N2), A/swine/Cotes d'Armor/1121/00(H1N1), A/Swine/Colorado/ 1/77, A/Swine/Colorado/23619/99, A/Swine/Cote d'Armor/3633/84, A/Swine/England/ 195852/92, A/Swine/Finistere/2899/82, A/Swine/Hong Kong/10/98, A/Swine/Hong Kong/9/98, A/Swine/Hong Kong/81/78, A/Swine/Illinois/100084/01, A/Swine/Illinois/100085A/01, A/Swine/Illinois/21587/99, A/Swine/Indiana/1726/88, A/Swine/Indiana/9K035/99, A/Swine/Indiana/P12439/00, A/Swine/Iowa/30, A/Swine/Iowa/15/30, A/Swine/Iowa/533/99, A/Swine/Iowa/569/99, A/Swine/Iowa/3421/90, A/Swine/Iowa/8548-1/98, A/Swine/Iowa/930/01, A/Swine/Iowa/17672/88, A/Swine/Italy/1513-1/98, A/Swine/Italy/1523/98, A/Swine/Korea/CY02/02, A/Swine/Minnesota/55551/00, A/Swine/Minnesota/593/99, A/Swine/Minnesota/9088-2/98, A/Swine/Nebraska/1/92, A/Swine/Nebraska/209/98, A/Swine/Netherlands/12/85, A/Swine/North Carolina/16497/99, A/Swine/North Carolina/35922/98, A/Swine/North Carolina/93523/01, A/Swine/North Carolina/98225/01, A/Swine/Oedenrode/7C/96, A/Swine/Ohio/891/01, A/Swine/Oklahoma/18717/99, A/Swine/Oklahoma/18089/99, A/Swine/Ontario/01911-1/99, A/Swine/Ontario/01911-2/99, A/Swine/Ontario/41848/97, A/Swine/Ontario/97, A/Swine/Quebec/192/81, A/Swine/Quebec/192/91, A/Swine/Quebec/5393/91, A/Swine/Taiwan/7310/70, A/Swine/Tennessee/24/77, A/Swine/Texas/4199-2/98, A/Swine/Wisconsin/125/97, A/Swine/Wisconsin/136/97, A/Swine/Wisconsin/163/97, A/Swine/Wisconsin/164/97, A/Swine/Wisconsin/166/97, A/Swine/Wisconsin/168/97, A/Swine/Wisconsin/235/97, A/Swine/Wisconsin/238/97,

A/Swine/Wisconsin/457/985 A/Swine/Wisconsin/458/98, A/Swine/Wisconsin/464/98 và A/Swine/Wisconsin/14094/99.

28. Vector EHV, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 27, trong đó trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh là trình tự mã hóa hemagglutinin và trình tự mã hóa kháng nguyên hemagglutinin của virus cúm được chọn từ nhóm bao gồm A/swine/Italy/116114/2010(H1N2), A/swine/Italy/7680/2001(H3N2), A/swine/Gent/132/2005(H1N1) và A/swine/Italy/4675/2003(H1N2).

29. Vector EHV, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 28, trong đó trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh là trình tự mã hóa hemagglutinin và trình tự mã hóa kháng nguyên hemagglutinin của virus cúm mã hóa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28 và SEQ ID NO:29.

30. Vector EHV, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 29, trong đó trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh là trình tự mã hóa hemagglutinin và trình tự mã hóa kháng nguyên hemagglutinin của virus cúm bao gồm trình tự axit nucleic mã hóa trình tự axit amin với độ đồng nhất ít nhất là 70% với trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28 và SEQ ID NO:29.

31. Vector EHV, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 30, trong đó trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh là trình tự mã hóa hemagglutinin và trình tự mã hóa kháng nguyên hemagglutinin của virus cúm bao gồm trình tự axit nucleic mã hóa trình tự axit amin với độ đồng nhất ít nhất là 70%, ít nhất là 75%, ít nhất là 80%, ít nhất là 85%, ít nhất là 90%, ít nhất là 91%, ít nhất là 92%, ít nhất là 93%, ít nhất là 94%, ít nhất là 95%, ít nhất là 96%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% với trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28 và SEQ ID NO:29.

32. Vector EHV, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 31, trong đó trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh

là trình tự mã hóa N (neuraminidaza) và phân typ N được chọn từ nhóm bao gồm N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8, N9 và N10.

33. Vector EHV, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 32, trong đó vector EHV, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA không bao gồm trình tự mã hóa kháng nguyên N (neuraminidaza) virus cúm.

34. Vector EHV, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 33, trong đó vector EHV, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA không bao gồm trình tự mã hóa kháng nguyên NP (nucleoprotein) virus cúm.

35. Vector EHV, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 34, trong đó vector EHV bao gồm trình tự điều hòa bổ sung như tín hiệu kết thúc hoặc trình tự polyadenyl hóa.

Vị trí gắn chèn:

36. Vector EHV, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 4 đến 34, trong đó vị trí gắn chèn này là ORF1/3.

37. Vector EHV, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 4 đến 34, trong đó vị trí gắn chèn này là ORF70.

38. Vector EHV, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 37, trong đó trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh thứ nhất liên quan đến tác nhân gây bệnh lây nhiễm cho động vật sản xuất thực phẩm được gắn chèn vào trong ORF70.

39. Vector EHV, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 38, trong đó trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh thứ hai liên quan đến tác nhân gây bệnh lây nhiễm cho động vật sản xuất thực phẩm được gắn chèn vào trong ORF1/3.

40. Vector EHV, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 39, trong đó việc gắn chèn vào trong ORF70 được đặc trưng bởi xóa, cắt, thay thế, cải biến một phần hoặc tương tự trong ORF70, nhờ đó ORF71 vẫn giữ được chức năng.

41. Vector EHV, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vacxin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 40, trong đó việc gắn chèn vào trong ORF70 được đặc trưng bởi

- i) việc xóa một phần khoảng 801bp trong ORF70 đối với RacH (SEQ ID NO: 20) hoặc trình tự tương đồng và/hoặc đồng nhất 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% của nó, hoặc
- ii) việc gắn chèn vào trong ORF70 được đặc trưng bởi việc xóa một phần khoảng 801bp trong ORF70 đối với RacH (SEQ ID NO.: 20) hoặc xóa trình tự tương đồng và/hoặc đồng nhất 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% của nó trong chủng khác bất kỳ, hoặc
- iii) việc gắn chèn vào trong ORF70 được đặc trưng bởi việc xóa đoạn xóa khoảng 801bp trong ORF70 đối với chủng EHV-1 kiểu đại ab4 (mã số truy cập Genbank AY665713.1), nhờ đó phần bị xóa trong trình tự hệ gen ab4 kiểu đại được nằm giữa nucleotit 127681 và 128482 (SEQ ID NO.: 19) hoặc trình tự tương đồng và/hoặc đồng nhất 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% của nó hoặc
- iv) việc gắn chèn vào trong ORF70 được đặc trưng bởi việc xóa đoạn xóa khoảng 801bp trong ORF70 đối với chủng EHV-1 kiểu đại ab4 (mã số truy cập Genbank AY665713.1), nhờ đó phần bị xóa tron trình tự hệ gen ab4 kiểu đại được nằm giữa nucleotit 127681 và 128482 (SEQ ID NO.: 19) hoặc xóa trình tự tương đồng và/hoặc đồng nhất 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% của nó ở chủng khác bất kỳ.

42. Vector EHV, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vacxin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 41, trong đó vector EHV-1 bao gồm ít nhất một vùng chặn được chọn từ nhóm bao gồm: SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, và SEQ ID NO: 18 và trình tự tương đồng và/hoặc đồng nhất 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% của trình tự bất kỳ trong số các trình tự này.

43. Vector EHV, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 42, trong đó vector EHV-1 bao gồm (i) ít nhất một vùng chặn ORF70 trái được chọn từ nhóm bao gồm: SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, và SEQ ID NO: 17, và (ii) ít nhất một vùng chặn ORF70 phải được chọn từ nhóm bao gồm: SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, và SEQ ID NO: 18.

Vùng khởi đầu:

44. Vector EHV, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 3 và các phương án 7 đến 43, trong đó trình tự khởi đầu được chọn từ nhóm bao gồm: T lớn SV40, vùng khởi đầu gen sớm tức thời HCMV và MCMV 1, vùng khởi đầu alpha yếu tố kéo dài của người, vùng khởi đầu baculovirus polyhedrin, mảnh chức năng của 4pgG600 (SEQ ID NO:1), tốt hơn là mảnh chức năng này là p430 (SEQ ID NO:3), mảnh chức năng của trình tự nucleotit bổ sung của 4pgG600 (SEQ ID NO:1), mảnh chức năng của 4pMCP600 (SEQ ID NO:2), tốt hơn là mảnh chức năng này là p455 (SEQ ID NO:4), mảnh chức năng của trình tự nucleotit bổ sung của 4pMCP600 (SEQ ID NO:2).

45. Vector EHV, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 3 các phương án 7 đến 44, trong đó trình tự khởi đầu bao gồm 4pgG600 (SEQ ID NO:1) hoặc 4pMCP600 (SEQ ID NO:2) hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó hoặc mảnh chức năng hoặc dẫn xuất chức năng của nó hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó.

46. Vector EHV, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 4 đến 6 và 45, trong đó mảnh chức năng hoặc dẫn xuất của trình tự khởi đầu có độ tương đồng là 80%, 85%, tốt hơn là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, tốt hơn nữa là 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,9%.

47. Vector EHV, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 4 đến 6 và 45 hoặc 46, trong đó mảnh chức năng hoặc dẫn xuất của trình tự khởi đầu 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.

48. Vector EHV, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vacxin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 4 đến 6 và 45 đến 47, trong đó mảnh chức năng của trình tự khởi đầu là phần cắt của 4pgG600 (SEQ ID NO:1) hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó, tốt hơn là độ đồng nhất trình tự là (ít nhất là) 72% (hoặc lớn hơn) trên toàn bộ chiều dài.

49. Vector EHV, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vacxin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 4 đến 6 và 45 đến 48, trong đó mảnh chức năng của trình tự khởi đầu of 4pgG600 (SEQ ID NO:1) là mảnh được gọi là p430 (SEQ ID NO:3) hoặc trình tự có độ đồng nhất 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,9% với SEQ ID NO:3.

50. Vector EHV, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vacxin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 4 đến 6 và 45 đến 48, trong đó mảnh chức năng của trình tự khởi đầu là phần cắt của 4pMCP600 (SEQ ID NO:2) hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó, tốt hơn là độ đồng nhất trình tự là (ít nhất là) 78% trên toàn bộ chiều dài (hoặc cao hơn).

51. Vector EHV, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vacxin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 4 đến 6 và 45 đến 48, trong đó mảnh chức năng của trình tự khởi đầu của 4pMCP600 (SEQ ID NO:2) là mảnh được gọi là p455 (SEQ ID NO:4) hoặc trình tự có độ đồng nhất 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,9% với SEQ ID NO:4.

52. Vector EHV, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vacxin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 51, trong đó vector EHV bao gồm một hoặc nhiều further trình tự điều hòa như tín hiệu kết thúc, tín hiệu polyadenyl hóa hoặc yếu tố điều hòa như IRES và/hoặc peptit 2a.

Tổ hợp đặc thù của vùng khởi đầu và kháng nguyên:

53. Vector EHV, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vacxin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 52, trong đó trình tự khởi đầu 4pgG600 (SEQ ID NO:1) hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó hoặc mảnh chức năng hoặc dẫn xuất chức năng của nó hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó được liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự axit nucleic mã hóa trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất là 70%, ít nhất là 75%, ít

nhất là 80%, ít nhất là 85%, ít nhất là 90%, ít nhất là 91%, ít nhất là 92%, ít nhất là 93%, ít nhất là 94%, ít nhất là 95%, ít nhất là 96%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% với trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO: 28.

54. Vector EHV, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án 53, trong đó mảnh chức năng của trình tự khởi đầu 4pgG600 (SEQ ID NO:1) là mảnh được gọi là p430 (SEQ ID NO:3).

55. Vector EHV, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 54, trong đó trình tự khởi đầu 4pMCP600 (SEQ ID NO:2) hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó hoặc mảnh chức năng hoặc dẫn xuất chức năng của nó hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó được liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự axit nucleic mã hóa trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất là 70%, ít nhất là 75%, ít nhất là 80%, ít nhất là 85%, ít nhất là 90%, ít nhất là 91%, ít nhất là 92%, ít nhất là 93%, ít nhất là 94%, ít nhất là 95%, ít nhất là 96%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% với trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO: 27).

56. Vector EHV, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án 55, trong đó mảnh chức năng của trình tự khởi đầu 4pMCP600 (SEQ ID NO:2) là mảnh được gọi là 455p455 (SEQ ID NO:4).

57. Vector EHV, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 56, trong đó trình tự khởi đầu 4pgG600 (SEQ ID NO:1) hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó hoặc mảnh chức năng hoặc dẫn xuất chức năng của nó hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó được liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự axit nucleic mã hóa trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất là 70%, ít nhất là 75%, ít nhất là 80%, ít nhất là 85%, ít nhất là 90%, ít nhất là 91%, ít nhất là 92%, ít nhất là 93%, ít nhất là 94%, ít nhất là 95%, ít nhất là 96%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% với trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO: 28 và,

trong đó trình tự khởi đầu 4pMCP600 (SEQ ID NO:2) hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó hoặc mảnh chức năng hoặc dẫn xuất chức năng của nó hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó được liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự axit nucleic mã hóa trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất là 70%, ít nhất là 75%, ít nhất là 80%, ít nhất là 85%, ít nhất là 90%, ít nhất là 91%, ít nhất là 92%, ít nhất là 93%, ít nhất là 94%, ít nhất là 95%, ít nhất

là 96%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% với trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO: 27.

58. Vector EHV, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án 57, trong đó mảnh chức năng của trình tự khởi đầu 4pgG600 (SEQ ID số 1) là mảnh được gọi là p430 (SEQ ID NO:3) và, trong đó mảnh chức năng của trình tự khởi đầu 4pMCP600 (SEQ ID NO:2) là mảnh được gọi là 455p455 (SEQ ID NO:4).

59. Chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án 57 hoặc 58, trong đó chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA là nhị giá.

60. Vector EHV, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 59, trong đó trình tự khởi đầu 4pgG600 (SEQ ID NO:1) hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó hoặc mảnh chức năng hoặc dẫn xuất chức năng của nó hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó được liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự axit nucleic mã hóa trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất là 70%, ít nhất là 75%, ít nhất là 80%, ít nhất là 85%, ít nhất là 90%, ít nhất là 91%, ít nhất là 92%, ít nhất là 93%, ít nhất là 94%, ít nhất là 95%, ít nhất là 96%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% với trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO: 29.

61. Vector EHV, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án 60, trong đó mảnh chức năng của trình tự khởi đầu 4pgG600 (SEQ ID NO:1) là mảnh được gọi là p430 (SEQ ID NO:3).

62. Vector EHV, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 61, trong đó trình tự khởi đầu 4pMCP600 (SEQ ID NO:2) hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó hoặc mảnh chức năng hoặc dẫn xuất chức năng của nó hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó được liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự axit nucleic mã hóa trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất là 70%, ít nhất là 75%, ít nhất là 80%, ít nhất là 85%, ít nhất là 90%, ít nhất là 91%, ít nhất là 92%, ít nhất là 93%, ít nhất là 94%, ít nhất là 95%, ít nhất là 96%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% với trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO: 26.

63. Vector EHV, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án 62, trong đó mảnh chức năng của trình tự khởi đầu 4pMCP600 (SEQ ID NO:2) là mảnh được gọi là 455p455 (SEQ ID NO:4).

64. Vector EHV, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 63, trong đó trình tự khởi đầu 4pgG600 (SEQ ID NO:1) hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó hoặc mảnh chức năng hoặc dẫn xuất chức năng của nó hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó được liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự axit nucleic mã hóa trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất là 70%, ít nhất là 75%, ít nhất là 80%, ít nhất là 85%, ít nhất là 90%, ít nhất là 91%, ít nhất là 92%, ít nhất là 93%, ít nhất là 94%, ít nhất là 95%, ít nhất là 96%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% với trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO: 29, và

trong đó trình tự khởi đầu 4pMCP600 (SEQ ID NO:2) hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó hoặc mảnh chức năng hoặc dẫn xuất chức năng của nó hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó được liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự axit nucleic mã hóa trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất là 70%, ít nhất là 75%, ít nhất là 80%, ít nhất là 85%, ít nhất là 90%, ít nhất là 91%, ít nhất là 92%, ít nhất là 93%, ít nhất là 94%, ít nhất là 95%, ít nhất là 96%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% với trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO: 26).

65. Vector EHV, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án 64, trong đó mảnh chức năng của trình tự khởi đầu 4pgG600 (SEQ ID số 1) là mảnh được gọi là p430 (SEQ ID NO:3) và trong đó mảnh chức năng của trình tự khởi đầu 4pMCP600 (SEQ ID NO:2) là mảnh được gọi là 455p455 (SEQ ID NO:4).

66. Chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án 64 hoặc 65, trong đó chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA là nhị giá.

67. Vector EHV, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 66, trong đó chế phẩm sinh miễn dịch này bao gồm vector EHV thứ nhất chứa trình tự khởi đầu 4pgG600 (SEQ ID NO:1) hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó hoặc mảnh chức năng hoặc dẫn xuất chức năng của nó hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó được liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự axit nucleic mã hóa trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất là 70%, ít nhất là 75%, ít nhất là 80%, ít

nhất là 85%, ít nhất là 90%, ít nhất là 91%, ít nhất là 92%, ít nhất là 93%, ít nhất là 94%, ít nhất là 95%, ít nhất là 96%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% với trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO: 28 và,

trong đó trình tự khởi đầu 4pMCP600 (SEQ ID NO:2) hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó hoặc mảnh chức năng hoặc dẫn xuất chức năng của nó hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó được liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự axit nucleic mã hóa trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất là 70%, ít nhất là 75%, ít nhất là 80%, ít nhất là 85%, ít nhất là 90%, ít nhất là 91%, ít nhất là 92%, ít nhất là 93%, ít nhất là 94%, ít nhất là 95%, ít nhất là 96%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% với trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO: 27 và trong đó chế phẩm sinh miễn dịch này chứa vector EHV thứ hai bao gồm

trình tự khởi đầu 4pgG600 (SEQ ID NO:1) hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó hoặc mảnh chức năng hoặc dẫn xuất chức năng của nó hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó được liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự axit nucleic mã hóa trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất là 70%, ít nhất là 75%, ít nhất là 80%, ít nhất là 85%, ít nhất là 90%, ít nhất là 91%, ít nhất là 92%, ít nhất là 93%, ít nhất là 94%, ít nhất là 95%, ít nhất là 96%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% với trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO: 29, và

trong đó trình tự khởi đầu 4pMCP600 (SEQ ID NO:2) hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó hoặc mảnh chức năng hoặc dẫn xuất chức năng của nó hoặc trình tự nucleotit bổ sung của nó được liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự axit nucleic mã hóa trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất là 70%, ít nhất là 75%, ít nhất là 80%, ít nhất là 85%, ít nhất là 90%, ít nhất là 91%, ít nhất là 92%, ít nhất là 93%, ít nhất là 94%, ít nhất là 95%, ít nhất là 96%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% với trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO: 26.

68. Vector EHV, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vacxin DIVA theo phương án 67, trong đó mảnh chức năng của trình tự khởi đầu 4pgG600 (SEQ ID NO:1) là mảnh được gọi là p430 (SEQ ID NO:3) và trong đó mảnh chức năng của trình tự khởi đầu 4pMCP600 (SEQ ID NO:2) là mảnh được gọi là 455p455 (SEQ ID NO:4).

69. Chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án 67 hoặc 68, trong đó chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA là tứ giá.

70. Chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 69, trong đó chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA này được bào chế để dùng liều đơn.

71. Chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 70, trong đó chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA này được dùng trong cơ hoặc trong mũi.

72. Chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 71, trong đó chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA là an toàn với lợn trong vòng sáu tuần tuổi đầu tiên, trong vòng hai tuần tuổi đầu tiên, trong vòng tuần tuổi đầu tiên hoặc trong vòng ngày tuổi đầu tiên.

73. Chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 72, trong đó chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA còn bao gồm chất mang được dụng.

74. Chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án 73, trong đó chất mang được dụng này là nước dùng cho dung dịch tiêm, môi trường nuôi cấy tế bào hoặc chất đệm huyền phù lại.

75. Chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án 74, trong đó chất đệm huyền phù lại này là dung dịch muối đệm phosphat.

76. Chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 75, trong đó chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA chứa 1×10^4 đến 1×10^9 TCID₅₀, tốt hơn là trong khoảng từ 1×10^4 đến 1×10^8 TCID₅₀, còn tốt hơn nữa là 1×10^4 đến 1×10^7 TCID₅₀ vector EHV.

77. Chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 76, trong đó chế phẩm sinh miễn dịch này là vaccin.

78. Chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 77, trong đó chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA này là vaccin đa giá.

79. Chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 78, trong đó chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA này là vaccin nhị giá, vaccin tứ giá, vaccin 6 trong 1 hoặc vaccin 7 trong 1.

80. Chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 79, trong đó chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA này là vaccin nhị giá hoặc vaccin tứ giá.

81. Chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 80, trong đó chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA hữu hiệu trong điều trị và/hoặc phòng ngừa các dấu hiệu lâm sàng do virus cúm lợn A gây ra ở động vật sản xuất thực phẩm có nhu cầu.

82. Chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 81, trong đó chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA bảo vệ chống lại thử thách cùng loại và/hoặc khác loại bằng virus cúm lợn A.

83. Chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 82, trong đó chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA bảo vệ chống lại thử thách bằng virus cúm lợn A có kiểu huyết thanh H1 và/hoặc H3.

Bộ kit

84. Bộ kit bao gồm chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 2, 3, 5, 6 và 8 đến 83.

85. Bộ kit theo phương án 84, trong đó bộ kit này còn bao gồm tờ hướng dẫn điều trị và/hoặc phòng ngừa virus cúm lợn A.

Phương pháp điều trị

86. Phương pháp gây miễn dịch cho động vật sản xuất thực phẩm bao gồm bước dùng cho động vật sản xuất thực phẩm này chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 2, 3, 5, 6 và 8 đến 83.

87. Phương pháp điều trị hoặc điều trị dự phòng các dấu hiệu lâm sàng do virus cúm A gây ra ở động vật sản xuất thực phẩm có nhu cầu, phương pháp này bao gồm bước dùng cho động vật sản xuất thực phẩm lượng có tác dụng điều trị bệnh của chế phẩm sinh miễn

dịch hoặc vacxin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 2, 3, 5, 6 và 8 đến 83.

88. Phương pháp làm giảm nồng độ virus chuẩn trong phổi ở động vật sản xuất thực phẩm có nhu cầu, so với động vật sản xuất thực phẩm của nhóm đối chứng cùng loài không được chủng ngừa, phương pháp này bao gồm bước dùng cho động vật sản xuất thực phẩm lượng có tác dụng điều trị bệnh của chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vacxin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 2, 3, 5, 6 và 8 đến 83.

89. Phương pháp chủng ngừa cho động vật sản xuất thực phẩm có nhu cầu có kháng thể kháng virus cúm lợn A bao gồm bước dùng cho động vật sản xuất thực phẩm lượng có tác dụng điều trị bệnh của chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vacxin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 2, 3, 5, 6 và 8 đến 83.

90. Phương pháp tạo ra tính miễn dịch có nguồn gốc từ mẹ kháng virus cúm A ở động vật non sản xuất thực phẩm bao gồm việc dùng cho động vật mẹ của động vật non sản xuất thực phẩm lượng có tác dụng điều trị bệnh của chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vacxin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 2, 3, 5, 6 và 8 đến 83 trong khi động vật mẹ đang mang thai động vật non sản xuất thực phẩm này.

91. Phương pháp tạo ra sự bảo vệ gia tăng chống nhiễm virus cúm A ở động vật non sản xuất thực phẩm có nhu cầu, trong đó

- a) động vật mẹ của động vật non sản xuất thực phẩm được chủng ngừa bằng lượng có tác dụng điều trị bệnh của chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vacxin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 2, 3, 5, 6 và 8 đến 83 trong khi động vật mẹ đang mang thai động vật non sản xuất thực phẩm này và/hoặc
- b) động vật non sản xuất thực phẩm này được chủng ngừa bằng lượng có tác dụng điều trị bệnh của chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vacxin DIVA trong vòng ba tuần tuổi.

92. Chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vacxin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 2, 3, 5, 6 và 8 đến 83 để sử dụng trong phương pháp gây miễn dịch động vật sản xuất thực phẩm, phương pháp này bao gồm bước dùng cho động vật sản xuất thực phẩm lượng có tác dụng điều trị bệnh của chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vacxin DIVA này.

93. Chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 2, 3, 5, 6 và 8 đến 83 để sử dụng trong phương pháp điều trị hoặc điều trị dự phòng các dấu hiệu lâm sàng do virus cúm A gây ra ở động vật sản xuất thực phẩm có nhu cầu, phương pháp này bao gồm bước dùng cho động vật sản xuất thực phẩm lượng có tác dụng điều trị bệnh của chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA này.

94. Chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 2, 3, 5, 6 và 8 đến 83 để sử dụng trong phương pháp làm giảm nồng độ virus chuẩn trong phổi ở động vật sản xuất thực phẩm có nhu cầu, so với động vật sản xuất thực phẩm của nhóm đối chứng cùng loài không được chủng ngừa, phương pháp này bao gồm bước dùng cho động vật sản xuất thực phẩm lượng có tác dụng điều trị bệnh của chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA này.

95. Chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 2, 3, 5, 6 và 8 đến 83 để sử dụng trong phương pháp chủng ngừa cho động vật sản xuất thực phẩm có nhu cầu có kháng thể kháng virus cúm lợn A, phương pháp này bao gồm bước dùng cho động vật sản xuất thực phẩm lượng có tác dụng điều trị bệnh của chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA này.

96. Chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 2, 3, 5, 6 và 8 đến 83 để sử dụng trong phương pháp tạo ra tính miễn dịch có nguồn gốc từ mẹ kháng virus cúm A ở động vật non sản xuất thực phẩm bao gồm việc dùng cho động vật mẹ của của động vật non sản xuất thực phẩm này lượng có tác dụng điều trị bệnh của chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA trong khi động vật mẹ đang mang thai động vật non sản xuất thực phẩm này.

97. Chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 2, 3, 5, 6 và 8 đến 83 để sử dụng trong phương pháp tạo ra sự bảo vệ gia tăng kháng nhiễm virus cúm A ở động vật non sản xuất thực phẩm có nhu cầu, trong đó

- a) động vật mẹ của của động vật non sản xuất thực phẩm được chủng ngừa bằng lượng có tác dụng điều trị bệnh của chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 2, 3, 5, 6 và 8 đến 83 trong khi động vật mẹ đang mang thai động vật non sản xuất thực phẩm và/hoặc

b) động vật non sản xuất thực phẩm này được chủng ngừa bằng lượng có tác dụng điều trị bệnh của chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA trong vòng ba tuần tuổi.

98. Phương pháp hoặc sử dụng theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 86 đến 97, trong đó động vật sản xuất thực phẩm là lợn, lợn con hoặc lợn nái.

99. Phương pháp hoặc sử dụng theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 86 đến 98, trong đó virus cúm A là virus cúm lợn A.

100. Phương pháp hoặc sử dụng theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 86 đến 99, trong đó chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA được dùng một lần.

101. Phương pháp hoặc sử dụng theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 86 đến 100, trong đó chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA được dùng cho động vật sản xuất thực phẩm trong vòng sáu tuần tuổi đầu tiên, trong vòng hai tuần tuổi đầu tiên, trong vòng tuần tuổi đầu tiên hoặc trong vòng ngày tuổi đầu tiên.

102. Phương pháp hoặc sử dụng theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 86 đến 101, trong đó chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA được dùng với hai liều.

103. Phương pháp hoặc sử dụng theo phương án 102, trong đó chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA được dùng cho động vật sản xuất thực phẩm trong tuần tuổi đầu tiên và lần thứ hai trong vòng tuần tuổi thứ hai, ba hoặc bốn.

104. Phương pháp hoặc sử dụng theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 86 đến 103, trong đó chế phẩm sinh miễn dịch vaccin DIVA này được dùng trong cơ hoặc trong mũi.

105. Phương pháp hoặc sử dụng theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 86 đến 88 và 92 đến 94 và 98 đến 104, trong đó động vật sản xuất thực phẩm là âm tính với kháng thể kháng virus cúm lợn A.

106. Phương pháp hoặc sử dụng theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 86 đến 104, trong đó động vật sản xuất thực phẩm dương tính với kháng thể kháng virus cúm lợn A.

107. Phương pháp hoặc sử dụng theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 86 đến 106, trong đó chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA chứa 1×10^4 đến 1×10^7 TCID₅₀ vectơ EHV.

108. Phương pháp hoặc sử dụng theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 86 đến 107, trong đó phương pháp này đạt được sự cải thiện về các thông số hiệu quả được chọn từ nhóm bao gồm: giảm sự giảm thể trọng, tải lượng virus trong phổi giảm, giảm tổn thương phổi, giảm và/hoặc rút ngắn sự phát tán virus, giảm nhiệt độ trực tràng, giảm các triệu chứng lâm sàng (cụ thể là các triệu chứng rối loạn hô hấp), tăng sự cảm ứng (trung hòa) kháng thể kháng virus cúm lợn A, tăng kích thích tế bào T kháng virus cúm lợn A, tăng kích thích tế bào B kháng virus cúm lợn A, và giảm cytokin tiền viêm, ví dụ IL1 β , trong phổi, hoặc tổ hợp của các thông số này, so với động vật sản xuất thực phẩm của nhóm đối chứng cùng loài không được chủng ngừa.

109. Phương pháp hoặc sử dụng theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 86 đến 108, trong đó điều trị hoặc điều trị dự phòng dẫn đến làm giảm giai đoạn mang virus so với động vật thuộc nhóm đối chứng cùng loài không được điều trị.

110. Phương pháp hoặc sử dụng theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 86 đến 109, trong đó điều trị hoặc điều trị dự phòng dẫn đến việc làm giảm sự phát tán của virus cúm A từ ngày 1 sau khi thử thách (lây nhiễm).

111. Phương pháp hoặc sử dụng theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 86 đến 110, trong đó chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA bảo vệ chống lại thử thách cùng loại và/hoặc khác loại bằng virus cúm A.

112. Phương pháp hoặc sử dụng theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 86 đến 111, trong đó chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA bảo vệ chống lại thử thách bằng virus cúm A có kiểu huyết thanh H1 và/hoặc H3.

Yêu cầu bảo hộ dạng Swiss và các cách viết khác

113. Vectơ EHV, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 2, 3, 5, 6 và 8 đến 83 để sử dụng cho mục đích trị liệu.

114. Vector EHV, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 2, 3, 5, 6 và 8 đến 83 để sử dụng làm chất sinh miễn dịch hoặc vaccin.

115. Vector EHV, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 2, 3, 5, 6 và 8 đến 83 để dùng làm thuốc.

116. Sử dụng vector EHV, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 2, 3, 5, 6 và 8 đến 83 để sản xuất thuốc.

117. Sử dụng vector EHV, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 2, 3, 5, 6 và 8 đến 83 để điều trị và/hoặc phòng ngừa nhiễm virus cúm lợn A ở động vật sản xuất thực phẩm.

DIVA

118. Phương pháp phân biệt động vật sản xuất thực phẩm bị nhiễm virus cúm lợn A với động vật sản xuất thực phẩm được chủng ngừa bằng chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin DIVA theo phương án bất kỳ trong số các phương án 2, 3, 5, 6 và 8 đến 83, bao gồm

- a) lấy mẫu từ động vật sản xuất thực phẩm, và
- b) phân tích mẫu này bằng thử nghiệm miễn dịch và/hoặc thử nghiệm phân tích bộ gen.

119. Phương pháp theo phương án 118, trong đó thử nghiệm miễn dịch bao gồm thử nghiệm xem mẫu chứa kháng thể có nhận diện đặc hiệu protein N (neuraminidaza) hoặc protein NP (nucleoprotein) của virus cúm lợn hay không.

120. Phương pháp theo phương án 118 hoặc 119, trong đó động vật sản xuất thực phẩm bị nhiễm virus cúm lợn A nếu kháng thể nhận diện đặc hiệu protein N (neuraminidaza) hoặc protein NP (nucleoprotein) của virus cúm lợn được phát hiện.

121. Phương pháp theo phương án 118, trong đó thử nghiệm phân tích bộ gen bao gồm việc thử nghiệm xem mẫu có bao gồm trình tự đặc hiệu virus cúm lợn A mã hóa N (neuraminidaza) và/hoặc NP (nucleoprotein) hay không.

122. Phương pháp theo phương án 118 hoặc 121, trong đó động vật sản xuất thực phẩm bị nhiễm virus cúm lợn A nếu trình tự đặc hiệu virus cúm lợn A mã hóa N (neuraminidaza) và/hoặc NP (nucleoprotein) được phát hiện.

123. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 118 đến 122, trong đó thử nghiệm miễn dịch là EIA (thử nghiệm miễn dịch enzym) hoặc ELISA (thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym), hoặc, trong đó thử nghiệm phân tích bộ gen là PCR (phản ứng chuỗi polymeraza), RT-PCR (phản ứng chuỗi polymeraza enzym phiên mã ngược) hoặc PCR thời gian thực (phản ứng chuỗi polymeraza).

124. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 118 đến 123, trong đó động vật sản xuất thực phẩm là lợn.

125. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 118 đến 124, trong đó mẫu là mẫu huyết thanh.

126. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 118 đến 125, trong đó ELISA là ELISA gián tiếp, ELISA kiểu bánh kẹp, ELISA cạnh tranh hoặc ELISA phong bế. Tổng quan các trình tự:

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

Vùng 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 p430
SEQ ID NO: 4	Trình tự axit desoxyribonucleic 449bp	EHV-4 p455
SEQ ID NO: 5	Đoạn môi 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 gắn chèn:

SEQ ID NO: 9	Đoạn mồi PCR axit nucleic trình tự nhân tạo 1017 cho vùng gắn chèn orf70
SEQ ID NO: 10	Đoạn mồi PCR axit nucleic trình tự nhân tạo 1018 cho vùng gắn chèn orf70
SEQ ID NO: 11	Đoạn mồi PCR axit nucleic trình tự nhân tạo 1007 cho vùng gắn chèn orf1/3
SEQ ID NO: 12	Đoạn mồi PCR axit nucleic trình tự nhân tạo 1008 cho vùng gắn chèn orf1/3
SEQ ID NO: 13	Vùng chặn trái (Up70) (417 bp)
SEQ ID NO: 14	Vùng chặn phải (Up71) (431 bp)
SEQ ID NO: 15	Vùng chặn trái (up orf70) ở chủng <u>EHV-1 kiểu đại ab4</u> (mã số truy cập Genbank AY665713.1), được nằm ở các nucleotit 127264 – 127680
SEQ ID NO: 16	Vùng chặn phải (up orf71) trong chủng <u>EHV-1 kiểu đại ab4</u> (mã số truy cập Genbank AY665713.1), được nằm ở các nucleotit 128484 – 128913
SEQ ID NO: 17	Vùng chặn bị cắt trong <u>hệ thống RED</u> : vùng chặn trái (Up70) (283 bp) = giống với ở 283 bp đầu 3' của vùng chặn “cổ điển” 417 bp
SEQ ID NO: 18	Vùng chặn bị cắt trong <u>hệ thống RED</u> : vùng chặn phải (Up71) (144 bp) = giống với 144 bp đầu 5' của vùng chặn “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

*Axit amin 531 (X, codon kết thúc, được thay đổi thành I):

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 trệch ra khỏi tinh thần và phạm vi bảo hộ của sáng chế.

Ví dụ 1: Tạo ra vị trí gắn chèn ORF70 mới

Để tăng cường khả năng của vector EHV-1, các tác giả sáng chế đã nỗ lực tìm ra cách để biểu hiện hai gen chuyển khác nhau từ một khung vector mà không ghép cặp hai gen chuyển này bằng các chức năng có nguồn gốc từ ARN-virut dưới sự kiểm soát của một vùng khởi đầu. Các tác giả sáng chế đã giả thiết rằng hệ gen của virut herpes có thể chịu

được việc sử dụng song song hai vị trí gắn chèn gen chuyển độc lập. Để xác định EHV-1 ORF70 có phải là vị trí gắn chèn gen chuyển thích hợp hay không, 801 cặp bazơ của đầu 5' của orf70 (1236 bp) được thay thế bằng cat-xet biểu hiện mã hóa cho protein mCherry tự phát huỳnh quang (Shaner et al. 2004) bằng cách tái tổ hợp tương đồng cổ điển (Fig. 1B). Bản đồ của plasmit pU-mC70-BGH được thể hiện trên Fig. 2 (SEQUENCE ID NO. 21). Mảnh ADN được sử dụng để tái tổ hợp tương đồng được cắt từ pU-mC70-BGH bằng XbaI. Mảnh được tinh chế bằng gel được chuyển nhiễm đồng thời bằng ADN bộ gen virus của EHV-1 RaCH vào trong các tế bào RK13. Việc tách khỏi có hiệu quả vector virus tái tổ hợp và sao chép hiệu quả trong tế bào được nuôi cấy được thể hiện bằng mức phát huỳnh quang sống và xác định nồng độ virus chuẩn (không được thể hiện). Việc xóa hai phần ba orf70 có lợi ích bổ sung là sự biểu hiện của glycoprotein G được mã hóa bởi orf70 được loại bỏ. Glycoprotein G của EHV-1 đã thể hiện là chemokine được tiết không có cấu trúc gắn kết protein làm mất tác dụng đáp ứng miễn dịch của vật chủ (Drummer et al., 1998; Bryant et al., 2003). Do vector vaccine được dự định để kích thích đáp ứng miễn dịch của đối tượng được chủng vaccine, việc loại bỏ chức năng ức chế miễn dịch cụ thể này của vector virus có thể cải thiện thêm hiệu lực của nền vector virus EHV-1 RaCH-SE.

Ví dụ 2: Nhận biết và tạo cấu trúc các vùng khởi đầu mới

Quy trình nhận biết các vùng khởi đầu thích hợp như sau: Mảnh 600 bp của trình tự EHV-4 ngược chiều 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 capsid chính (major capsid protein - MCP), và orf70 mã hóa glycoprotein G (gG). Protein capsid chính là một trong các thành phần phong phú nhất của virion và cần thiết cho việc lắp ráp các capsid trong nhân tế bào ngay khi ADN virus mới được tổng hợp đã sẵn sàng để đóng gói. Vì thế vùng 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 vùng khởi đầu MCP giả định và 82,3% đối với vùng 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 vùng khởi đầu, các mảnh ADN 600bp 4pgG600

GCAGACTTTGGAGCAGCACAATTTCCGGTTGTGGACCCCATGGACCTT
GGTTTGGCTGGTACCGTGGAATAACGCTCCGGAAGTTTTGGCCAGAGCAA
AATACAATTCTGAAGGTAGACATATGGAGCGCCGGAATAGTTCTGTTTGAAAT
GCTCGCATATCCATCAACTCTATTTGAGGACCCGCCGAGTACCCCAACAAGAG
TATGTAAAAAGCTGTCATTCTCAACTACTGAGAATAATATCAAAGCTAAAGA
TAAACCCTGAGGAGTTTCCACGGGAACCAGAGTCTAGGCTCGTGCGCGGATA
CATCGAATACGCCAGCCTAGAGCGTAAGCCACATACGCGCTATCCTTGCTTC
CAGCGCGTGAACCTACACATTGACGGGGAATTTTTGATCCATAAAATGCTAG
CGTTCAATGCTGCGATGCGCCCATCCGCAGAAGAGTTGTTGTCCTACCCAATG
TTTATGAATCTGTAGGATGACTAACAGATTTGGGGTGGAGACGGCGTGGGCG
ATACTGTATAAAGTTGTACTACTTACCAGCCCAGTCAGTGTGCTGTAGTGCCA
CCACCTGTAAAGCTGTGATAAGCTGCAGTT (SEQ ID NO:1)

và 4pMCP600

AGCTGGGGGAGTTTGTACTATAGTGTATTACATGCGGCTTGCAATAAC
TGCCTGGTTTATGTTTCGCAACATTCAAGCAGACATGCTACCGCTAAACACTT
TGCAACAATTTTTTATTGGGTGTTTGGCCTTTGGTAGAACTGTCGCGTTTTTGG
TGGTAGCATATACTACCTTATTTATACGCTCCGAGCTGTTTTTCAGCATGCTA
GCACCCAACGCCGAGCGAGAGTATATAACTCCCATCATTGCCCAACAAGCTTA
TGCCACTTATTAGCGTCCGCTCTGCCGTTTGCTTAGTCATAATATCTACCGCC
GTTTACGCAGCAGACGCTATCTGCGACACAATTGGATTTGCGATACCGCGCA
TGTGGATGTGTATTTTAATGAGATCAACCTCCATGAAGCGTAACTAGGGGGC
CTCCCACTGAGGCACTACCGGCTTAGCAGCTGACTAACACAGTATAAAACGT
GAGAAGAAATCAGTCTCATGCGCCATTAGCGCTAGGCTAGTTAGCGTGGAGG
ACCGGAGCGCTACCGCCAGCAGTTTCATCCGCCTGGTTACGGGTTTGTTAACA
CCTACCGGTGTTTTACCGCTACCATA (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.

Được sử dụng làm đối chứng dương vùng 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 vùng khởi đầu CMV là rõ ràng ở những thời điểm khác nhau sau khi chuyển nhiễm. Vùng khởi đầu 4pgG600 cũng có hoạt tính sau khi chuyển nhiễm, hoạt tính của vùng khởi đầu 4pMCP600 cũng được phát hiện, nhưng ít khi được so sánh với vùng khởi đầu 4pgG600 và thậm chí nhiều hơn khi so sánh với vùng khởi đầu CMV thậm chí ba ngày sau khi chuyển nhiễm.

Để điều kiểm tra hiệu quả của hoạt tính vùng 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 vùng 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 vùng 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, vùng 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 vùng khởi đầu 600 bp được cắt đến 430 bp đối với 4pgG, có tên mới là: **p430:**

TCTATTTGAGGACCCGCCGAGTACCCCAACAAGAGTATGTAAAAAGCTGTCAT

TCTCAACTACTGAGAATAATATCAAAGCTAAAGATAAACCCCTGAGGAGTTTC
CACGGGAACAGAGTCTAGGCTCGTGCGCGGATACATCGAATACGCCAGCCT
AGAGCGTAAGCCACATACGCGCTATCCTTGCTTCCAGCGCGTGAACCTACAC
ATTGACGGGGAATTTTTGATCCATAAAATGCTAGCGTTCAATGCTGCGATGC
GCCCATCCGCAGAAGAGTTGTTGTCCTACCCAATGTTTATGAATCTGTAGGAT
GACTAACAGATTTGGGGTGGAGACGGCGTGGGCGATACTGTATAAAGTTGTA
CTACTTACCAGCCCAGTCAGTGTGCTGTAGTGCCACCACCTGTAAAGCTGTGA
TAAGCTGCAGTT (SEQ ID NO:3)

và đến 449 bp đối với 4pMCP, có tên mới là: p455:
TTGGTGGTAGCATATACTACCTTATTTATACGCTCCGAGCTGTTTTTCAGCAT
GCTAGCACCCAACGCCGAGCGAGAGTATATAACTCCCATCATTGCCACACAAG
CTTATGCCACTTATTAGCGTCCGCTCTGCCGTTTGCTTAGTCATAATATCTACC
GCCGTTTACGCAGCAGACGCTATCTGCGACACAATTGGATTTGCGATACCGC
GCATGTGGATGTGTATTTAATGAGATCAACCTCCATGAAGCGTAACTAGGG
GGCCTCCCCTGAGGCACTACCGGCTTAGCAGCTGACTAACACAGTATAAAA
CGTGAGAAGAAATCAGTCTCATGCGCCATTAGCGCTAGGCTAGTTAGCGTGG
AGGACCGGAGCGCTACCGCCAGCAGTTTCATCCGCCTGGTTACGGGTTTGTT
AACACCTACCGGTGTTTTACCGCTACCATA (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 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 vùng khởi đầu 4pMCP600 làm tăng mạnh hoạt tính của nó trong khi việc chuyển hoạt vùng khởi đầu 4pgG600 cũng quan sát thấy nhưng ít rõ rệt hơn.

Ngoài hai vùng khởi đầu mới trình tự polyA mới cũng cần cho việc biểu hiện từ vị trí gắn chèn orf70 mới. Yếu tố 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 gắn chèn orf70 trong pRacH-SE.

Tiếp theo, rEHV-1 RacH-SE được tạo ra để thử nghiệm hoạt tính vùng khởi đầu trong nền của sự sao chép của virus (Bảng 1). Hai vùng khởi đầu EHV-4 (p430 và p455), các vùng khởi đầu CMV và vùng khởi đầu IE1 của cytomegalovirus ở chuột nhắt (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. Vùng 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 gắn chèn 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>	<i>Vị trí gắn chèn Orf1/3</i>			<i>Vị trí gắn chèn Orf70</i>		
	<i>Trình tự khởi đầu</i>	<i>gen thông báo</i>	<i>polyA</i>	<i>Trình tự khởi đầu</i>	<i>gen 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. (multiplicity of infection - tỷ lệ gây nhiễm) là 1. Các tế bào bị nhiễm được thu gom lúc 0, 4, 8, và 12 giờ 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)) mà 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 $t_1 = 4\text{h p.i.}$, $t_2 = 8\text{h p.i.}$, và $t_3 = 12\text{h p.i.}$, không từ các mẫu được tạo ra lúc $t_0 = 0\text{h p.i.}$ 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 (cycle threshold - ngưỡng chu kỳ) 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 thế, quá trình phiên mã của mCherry được định lượng theo thời gian sau khi nhiễm và cho các virus khác nhau (Fig. 3).

Như được thể hiện trên Fig. 3a 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 lần 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 giống nhau cũng đủ để khẳng định chất lượng của thí nghiệm, cũng là 12 h p.i. kết quả thời gian (sau lây nhiễm) là hợp lệ vì việc giảm so với 8 h p.i. cho thấy sự gia tăng hơn nữa về số lượng sản phẩm phiên mã chỉ có thể có khi quá trình sao chép chưa vượt quá mức tối đa. 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. 3b. 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 vùng 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 gắn chèn của chúng hoặc poly A (BGH hoặc 71pA) đã sử dụng, hoạt tính của vùng khởi đầu CMV- và MCMV cao hơn trong tế bào PK/WRL. Trong các tế bào VERO-EU, chỉ có vùng khởi đầu MCMV đã thể hiện là có hoạt tính cao hơn, vùng khởi đầu CMV không vượt trội so với vùng khởi đầu EHV.

Từ các thử nghiệm này có thể kết luận rằng vùng 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 gắn chèn từ các vị trí gắn chèn orf1/3 và orf70.

Ví dụ 3: Sử dụng vùng khởi đầu p455 trong vacxin vector EHV-1 tái tổ hợp và tạo cấu trúc virus tái tổ hợp

Vùng khởi đầu p455:

Đối với thử nghiệm trên động vật thử nhất hemagglutinin virus cúm phân typ H3 từ virus cúm A có nguồn gốc từ lợn (A/swine/Italy/7680/2001(H3N2), số truy cập GenBank: ABS50302.2), SEQ ID NO:27 được sử dụng. Trình tự mã hóa của nó được tổng hợp và được tạo dòng phụ vào vector chuyển pU70-p455-71K71 (Fig. 5) tạo ra vector chuyển pU70-p455-H3-71K71, đặt H3 dưới sự kiểm soát của trình tự khởi đầu mới p455 và tín hiệu polyadenyl hóa mới 71pA và đóng khung cat-xet bằng vùng tái tổ hợp để gắn chèn vào trong orf70 (Fig. 6).

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 gắn chèn trong orf70 của pRacH-SE để tạo ra pRacH-SE70-p455-H3 (Fig. 7).

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 gắn chèn chính xác cat-xet biểu hiện được xác nhận bằng cách giải trình tự sản phẩm PCR độ trung thực cao của vùng gắn chèn. 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. 8).

Việc khôi phục orf71 mã hóa EHV-1 gpII được khẳng định bằng IFA (không được thể hiện) và thẩm tách Western (Fig. 9) 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 bằng cách sử dụng 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 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. 9), ở P10 và P20 bổ sung IFA, và sự biểu hiện HA và độ ổn định di truyền của đoạn gắn chèn mã hóa HA cùng với vùng khởi đầu và trình tự polyA được khẳng định.

Hai điểm được thể hiện trên Fig. 9 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 virus cúm có phân typ 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 thẩm 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 virus 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 4: Chứng minh nghiên cứu trên động vật khái niệm (POC I) bằng cách sử dụng vùng 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 EHV1 vectơ vaccin	10	trong cơ	2 ml NaCl; 2 ml EHV1, $1,00 \times 10^7$ TCID ₅₀
2	2x EHV1 vectơ vaccin	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 bất hoạt	10	trong cơ	2x 2 ml Inact.
5	2x NaCl	10	trong cơ	2x 2 ml NaCl
Nhóm	Điều trị thử thách	Số con vật	Đường dùng	Liều
1	Virus cúm A H3N2 từ lợn	10	Trong khí quản	8 ml; $1,00 \times 10^7$ TCID ₅₀ /ml
2	virus cúm A H3N2 từ lợn	10	Trong khí quản	8 ml; $1,00 \times 10^7$ TCID ₅₀ /ml
3	virus cúm A H3N2 từ lợn	10	Trong khí quản	8 ml; $1,00 \times 10^7$ TCID ₅₀ /ml
4	virus 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)	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 (IAV) (cúm A H3N2 từ lợn R452-14, thể phân lập thử thách do BI sở hữu). Trong khi Nhóm đối chứng lây nhiễm không được chủng ngừa (Chall ctrl) tất cả các con lợn có nồng độ virus cúm chuẩn 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 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 IAV 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 IAV 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. 10).

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, phân typ H3N2. Chứng tỏ được rằng vector EHV-1 RacH-SE thích hợp để chủng ngừa cho lợn và vùng 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 5: Sử dụng vùng khởi đầu p430 trong vaccin vector EHV-1 tái tổ hợp và tạo cấu trúc virus tái tổ hợp

Vùng khởi đầu p430:

Vùng 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), SEQ ID NO:28. Do gen hemagglutinin trong thể phân lập virus này là từ IAV lợn của IAV loại “gia cầm” nó được gọi là H1av. H1av được tổng hợp

và tạo dòng phụ trong vector chuyển đổi với vùng gắn chèn orf1/3, pU1/3-p430-BGH_K_BGH (Fig. 11) để tạo ra pU1/3-p430-H1av-BGH_K_BGH. Việc biểu hiện của H1av được đặt dưới sự kiểm soát của vùng khởi đầu p430 và tín hiệu polyA hormon tăng trưởng bò (BGH) (Fig. 12).

Bằng cách gây đột biến *en-passant* sử dụng hệ thống tái tổ hợp RED (Tischer et al. 2006) cat-xet biểu hiện p430-H1av-BGH được gắn chèn trong orf1/3 của pRacH-SE để tạo ra pRacH-SE1/3-p430-H1av (Fig. 13).

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 gắn chèn chính xác cat-xet biểu hiện được xác nhận bằng cách giải trình tự sản phẩm PCR độ trung thực cao của vùng gắn chèn. 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. 14).

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 (sở hữu của BI), (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. 14).

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 trime HA chức năng trên tế bào của tế bào bị nhiễm vector EHV-1.

Ví dụ 6: Sử dụng hai vùng khởi đầu mới p455 và p430 trong vacxin vector EHV-1 tái tổ hợp trong hai các vị trí gắn chèn song song

Để thể hiện rằng hai vùng 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 phân typ 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 gắn chèn 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-BGHKBGH (Fig. 12) được gắn chèn vào trong vị trí gắn chèn 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-SE1/3-p430-H1av-70-p455-H3, và virus tái tổ hợp rEHV-1 RacH-SE1/3-p430-H1av-70-p455-H3 được tách khỏi và được tinh chế vết tan hai lần (Fig. 15).

Tên gọi ngắn của virus tái tổ hợp này là rEHV-1 RacH-SE_B. Việc gắn chèn chính xác cat-xet biểu hiện được xác nhận bằng cách giải trình tự sản phẩm PCR độ trung thực cao của các vùng gắn chèn cùng với các trình tự chặn. 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. 16). 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. 16).

Như được thể hiện trên Fig. 16 cả hai gen chuyển H3 và H1av được biểu hiện song song trong nuôi cấy tế bào bị nhiễm rEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1av-70-p455-H3 tái tổ hợp gắn chèn 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 vùng khởi đầu mới p430 và p455 được thể hiện là có chức năng trong phạm vi 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 vùng 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 tác nhân gây bệnh khác nhau của hai vùng khởi đầu mới này trong hai vị trí gắn chèn 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 7: Tạo ra, mô tả đặc điểm in vitro và thử nghiệm in vivo vaccine virus cúm A được tạo vector EHV-1 đơn giá (vaccine 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. Vaccine 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 vaccine 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 vùng khởi đầu p455 và tín hiệu polyadenyl hóa mới 71pA và đóng khung cat-xet bằng các vùng tái tổ hợp để gắn chèn vào trong orf70 (Fig. 1B).

Bằng cách gây đột biến *en-passant* sử dụng hệ thống tái tổ hợp RED cat-xet biểu hiện p455-H3-71 được gắn chèn 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. 7).

Việc gắn chèn chính xác cat-xet biểu hiện được xác nhận bằng cách giải trình tự sản phẩm PCR độ trung thực cao của vùng gắn chèn. 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. 8) và thâm tách Western (Fig. 9) 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 thâm tách Western (Fig. 9) 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 P5, P10, P15, và P20 virus được mô tả đặc điểm bằng cách xác định nồng độ chuẩn, giải trình tự, và thâm tách Western (Fig. 9), ở P10 và P20 bổ sung IFA, và sự biểu hiện HA và độ ổn định di truyền của đoạn gắn chèn mã hóa HA cùng với vùng khởi đầu và trình tự polyA được khẳng định.

Hai điểm được thể hiện trên Fig. 9 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 virus cúm có phân typ H3 (phải). gpII được phát hiện ở tất cả các giống nuôi cấy tế bào bị nhiễm EHV-1 tái tổ

hợp như kỳ vọng. 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 virus cúm từ virus phân typ H1, xem dưới đây, Fig. 16.

Bằng thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang kép (dIFA) vết tan virus 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 ngựa. Cụ thể, lợn con không có tính miễn dịch có nguồn gốc từ mẹ kháng IAV lợn (không có kháng thể từ mẹ) được chủng ngựa hai lần bằng dịch nổi môi trường nuôi cấy tế bào chứa RacH-SE-70-p455-H3 ở liều là 1×10^7 TCID₅₀ trong cơ ở độ tuổi hai và năm tuần (chủng ngựa hai mũi, 2x EHV-1), hoặc chỉ ở độ tuổi năm tuần tuổi (chủng ngựa một mũi, 1x EHV-1). Nhóm không được chủng ngựa được sử dụng làm đối chứng âm và nhóm động vật được chủng ngựa lúc hai và năm tuần tuổi bằng vaccin IAV lợn bất hoạt có bán trên thị trường theo hướng dẫn của nhà sản xuất (nhưng trong các thời điểm chủng ngựa) 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 virus 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 ngựa và không thử thách được sử dụng làm đối chứng âm, trong khi các động vật không được chủng ngựa ngoài các động vật thử thách được sử dụng làm đối chứng lây nhiễm. Tại thời điểm và sau khi chủng ngựa 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. 17).

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. 18).

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. 10).

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. 19).

Khi xác định lượng xytokin tiền viêm IL- 1β trong BALF từ các động vật vào 1 hoặc 3 ngày sau khi thử thách IAV lợn, mức IL- 1β 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. 20). 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 (PBMC) được lấy mẫu vào ngày thử nghiệm cứu 28 và sử dụng các kích thích khác nhau, việc kích thích PBMC 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. 21 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. 21 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 PBMC (mức số lượng là $75/1 \times 10^6$ hoặc thấp hơn) khi NP IAV lợn tái tổ hợp được sử dụng (Fig. 21 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 vaccin RacH-SE-70-p455-H3 biểu hiện H3 IAV lợn được sử dụng, tương ứng (Fig. 21 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 vaccin RacH-SE-70-p455-H3 thể hiện số lượng khoảng 100-150 (1xEHV-1) đến 150-200 (2x EHV-1)/ 1×10^6 trong IFN γ -ELISpot (Fig. 21 C và D).

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

Như được mô tả dưới đây, trong sáng chế được mô tả, bốn kháng nguyên hemagglutinin (HA) IAV lợn được mô tả ở trên thu được từ phân typ/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.

Vùng khởi đầu p430 mới được xác định được sử dụng để điều khiển sự biểu hiện của H1N1 của 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 gắn chèn orf1/3 để tạo ra pU1/3-p430-H1av-BGH_K_BGH. Việc biểu hiện của H1av được đặt dưới sự kiểm soát của vùng khởi đầu p430 và tín hiệu polyA hormon tăng trưởng bò (BGH) và được đóng khung bằng các vùng tái tổ hợp để gắn chèn vào trong orf1/3 (Fig. 12).

Bằng cách gây đột biến *en-passant* sử dụng hệ thống tái tổ hợp RED cat-xet biểu hiện p430-H1av-BGH được gắn chèn 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. 13) được tách khỏi và được tinh chế vết tan hai lần. Việc gắn chèn chính xác cat-xet biểu hiện được xác nhận bằng cách giải trình tự sản phẩm PCR độ trung thực cao của vùng gắn chèn. 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. 14). 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 (sở hữu của BI), (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 kỳ vọng.

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 Hoechst 33342 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 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 thấm tách Westerns và miễn dịch huỳnh quang (đối với H1av, Fig. 14) 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.

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 gắn chèn 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 phân typ/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. 12) được gắn chèn vào trong vị trí gắn chèn 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-SE1/3-p430-H1av-70-p455-H3, và virus tái tổ hợp rEHV-1 RacH-SE1/3-p430-H1av-70-p455-H3 được tách khỏi và được tinh chế vết tan hai lần. Tên gọi ngắn của virus tái tổ hợp này là rEHV-1 RacH-SE_B (Fig. 15). Việc gắn chèn chính xác cat-xet biểu hiện được xác nhận bằng cách giải trình tự sản phẩm PCR độ trung thực cao của các vùng gắn chèn cùng với các trình tự chặn.

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. 16). 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. 16).

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 gắn chèn 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 gắn chèn 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 gắn chèn kép thứ hai biểu hiện hemagglutinin 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 vectơ chuyển cho vùng gắn chèn orf1/3 để tạo ra pU1/3-p430-H1hu-BGHKBGH. Việc biểu hiện của H1hu

được đặt dưới sự kiểm soát của vùng khởi đầu p430 và tín hiệu polyA hormon tăng trưởng bò (BGH) và được đóng khung bằng các vùng tái tổ hợp để gắn chèn vào trong orf1/3 (Fig. 22).

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 vùng khởi đầu mới p455 và tín hiệu polyadenyl hóa mới 71pA và đóng khung cat-xet bằng các vùng tái tổ hợp để gắn chèn vào trong orf70 (Fig. 23).

Tiếp theo, cat-xet biểu hiện p430-H1av-BGH và p455-H1pdm-71 được gắn chèn 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 gắn chèn 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. 24).

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 thấm tách Western bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng Ai2G7 (sở hữu của BI), (Fig. 25).

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 gắn chèn được xác nhận mỗi lần cấy chuyển cũng như biểu hiện gen chuyển bằng thử nghiệm thấm 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 vắc xin được tạo vector ở lợn con non, vắc xin IAV lợn tứ giá chứa rEHV-1 RacH-SE_B và rEHV-1 RacH-SE_D được thử

ngheem trong nghiien cuu thur thach chung nguira. Cu the, lon con co tinh miien dich co nguon gocc tu me khang IAV lon (duong tinh voi khang the tu me) duoc chung nguira hai lan bang rEHV-1 RacH-SE_B va rEHV-1 RacH-SE_D o lieu bang 1×10^7 TCID50 cho moi chung vaccin trong co luc mot va bon tuan tuoi (chung nguira hai mui, 2x EHV-1) hoac chi luc bon tuan tuoi (chung nguira mot mui, 1x EHV-1). Nhom khong duoc chung nguira dung lam doi churng am. Luc 11 tuan tuoi, tat ca cac dong vat ngoai doi churng am duoc thur thach bang cach dung trong khi quan lieu luong 1×10^6 TCID50 cua chung thur thach IAV lon H3N2 (the phan lap virut thuc dia chau Au R452-14 ma H3 cua no khac loai voi khang nguuyen vaccin H3 duoc su dung trong rEHV-1 RacH-SE_B). Cac dong vat khong duoc chung nguira va khong thur thach duoc su dung lam doi churng am, trong khi cac dong vat khong duoc chung nguira ngoai cac dong vat thur thach duoc su dung lam doi churng lay nhiem. Tai thi diem va sau khi chung nguira va truoc va sau khi thur thach, than nhiet duoc do va mau mau duoc lay tai cac thi diem khac nhau. Mot ngay sau khi thur thach, mot nua so dong vat moi nom bi giét va phoi duoc tinh diem theo muc do ton thuong thuong thay doi voi nhiem IAV lon, ba mau phoi tu moi phoi trai va phai duoc lay tu moi dong vat, tuong ung, de xac dinh nong do IAV lon chuan lay nhiem trong chat dong nhât phoi, va dich rua phe quan phe nang (bronchioalveolar lavage fluid - BALF) duoc lay mau. Quy trinh tuong tu duoc thuc hien voi nua so dong vat con lai trong moi nom ba ngay sau khi thur thach. Nguyen lieu mau va du lieu duoc thu thap duoc phan tich de xac dinh, trong so cac thong so khac, su thay doi than nhiet sau khi thur thach, cac trieu churng lam sang sau khi nhiem IAV lon, diem so phoi, do chuan IAV lon trong phoi, su thay doi mo hoc o mo phoi, do chuan trung hoa huyet thanh IAV lon, muc xytokin trong BALF, viec kich thich lai PBMCS khi duoc do bang IFN γ -ELISpot, va hoat hoa te bao B.

Ví dụ 9: Cam ung dap ung khang the trung hoa khang hai khang nguuyen o chuot nhât duoc chung nguira bang vaccin vector rEHV-1 RacH nhî giá

rEHV-1 RacH SE B (rEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1av-7-p455-H3 xem Fig. 15) duoc su dung de gay miien dich cho chuot Balb/c de churng to rang gen chuyen duoc bieu hien sinh miien dich o cac loai khac lon va khang the trung hoa duoc cam ung khang mot trong hai khang nguuyen bang cach su dung trong mui.

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 40µl rEHV-1 RacH SE B (rEHV-1 RacH-SE-1/3-430-H1av-7-455-H3, nhóm 1), hoặc 40 µl vector trống (rEHV-1 RacH-SE, nhóm 2, vector đối chứng), hoặc 40 µl 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 µl. 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 ngựa lần hai) được pha loãng 1:50 trong PBS được thử nghiệm. Để làm đối chứng dương huyết thanh từ ngựa được chủng ngựa 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 nhất 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	ID trong thử nghiệm	Pha loãng	Tế bào không bị nhiễm	Tế bào bị nhiễm
Nhóm 3 (Đối chứng âm)	1	1	1:50 SA	âm tính	âm tính
	2	2	1:50 SA	âm tính	âm tính
	3	3	1:50 SA	âm tính	âm tính
	4	4	1:50 SA	âm tính	âm tính
	5	5	1:50 SA	âm tính	âm tính

Nhóm 2 (Vectơ trống)	1	6	1:50 SA	âm tính	dương tính
	2	7	1:50 SA	âm tính	dương tính
	3	8	1:50 SA	âm tính	dương tính
	4	9	1:50 SA	âm tính	dương tính
	5	10	1:50 SA	âm tính	dương tính
Nhóm 1 (rEHV-1 Rach SE B)	1	11	1:50 SA	âm tính	dương tính
	2	12	1:50 SA	âm tính	dương tính
	3	13	1:50 SA	âm tính	dương tính
	4	14	1:50 SA	âm tính	dương tính
	5	15	1:50 SA	âm tính	dương tính
Kháng thể đối chứng	Đặc hiệu với				
Huyết thanh ngựa	EHV-1	22	1:500	âm tính	dương tính
Kháng thể thứ cấp	Đặc hiệu 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

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 nhau từ 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 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 (VNT):

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 rã đông và pha loãng trong MEM chứa Gentamycin và trypsin với nồng độ gấp đôi (MEM/Genta/2x trypsin).

Huyết thanh được thử nghiệm 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 ngừa bằng vaccine IAV đa giá bất hoạt, và đối chứng âm.

Huyết thanh được làm bất hoạt bằng nhiệt và tương ứng trong hai và ba 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 /CO₂ 5% 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: Các kết quả VNT H1avN1 cúm

H1avN1	VNT#1		VNT#2		VNT#3		Khả năng trung hòa trung bình	
	146 TCID ₅₀ /lỗ	khả năng	32 TCID ₅₀ /lỗ	khả năng	181 TCID ₅₀ /lỗ	khả năng		SD (độ lệch chuẩn)
chuột nhất	Độ pha loãng trung hòa		Độ pha loãng trung hòa		Độ pha loãng trung hòa			

	ngịch đảo		ngịch đảo		ngịch 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
Vector trống-1	không được xác định	không giá trị	âm tính	không giá trị	âm tính	không giá trị	không giá trị	không giá trị
Vector trống-2	không được xác định	không giá trị	âm tính	không giá trị	âm tính	không giá trị	không giá trị	không giá trị
Vector trống-3	không được xác định	không giá trị	âm tính	không giá trị	âm tính	không giá trị	không giá trị	không giá trị
Vector trống-4	âm tính	không giá trị	âm tính	không giá trị	âm tính	không giá trị	không giá trị	không giá trị
Vector trống-5	không được xác định	không giá trị	âm tính	không giá trị	âm tính	không giá trị	không giá trị	không giá trị
Huyết thanh lợn đối chứng dương	32	không giá trị	n.d	không giá trị	n.d	không giá trị	không giá trị	không giá trị

Bảng 5: Kết quả VNT H3N2 cúm

H3N2	VNT#1		VNT#2		VNT#3		Khả năng trung hòa trung bình	
	16 TCID50/ lỗ	khả năng	24 TCID50/ lỗ	khả năng	15 TCID50/ lỗ	khả năng		SD
chuột nhất	Độ pha loãng trung hòa nghịch đảo		Độ pha loãng trung hòa nghịch đảo		Độ 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 SE B -5	256	4096	128	3072	64	960	2709	1599
Vector trống-1	âm tính	không giá trị	âm tính	không giá trị	âm tính	không giá trị	không giá trị	không giá trị
Vector trống-2	âm tính	không giá trị	âm tính	không giá trị	âm tính	không giá trị	không giá trị	không giá trị
Vector trống-3	âm tính	không giá trị	âm tính	không giá trị	âm tính	không giá trị	không giá trị	không giá trị

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. 26.

Tất cả các 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 phân typ H3N2 và H1avN1. Vì thế, việc dùng trong mũi hai lần rEHV-1 RacH-SE biểu hiện hemagglutinins của IAV từ vị trí gắn chèn orf70 dưới sự kiểm soát của vùng khởi đầu p455 (H3) và song song từ vị trí gắn chèn 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: Hiệu quả của vacxin 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 vacxin được tạo vector ở lợn con non, vacxin IAV lợn tứ giá chứa rEHV-1 RacH-SE_B (rEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1av-70-p455-H3 xem Fig. 15) và rEHV-1 RacH-SE_D (rEHV-1 RacH-SE-1/3-p430-H1hu-70-p455-H1pdm xem Fig. 24) được thử nghiệm trong nghiên cứu thử thách chủng ngừa thứ hai.

Trong nghiên cứu thứ hai này, lợn con từ lợn nái không được chủng ngừa 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. 30) và bằng thử nghiệm trung hòa virus (dữ liệu không được thể hiện) ở 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 bảy (các ngày nghiên cứu 69 hoặc 70, SD42/43), 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 loại 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.

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. 27). 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. 28). 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 tải lượng IAV lợn trong phổi vào một và ba ngày sau khi thử thách bằng chủng IAV lợn H3N2 khác loại ở lợn con, tương ứng. 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. 30. 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 giữa số lượng tác nhân gây bệnh và vật chủ bằng 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 1µg/ml (rH3 1µg/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 10^6 tế bào và được tính là giá trị trung bình cho mỗi nhóm, tương ứng (Fig. 32). 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 đếm 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 đếm trung bình cho mỗi nhóm trên 85 sau hai lần dùng trong cơ, lớn hơn 100 đếm sau khi dùng trong mũi lần thứ nhất và sau đó dùng trong cơ (IN+IM), và lớn hơn 150 đếm sau 2 lần dùng trong mũi (2X IN), và sau khi kích thích lại, tương ứng (Fig. 32). 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 loại, 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 loại.

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 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. 31) 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

cứ 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 loại 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. 29). 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 tải lượng IAV lợn trong phổi lúc năm ngày sau khi thử thách bằng chủng IAV lợn H3N2 khác loại ở lợn con, tương ứng. 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 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 vaccin 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. 31. 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 - 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 giữa số lượng tác nhân gây bệnh và vật chủ bằng 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 1µg/ml (rH3 1µg/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 10^6 tế bào và được tính là giá trị trung bình cho mỗi nhóm, tương ứng (Fig. 33). 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. 33). 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 loại, 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 loại.

Ví dụ 12: Vaccin IAV lợn tứ giá chứa rEHV-1 RacH-SE_B và rEHV-1 RacH-SE_D tạo ra sự phân biệt về mặt chẩn đoán dấu hiệu động vật bị lây nhiễm với các động vật được chủng ngừa (DIVA) dựa trên kháng thể đặc hiệu nucleoprotein (Np) IAV

Để đánh giá các đặc điểm DIVA huyết thanh học của vaccin IAV lợn tứ giá chứa rEHV-1 RacH-SE_B và rEHV-1 RacH-SE_D, lợn con được sinh ra từ lợn nái và được ăn sữa non và sữa của lợn nái được chủng ngừa hai lần khi mang thai bằng vaccin bất hoạt có bán trên thị trường kháng IAV lợn 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 và lần hai trong tuần tuổi thứ tư của nó, 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 (neg. ctrl.). Đối với các nhóm 2X IM, IN+IM, 2X IN, và neg. ctrl., năm động vật cho mỗi nhóm được sử dụng và mẫu huyết thanh được lấy trước khi chủng ngừa lần thứ nhất (Fig. 34, trước khi chủng ngừa) và 14 ngày sau khi chủng ngừa lần hai (Fig. 34, sau khi chủng ngừa), tương ứng. Làm đối chứng dương, hai lợn con từ lợn nái không được chủng ngừa được thử nghiệm âm tính với kháng thể đặc hiệu IAV trước thời điểm chủng ngừa lần thứ nhất (dữ liệu không được chỉ ra và Fig. 34, trước khi chủng ngừa) được chủng ngừa hai lần bằng vaccin chứa IAV bất hoạt có bán trên thị trường against IAV lợn (đối chứng dương). Lợn con đối chứng dương được chủng ngừa lần thứ nhất trong tuần tuổi thứ hai và lần thứ hai trong tuần tuổi thứ năm, tương ứng, và các mẫu huyết thanh được lấy trước lần chủng ngừa thứ nhất (Fig. 34, trước khi chủng ngừa) và 22 ngày sau khi chủng ngừa lần hai (Fig. 34, sau khi chủng ngừa), tương ứng.

Huyết thanh được mô tả ở trên được thử nghiệm trong ELISA phát hiện IgG đặc hiệu nucleoprotein (Np) IAV lợn (Fig. 34). Các mẫu huyết thanh từ lợn con của lợn nái

được chủng ngừa (các nhóm neg. ctrl., 2X IM, IN+IM, 2X IN) đều thể hiện giá trị OD trung bình là 0,7 hoặc cao hơn trước khi chủng ngừa, vì thế chứng tỏ rằng sự có mặt của kháng thể đặc hiệu NP của IAV trong các động vật không được chủng ngừa là có nguồn gốc từ mẹ (Fig. 34). Ngược lại, giá trị nhóm trung bình của huyết thanh lợn con từ nhóm đối chứng dương thấp hơn 0,15 trước khi chủng ngừa, chứng tỏ không có/mức rất thấp của kháng thể đặc hiệu NP của IAV. Vào 22 ngày sau khi chủng ngừa lần hai (Fig. 34, sau khi chủng ngừa) bằng vaccin IAV lợn chứa NP bất hoạt có bán trên thị trường, giá trị nhóm trung bình của huyết thanh từ nhóm đối chứng dương tăng lên hơn 1,9, vì thế chứng tỏ khả năng cảm ứng mạnh IgG đặc hiệu NP của IAV lợn phát hiện được ở lợn con. Ngược lại, vào 14 ngày sau khi chủng ngừa bằng vaccin IAV lợn tứ giá chứa rEHV-1 RacH-SE_B và rEHV-1 RacH-SE_D mà không chứa cũng không biểu hiện NP IAV lợn, mẫu huyết thanh từ lợn con của các nhóm 2X IM, IN+IM, 2X IN và cả từ nhóm không được chủng ngừa đối chứng âm thể hiện giá trị OD trung bình cho mỗi nhóm thấp hơn 0,15, tương ứng, vì thế chứng tỏ việc suy giảm mức kháng thể đặc hiệu NP của IAV trước khi chủng ngừa đến mức rất thấp và việc chủng ngừa không dẫn đến việc cảm ứng mạnh IgG đặc hiệu NP của IAV lợn có thể phát hiện được ở lợn con. Nói chung, trong khi vaccin IAV lợn bất hoạt chứa NP thông thường dẫn đến việc cảm ứng mạnh kháng thể đặc hiệu NP có thể phát hiện được ở lợn con được chủng ngừa, việc chủng ngừa bằng vaccin IAV lợn tứ giá chứa rEHV-1 RacH-SE_B và rEHV-1 RacH-SE_D không gây ra việc cảm ứng mạnh kháng thể đặc hiệu NP có thể phát hiện được ở lợn con được chủng ngừa.

Thực tế là vaccin IAV lợn tứ giá chứa rEHV-1 RacH-SE_B và rEHV-1 RacH-SE_D không gây ra việc cảm ứng mạnh kháng thể đặc hiệu NP có thể phát hiện được ở lợn con được chủng ngừa đã chứng tỏ dấu chuẩn chẩn đoán huyết thanh học cho phép phân biệt động vật bị nhiễm với động vật được chủng ngừa (DIVA) và phân biệt động vật được chủng ngừa với các động vật được chủng ngừa bằng vaccin IAV lợn bất hoạt chứa NP thông thường.

Đặc điểm DIVA này được khai thác để phát triển thử nghiệm thương mại đi kèm với việc sử dụng vaccin IAV lợn tứ giá chứa rEHV-1 RacH-SE_B và rEHV-1 RacH-SE_D và để hỗ trợ các biện pháp diệt trừ IAV lợn.

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 trệch 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. 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.
3. Brown, I.H., Chakraverty P., Harris P.A., Alexander D.J. **1995**. Disease outbreaks in pigs in Great Britain due to an influenza A virus of H1N2 subtype. *Vet Rec.*, (13):328-9.
4. Brown IH. The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. **2000**. *Vet Microbiol.*, 74(1-2):29-46
5. Bryant, N. A., Davis-Poynter, N., Vanderplassen, A., and Alcamí, A. **2003**. Glycoprotein G isoforms from some alphaherpesviruses function as broad-spectrum chemokine binding proteins. *The EMBO Journal* Vol. 22 (4): 833-846.
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. 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.
8. 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.

9. 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
10. 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.
11. 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
12. 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.
13. 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
14. Ma, G., Azab, W., Osterrieder, N. **2013**. Equine herpesviruses 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.
15. 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
16. 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.
17. 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.

18. Rajao DS, Sandbulte MR, Gauger PC, Kitikoon P, Platt R, Roth JA, Perez DR, Loving CL, Vincent AL. **2016**. Heterologous challenge in the presence of maternally-derived antibodies results in vaccine-associated enhanced respiratory disease in weaned piglets. *Virology*. 2016 Apr;491:79-88.
19. Rosas, C.T., Konig, 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 diarrhea virus structural proteins. *J. Gen. Virol.* 88 (3), 748–757.
20. 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.
21. 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. *Vaccine* 26 (19), 2335–3234.
22. 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
23. 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.
24. Thacker, E. and Janke, B. **2008**. Swine Influenza Virus: Zoonotic Potential and Vaccination Strategies for the Control of Avian and Swine Influenzas *J Infect Dis.* (2008) 197 (Supplement 1): S19-S24 doi:10.1086/524988
25. 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.

26. 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.
27. 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.
28. 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/vaccines2040707.
29. Watson S.J., Langat P., Reid S.M., Lam T.T., Cotten M., Kelly M., Van Reeth K., Qiu Y., Simon G., Bonin E., Foni E., Chiapponi C., Larsen L., Hjulsager C., Markowska-Daniel I., Urbaniak K., Dürrwald R., Schlegel M., Huovilainen A., Davidson I., Dán Á., Loeffen W., Edwards S., Bublot M., Vila T., Maldonado J., Valls L.; ESNIP3 Consortium, Brown I.H., Pybus O.G., Kellam P. Molecular Epidemiology and Evolution of Influenza Viruses Circulating within European Swine between 2009 and 2013. **2015**, *J Virol.* Oct;89(19):9920-31.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Vector Equid Alphaherpesvirus 1 RacH (EHV-1 RacH) chứa trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh thứ nhất và thứ hai liên quan đến tác nhân gây bệnh lây nhiễm cho động vật sản xuất thực phẩm, trong đó trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh thứ nhất được gắn chèn vào ORF70, trong đó ORF70 này được cải biến bằng cách làm khuyết một phần khoảng 801 bp, trong đó phần khuyết này tương ứng với trình tự có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95% với SEQ ID NO: 20, và trong đó trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh thứ hai được gắn chèn vào vị trí gắn chèn, và trong đó các trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh này được liên kết hoạt động với vùng khởi đầu.
2. Vector EHV-1 RacH theo điểm 1, trong đó trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh thứ nhất và/hoặc thứ hai là trình tự mã hóa hemagglutinin cúm.
3. Vector EHV-1 RacH theo điểm 2, trong đó phân typ hemagglutinin của hemagglutinin cúm là H1 và/hoặc H3.
4. Vector EHV-1 RacH theo điểm 1, trong đó trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh thứ nhất và/hoặc thứ hai mã hóa kháng nguyên hemagglutinin cúm có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% với trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO:26, 27, 28, và 29.
5. Vector EHV-1 RacH theo điểm 1, trong đó vị trí gắn chèn của trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh thứ hai là ORF1/3 hoặc ORF70.
6. Vector EHV-1 RacH theo điểm 1, trong đó trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh thứ hai được gắn chèn vào ORF1/3.
7. Vector EHV-1 RacH theo điểm 1, trong đó ORF70 có sự làm khuyết, cắt cụt, thế, hoặc cải biến một phần, và trong đó ORF71 vẫn giữ được chức năng, và trong đó sự biểu hiện glycoprotein G của sản phẩm gen ORF70 đã bị loại bỏ.
8. Vector EHV-1 RacH theo điểm 1, trong đó vector EHV-1 RacH này bao gồm ít nhất một vùng chặn với trình tự bao gồm trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 13, 14, 15, 16, 17, và 18.
9. Vector EHV-1 RacH theo điểm 1, trong đó ít nhất một trong số các vùng khởi đầu là T lớn SV40, gen sớm tức thời HCMV và MCMV 1, vùng khởi đầu alpha yếu tố kéo dài của

người, vùng khởi đầu polyhedrin baculovirut, hoặc trình tự có bao gồm một trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID No: 1, 2, 3, và 4, hoặc các trình tự bổ sung của chúng.

10. Vector EHV-1 RacH theo điểm 1, trong đó ít nhất một trong số các vùng khởi đầu có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95% với một trong số các trình tự SEQ ID No: 1 và 2 hoặc các trình tự bổ sung của chúng.

11. Vector EHV-1 RacH theo điểm 1, trong đó ít nhất một trong số các vùng khởi đầu bao gồm trình tự có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% với SEQ ID NO: 3 hoặc trình tự bổ sung của chúng.

12. Vector EHV-1 RacH theo điểm 1, trong đó ít nhất một trong số các vùng khởi đầu bao gồm trình tự có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% với SEQ ID NO: 4 hoặc trình tự bổ sung của chúng.

13. Vector EHV-1 RacH theo điểm 1, trong đó vùng khởi đầu bao gồm p430 (SEQ ID NO: 3), và p455 (SEQ ID NO: 4).

14. Vector EHV-1 RacH theo điểm 1, trong đó trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh thứ nhất và thứ hai là các trình tự mã hóa hemagglutinin cúm.

15. Vector EHV-1 RacH theo điểm 1, trong đó động vật sản xuất thực phẩm là lợn.

16. Vector EHV-1 RacH theo điểm 1, trong đó tác nhân gây bệnh lây nhiễm cho động vật sản xuất thực phẩm là virus cúm A ở lợn.

17. Vector EHV-1 RacH theo điểm 1, trong đó trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh thứ nhất và thứ hai là trình tự mã hóa kháng nguyên hemagglutinin cúm A có nguồn gốc từ lợn.

18. Vector EHV-1 RacH theo điểm 1, trong đó trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh thứ nhất và thứ hai là trình tự mã hóa kháng nguyên hemagglutinin cúm A có nguồn gốc từ lợn, và trong đó ít nhất một trình tự mã hóa kháng nguyên hemagglutinin cúm A có nguồn gốc từ lợn được gắn chèn vào ORF70.

19. Vector EHV-1 RacH theo điểm 1, trong đó trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh thứ hai được gắn chèn vào ORF1/3, trong đó trình tự mã hóa kháng nguyên ngoại sinh thứ nhất và/hoặc thứ hai mã hóa kháng nguyên hemagglutinin cúm có độ đồng nhất trình tự ít

nhất là 95% với trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO:26, 27, 28, và 29, và trong đó tại vùng khởi đầu có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95% với trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID No: 1 và 2 hoặc các trình tự bổ sung của chúng.

20. Chế phẩm sinh miễn dịch chứa vectơ EHV-1 RacH theo điểm 1.

21. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm 20, trong đó chế phẩm sinh miễn dịch là vaccin đa giá.

22. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm 20, trong đó chế phẩm sinh miễn dịch là vaccin hai giá, bốn giá, sáu giá (6 trong 1), hoặc bảy giá (7 trong 1).

23. Vaccin để phân biệt động vật bị nhiễm với động vật được chủng ngừa (DIVA) chứa vectơ EHV-1 RacH theo điểm 1 và dấu chuẩn chẩn đoán để phân biệt động vật bị nhiễm với động vật được chủng ngừa.

24. Vaccin DIVA theo điểm 23, trong đó vaccin DIVA này là vaccin đa giá.

25. Vaccin DIVA theo điểm 23, trong đó vaccin DIVA này là vaccin hai giá, bốn giá, sáu giá (6 trong 1) hoặc bảy giá (7 trong 1).

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH

<120> Vector Equid Alphaherpesvirus 1 RaCH (EHV-1 RaCH), chế phẩm sinh miễn dịch và vacxin để phân biệt động vật bị nhiễm với động vật được chủng ngừa (DIVA) chứa vector này

<130> P01-3203

<160> 29

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 600

<212> ADN

<213> Virut herpes ở ngựa 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 gtaccccaaca agagtatgta aaaagctgtc attctcaact actgagaata
240
atatcaaagc taaagataaa ccctgaggag tttccacggg aaccagagtc taggctcgtg
300
cgcggtatca tcgaatacgc cagcctagag cgtaagccac atacgcgcta tccttgcttc
360
cagcgctgta acctacacat tgacggggaa tttttgatcc ataaaatgct agcgttcaat
420
gctgcgatgc gcccatccgc agaagagttg ttgtcctacc caatgtttat gaatctgtag
480
gatgactaac agatttgagg tggagacggc gtgggcgata ctgtataaag ttgtactact
540
taccagccca gtcagtgtgc tgtagtgcc cccactgtaa agctgtgata agctgcagtt
600
```

<210> 2

<211> 600

<212> ADN

<213> Virut herpes ở ngựa 4

<400> 2

```
agctggggga gtttgtacta tagtgtatta catgcggctt gcaataactg cctggtttat
60
gtttcgcaac attcaagcag acatgctacc gctaaacact ttgcaacaat tttttattgg
120
gtgtttggcc tttggtagaa ctgtcgcgtt tttggtggta gcatatacta ccttatttat
180
acgctccgag ctgtttttca gcatgctagc acccaacgcc gagcgagagt atataactcc
240
catcattgcc cacaagctta tgccacttat tagcgtccgc tctgccgttt gcttagtcat
300
aatatctacc gccgtttacg cagcagacgc tatctgcgac acaattggat ttgcgatacc
360
gcgcatgtgg atgtgtatatt taatgagatc aacctccatg aagcgtaact agggggcctc
420
ccactgaggc actaccggct tagcagctga ctaacacagt ataaaacgtg agaagaaatc
480
agtctcatgc gccattagcg ctaggctagt tagcgtggag gaccggagcg ctaccgccag
540
```

cagtttcatc cgcttggtta cgggtttggt aacacctacc ggtgttttac cgctaccata
600

<210> 3

<211> 430

<212> ADN

<213> Virut herpes ở ngựa 4

<400> 3

tctatttgag gacccgccga gtaccccaaca agagtatgta aaaagctgtc attctcaact
60

actgagaata atatcaaagc taaagataaa ccctgaggag tttccacggg aaccagagtc
120

taggctcgtg cgcggataca tcgaatacgc cagcctagag cgtaagccac atacgcgcta
180

tccttgcttc cagcgcgtga acctacacat tgacggggaa tttttgatcc ataaaatgct
240

agcgttcaat gctgcgatgc gcccatccgc agaagagttg ttgtcctacc caatgtttat
300

gaatctgtag gatgactaac agatttgggg tggagacggc gtgggcgata ctgtataaag
360

ttgtactact taccagccca gtcagtgtgc tgtagtgcc aacacctgtaa agctgtgata
420

agctgcagtt

430

<210> 4

<211> 449

<212> ADN

<213> Virut herpes ở ngựa 4

<400> 4

ttgggtgtag catatactac cttattttata cgctccgagc tgtttttcag catgctagca
60

cccaacgccg agcgagagta tataactccc atcattgccc acaagcttat gccacttatt
120

agcgtccgct ctgccgtttg cttagtcata atatctaccg ccgtttacgc agcagacgct
180

atctgcgaca caattggatt tgcgataccg cgcagtgtga tgtgtatttt aatgagatca
240

acctccatga agcgtaacta gggggcctcc cactgaggca ctaccggctt agcagctgac
300

taacacagta taaaacgtga gaagaaatca gtotcatgcg ccattagcgc taggctagtt
360

agcgtggagg accggagcgc taccgccagc agtttcatcc gcctgggttac gggtttggtta
420

acacctaccg gtgttttacc gctaccata

449

<210> 5

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi số 1130 đặc hiệu 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 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 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 với mCherry
 <400> 8
 acccttggtc accttcag
 18

<210> 9
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi PCR axit nucleic trình tự nhân tạo 1017 cho vùng gắn
 chèn 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 cho vùng gắn
 chèn 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 cho vùng gắn
chèn 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 cho vùng gắn
chèn orf1/3

<400> 12
agcgcgcccc gtacccagtg gg
22

<210> 13
<211> 417
<212> ADN
<213> Virut herpes ở ngựa 1
<400> 13

ctccgagtac cccagaggag tatgtgaaaa gctgccactc gcaactactg aagataattt
60
caacgctcaa gataaatccg gaggagtttc ctcgagaccc cgggtcgagg ctctgtgcgcg
120
gatacatcga gtattctaga ctcgagcgca agccctacac gcgctacccc tgctttcaac
180
gcgtcaacct gcacattgac ggggagtttc tggttcacia gatgctagcg ttcaatgccg
240
cgatgcgccc atcggccgag gagctgctgt catacccaat gtttgctcaa ctttaggatg
300
actaacctgt ttctgggagg agacagcggtg ggcgacggtg tataaagttg gtctgctttc
360
aagccctgcc actgcgctac agtgccacca actgtaaagc ggtagtaagc tgcagtg
417

<210> 14
<211> 431
<212> ADN
<213> Virut herpes ở ngựa 1
<400> 14

gaccctgttg gtgggtgcgg ttggactcag aatcttggcg caggcatgga agtttgctcg
60
tgacgaaaca tacgacacca tccgcgcaga 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 taggggtgat agtttacatt tgtgtattaa ggtcaaaact
360
gtcctctcgg aatttttcgc gcgcgcacaaa tgtaaaacat agaaattacc agcgacttga
420

gtacgttgct t
431

<210> 15

<211> 417

<212> ADN

<213> Virut herpes ở ngựa 1

<400> 15

ctccgagtac cccagaggag tatgtgaaaa gctgccactc gcaactactg aagataattt
60
caacgctcaa gataaatccg gaggagtttc ctcgagaccc cgggtcgagg ctcgtgcgcg
120
gatacatcga gtattctaga ctcgagcgca agccctacac gcgctacccc tgctttcaac
180
gcgtaacct gcacattgac ggggagtttc tggttcacia gatgctagcg ttcaatgccg
240
cgatgcgccc atcggccgag gagctgctgt catacccaat gtttgcacia ctttaggatg
300
actaacctgt ttctgggagg agacagcgtg ggcgacggtg tataaagttg gtctgctttc
360
aagccctgcc actgcgctac agtgccacca actgtaaagc ggtagtaagc tgcagtg
417

<210> 16

<211> 431

<212> ADN

<213> Virut herpes ở ngựa 1

<400> 16

gaccctgttg gtgggtgcgg ttggactcag aatcttggcg caggcatgga agtttgcgg
60
tgacgaaaca tacgacacca tccgcgcaga agcaaagaat ttagagaccc acgtaccctc
120
aagtgcctgca 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 aatttttctgc gcgcgcaaaa tgtaaaacat agaaattacc agcgacttga
420
gtacgttgct t
431

<210> 17

<211> 283

<212> ADN

<213> Virut herpes ở ngựa 1

<400> 17

tctagactcg agcgcaagcc ctacacgcgc taccctgtct ttcaacgcgt caacctgcac
60
attgacgggg agtttctggt tcacaagatg ctacggttca atgccgcgat gcgcccacg
120
gccgaggagc tgctgtcata cccaatgttt gctcaacttt aggatgacta acctgtttct
180
gggaggagac agcgtgggag acggtgtata aagttggtct gctttcaagc cctgccactg
240

cgctacagtg ccaccaactg taaagcggta gtaagctgca gtg
283

<210> 18
<211> 144
<212> ADN
<213> Virut herpes ở ngựa 1
<400> 18
gaccctgttg gtgggtgctg ttggactcag aatcttggcg caggcatgga agtttgtcgg
60
tgacgaaaca tacgacacca tccgcgcaga agcaaagaat ttagagaccc acgtaccctc
120
aagtgtctgca gagtcgtctc taga
144

<210> 19
<211> 801
<212> ADN
<213> Virut herpes ở ngựa 1
<400> 19
atgttgactg tcttagcagc cctgagtctg ctcagcttgc ttacgagcgc aaccggacgg
60
ctcgccccag atgaactctg ttatgccgaa ccccgagaa ctggcagccc accaaacacc
120
cagcccgaac gccacccgt aatatttgag ccccaacaa ttgcatgaa agctgaatcc
180
aagggttgtg agctaatttt attagatcca cccatagatg taagctatcg cagagaagat
240
aaggtgaatg cgtccattgc ttggtttttt gactttggcg cttgccggat gccatcgca
300
tacagagagt attacggttg tattggcaat gctgttcct cccagagac ttgtgatgag
360
tactattta cccttattag gaccgagggc atcgtggagt ttaccatcgt aaacatgagc
420
ctcctgtttc agcctggaat atacgatagt ggcaatttta tctacagcgt tctcctggac
480
taccatat ttacaggacg tgtaacgttg gaagtggaaa aggacacaaa ctatccctgt
540
ggcatgattc atggactcac tgcttacgga aacatcaacg tagatgaaac catggacaac
600
gccagcccac acccgctgc cgtgggggtgc tttcccgagc ccatcgacaa cgaagcgtgg
660
gcaaacgtta catttactga attggggata ccagaccaa actcatttct cgatgacgag
720
ggtgattacc cgaatatatc agactgtcac tcgtgggagt catacaccta cccaaatagc
780
ctgaggcagg ccacaggacc c
801

<210> 20
<211> 801
<212> ADN
<213> Virut herpes ở ngựa 1
<400> 20
atgttgactg tcttagcagc tctgagtctg ctcagcttgc ttacgagcgc aaccggacgg
60
ctcgccccag atgaactctg ttatgccgaa ccccgagaa ctggcagccc accaaacacc
120

cagcccgaac gccaccccgat aatatttgag cccccaacaa ttgcgattaa agctgaatcc
 180
 aagggttggtg agctaatttt attagatcca cccatagatg taagctatcg cagagaagat
 240
 aagggtgaatg cgtccattgc ttgggtttttt gactttggcg cttgccggat gcccatcgca
 300
 tacagagagt attacggttg tattggcaat gctgttccct 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 acccgcggtg cgtgggggtg tttcccgagc ccatcgacaa cgaagcgtgg
 660
 gcaaacgtta catttactga attggggata ccagacccaa actcatttct cgatgacgag
 720
 ggtgattacc cgaatatatc agactgtcac tcgtgggagt catacaccta cccaaatagc
 780
 ctgaggcagg ccacaggacc c
 801

<210> 21

<211> 4435

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

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

<400> 21

tcgcgcgttt cggatgatgac 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 aaggcgatc ggtgcgggcc tcttcgctat
 300
 tacgccagct ggcgaaaggg ggatgtgctg caaggcgatt aagttgggta acgccagggt
 360
 tttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgaatt cctccgagta cccagagga
 420
 gtatgtgaaa agctgccact cgcaactact gaagataatt tcaacgctca agataaatcc
 480
 ggaggagttt cctcgagacc ccgggtcgag gctcgtgcgc ggatacatcg agtattctag
 540
 actcgagcgc aagccctaca cgcgctaccc ctgctttcaa cgcgtcaacc tgcacattga
 600
 cggggagttt ctggttcaca agatgctagc gttcaatgcc gcgatgcgcc catcggccga
 660
 ggagctgctg tcatacccaa tgtttgctca actttaggat gactaacctg tttctgggag
 720
 gagacagcgt gggcgacggt gtataaagtt ggtctgcttt caagccctgc cactgcgcta
 780

cagtgccacc aactgtaaag cggtagtaag ctgcagtggc cgacatgggt agcaagggcg
 840
 aggaggataa catggccatc atcaaggagt tcatgcgctt caaggtgcac atggaggggt
 900
 ccgtgaacgg ccacgagttc gagatcgagg gcgagggcga gggccgcccc tacgagggca
 960
 cccagaccgc caagctgaag gtgaccaagg gtggccccct gcccttcgcc tgggacatcc
 1020
 tgtcccctca gttcatgtac ggctccaagg cctacgtgaa gcaccccgcc gacatccccg
 1080
 actacttgaa gctgtccttc cccgaggggt tcaagtggga gcgctgatg aacttcgagg
 1140
 acggcggcgt ggtgaccgtg acccaggact cctccctgca ggacggcgag ttcattctaca
 1200
 aggtgaagct gcgcggcacc aacttcccct ccgacggccc cgtaatgcag aagaagacca
 1260
 tgggctggga ggccctcctc gagcggatgt accccgagga cggcgccttg aagggcgaga
 1320
 tcaagcagag gctgaagctg aaggacggcg gccactacga cgctgagggtc aagaccacct
 1380
 acaaggccaa gaagcccgtg cagctgcccg gcgcctacaa cgtcaacatc aagttggaca
 1440
 tcacctcca caacgaggac tacaccatcg tggaacagta cgaacgcgcc gagggccgcc
 1500
 actccaccgg cggcatggac gagctgtaca agtaactgtg ctttctagtt gccagccatc
 1560
 tgttgtttgc cctcccccg tgccttcctt gaccctggaa ggtgccactc cactgtcct
 1620
 ttcctaataa aatgaggaaa ttgcatcgca ttgtctgagt aggtgtcatt ctattctggg
 1680
 ggggtgggtg gggcaggaca gcaaggggga ggattggga gacaatagca ggcatgctgg
 1740
 ggatgcggtg ggctctatgg atccgaccct gttgggtgggt gcggttgga tcagaatctt
 1800
 ggcgcaggca tggaagttag tgggtgacga aacatacgac accatccgcg cagaagcaaa
 1860
 gaatttagag acccacgtac cctcaagtgc tgcagagtcg tctctagaaa accaatcgac
 1920
 acaggaggag tctaacagcc ccgaagttag ccacctgca agcgtcaaca gcgatgacag
 1980
 tacacacacg gggggtgctg cgaacggcat ccaggactgt gacagtcagc tcaaaactgt
 2040
 gtatgcctgc ttggctctaa ttggactcgg cacatgtgcc atgatagggt tgatagttta
 2100
 catttgtgta ttaaggtcaa aactgtcctc tcggaatttt tcgcgcgcgc aaaatgtaaa
 2160
 acatagaaat taccagcgac ttgagtacgt tgcttaagct tggcgtaatc atggatcatg
 2220
 ctgtttcctg tgtgaaattg ttatccgctc acaattccac acaacatacg agccggaagc
 2280
 ataaagtgtg aagcctgggg tgcctaataa gtgagctaac tcacattaat tgcgttgccg
 2340
 tcaactgccc ctttccagtc gggaaacctg tcgtgccagc tgcattaatg aatcggccaa
 2400
 cgcgcgggga gaggcgggtt gcgtattggg cgctcttcgc 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 agcgaggtat
 3000
 gtaggcggtg ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact acggctacac tagaaggaca
 3060
 gtatttggtg tctgcgctct gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt tggtagctct
 3120
 tgatccggca aacaaaccac cgctggtagc ggtgggtttt ttgtttgcaa gcagcagatt
 3180
 acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct tttctacggg gtctgacgct
 3240
 cagtggaaacg aaaactcacg ttaagggatt ttggtcatga gattatcaaa aaggatcttc
 3300
 acctagatcc ttttaaatta aaaatgaagt tttaaatcaa tctaaagtat atatgagtaa
 3360
 acttggctctg 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 ctcgctgttt
 3720
 ggtatggctt cattcagctc cggttcccaa cgatcaaggc gagttacatg atcccccatg
 3780
 ttgtgcaaaa aagcggttag ctcccttcggg cctccgatcg ttgtcagaag taagttggcc
 3840
 gcagtgttat cactcatggt tatggcagca ctgcataatt ctcttactgt catgccatcc
 3900
 gtaagatgct tttctgtgac tgggtgagtac tcaaccaagt cattctgaga atagtgtatg
 3960
 cggcgaccga gttgctcttg cccggcgtca atacgggata ataccgcgcc acatagcaga
 4020
 acttttaaag tgctcatcat tggaaaacgt tcttcggggc gaaaactctc aaggatctta
 4080
 ccgctgttga gatccagttc gatgtaaccc actcgtgcac ccaactgac ttcagcatct
 4140
 tttactttca ccagcgtttc tgggtgagca aaaacaggaa ggcaaaatgc cgcaaaaaag
 4200
 ggaataaggg cgacacggaa atgttgaata ctcatctct 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 vector chuyển pU70-p455-71K71

<400> 22

caataaacgc ggtatgtcta cttcaagcc tatgatgaac ggatgtttgg tgtttgcggc
 60
 tattataacg ctcttgagtt ttatgctatc tctgggaaca tgcgaaaatt acaggcgtgt
 120
 ggttcgggat cctagggata acagggtaat cgatttattc 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 attggtgatg cgctggcagt gttcctgcgc
 660
 cggttgcatc cgattcctgt ttgtaattgt ccttttaaca gcgatcgcgt atttcgtctc
 720
 gctcaggcgc aatcacgaat gaataacggt ttggttgatg cgagtgatct tgatgacgag
 780
 cgtaatggct ggcctgttga acaagtctgg aaagaaatgc ataagctttt gccattctca
 840
 ccggattcag tcgtcactca tggatgattc tcaattgata accttatttt tgacgagggg
 900
 aaattaatag gttgtattga tgttgagcga gtcggaatcg cagaccgata ccaggatctt
 960
 gccatcctat ggaactgcct cggtagagttt tctccttcat tacagaaacg gctttttcaa
 1020
 aaatatggta ttgataatcc tgatatgaat aaattgcagt ttcatttgat gtcgatgag
 1080
 tttttctaaa ataaacgcgg tatgtctacc ttcaagccta tgatgaacgg atgtttgggt
 1140
 tttgcggcta ttataacgct cttgagtttt atgctatctc tgggaacatg cgaaaattac
 1200
 aggcgtgtgg ttcgggatcc gaccctgttg gtgggtgcgg ttggactcag aatcttggcg
 1260
 caggcatgga agtttgtcgg tgacgaaaca tacgacacca tccgcgcaga agcaaagaat
 1320

ttagagaccc acgtaccctc aagtgtgca gagtcgtctc tagaaaacca atcgacacag
 1380
 gaggagtcta acagccccga agttgcccac ctgcgaagcg tcaacagcga tgacagtaca
 1440
 cacacggggg gtgcgtcgaa cggcatccag gactgtgaca gtcagctcaa aactgtgtat
 1500
 gcctgcttgg ctctaattgg actcggcaca tgtgccatga tagggttgat agtttacatt
 1560
 tgtgtattaa ggtcaaaaact gtcctctcgg aatttttcgc gcgcgcaaaa tgtaaaacat
 1620
 agaaattacc agcgacttga gtacgttgct taagcttggc gtaatcatgg tcatagctgt
 1680
 ttctgtgtg aaattgttat ccgctcacia ttccacacaa catacgagcc ggaagcataa
 1740
 agtgtaaagc ctgggggtgcc taatgagtga gctaaactac attaatgctg ttgcgctcac
 1800
 tgcccgtttt ccagtcggga aacctgtcgt gccagctgca ttaatgaatc ggccaacgcg
 1860
 cggggagagg cggtttgctg attgggcgct cttccgcttc ctgctcact gactcgtgc
 1920
 gctcggctgt tcggctgcgg cgagcgggtat cagctcactc aaaggcggta atacggttat
 1980
 ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca
 2040
 ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc
 2100
 atcacaaaaa tcgacgctca agtcagaggt ggcgaaaccg gacaggacta taaagatacc
 2160
 aggcgtttcc ccctggaagc tccctcgtgc gctctcctgt tccgaccctg ccgcttaccg
 2220
 gatacctgtc cgcctttctc ccttcgggaa gcgtggcgct ttctcatagc tcacgctgta
 2280
 ggtatctcag ttcggtgtag gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac gaaccccccg
 2340
 tttagccgga ccgctgcgcc ttatccggta actatcgtct tgagtccaac ccggtgaagc
 2400
 acgacttatt gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag
 2460
 gcggtgctac agagtctctg aagtgggtgg 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 gagtaaacct
 2820
 ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcagtg aggcacctat ctcagcgatc tgtctatttc
 2880
 gttcatccat agttgcctga ctccccgtcg tgtagataac tacgatacgg gagggcttac
 2940
 catctggccc cagtgtgca atgataccgc gagaccacg ctcaccggct ccagatttat
 3000
 cagcaataaa ccagccagcc ggaagggccg agcgcagaag tggtcctgca actttatccg
 3060

cctccatcca gtctattaat tgttgccggg aagctagagt aagtagttcg ccagttaata
 3120
 gtttgcgcaa cgttgttgcc attgctacag gcatcgtggt gtcacgctcg tcgtttggta
 3180
 tggcttcatt cagctccggt tcccaacgat caaggcgagt tacatgatcc cccatgttgt
 3240
 gcaaaaaagc ggtagctcc ttcggctctc cgatcgttgt cagaagtaag ttggccgcag
 3300
 tgttatcact catggttatg gcagcactgc ataattctct tactgtcatg ccatccgtaa
 3360
 gatgcttttc tgtgactggt gagtactcaa ccaagtcatt ctgagaatag tgtatgcggc
 3420
 gaccgagttg ctcttgcccg gcgtcaatac gggataatac cgcgccacat agcagaactt
 3480
 taaaagtgct catcattgga aaacgttctt cggggcgaaa actctcaagg atcttaccgc
 3540
 tgttgagatc cagttcgatg taaccctctc gtgcacccaa ctgatcttca gcatctttta
 3600
 ctttcaccag cgtttctggg tgagcaaaaa caggaaggca aaatgccgca aaaaagggaa
 3660
 taagggcgac acggaaatgt tgaatactca tactcttctt 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 ggagacgggc acagcttgct
 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 cggtgcgggc ctcttcgcta ttacgccagc
 4200
 tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt aacgccaggg ttttcccagt
 4260
 cagcagttg 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 aacttttaga tgactaacct gtttctggga ggagacagcg
 4620
 tgggcgacgg tgtataaagt tggctctgct tcaagccctg ccaactgcgct acagtgccac
 4680
 caactgtaaa gcggtagtaa gctgcagtgg tcgactgggt gtagcatata ctaccttatt
 4740
 tatacgtcc 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 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 pU70-p455-H3-71K71

<400> 23

caataaacgc ggtatgtcta ccttcaagcc tatgatgaac ggatgtttgg tgtttgccgc
 60
 tattataacg ctcttgagtt ttatgctatc tctgggaaca tgcgaaaatt acaggcggtg
 120
 ggttcgggat cctagggata acagggtaat cgatttattc 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 atgcatggtt actcaccact gcgatccccg ggaaaacagc attccaggta
 600
 ttagaagaat atcctgattc aggtgaaaat attgttgatg cgctggcagt gttcctgcgc
 660
 cggttgcatc cgattcctgt ttgtaattgt ccttttaaca gcgatcgcgt atttcgtctc
 720
 gctcaggcgc aatcacgaat gaataacggt ttggttgatg cgagtgatgt tgatgacgag
 780
 cgtaatggct ggccgtgtga acaagtctgg aaagaaatgc ataagctttt gccatttctc
 840
 ccggaattcag tcgtcactca tgggtgatttc tcacttgata accttatttt tgacgagggg
 900
 aaattaatag gttgtattga tgttggacga gtcggaatcg cagaccgata ccaggatctt
 960
 gccatcctat ggaactgcct cgggtgagttt tctccttcat tacagaaacg gctttttcaa
 1020
 aaatatggta ttgataatcc tgatatgaat aaattgcagt ttcatttgat gctcgatgag
 1080

ttttttctaaa ataaacgcgg tatgtctacc ttcaagccta tgatgaacgg atgttttggtg
 1140
 tttgcggcta ttataacgct cttgagtttt atgctatctc tgggaacatg cgaaaattac
 1200
 aggcgtgtgg ttcgggatcc gaccctgttg gtgggtgcgg ttggactcag aatcttggcg
 1260
 caggcatgga agtttgctcg tgacgaaaca tacgacacca tccgcgcaga agcaaagaat
 1320
 ttagagaccc acgtaccctc aagtgtgca gagtcgtctc tagaaaacca atcgacacag
 1380
 gaggagtcta acagccccga agttgccac ctgcgaagcg tcaacagcga tgacagtaca
 1440
 cacacggggg gtgcgtcgaa cggcatccag gactgtgaca gtcagctcaa aactgtgtat
 1500
 gcctgtttgg ctctaattgg actcggcaca tgtgccatga tagggttgat agtttacatt
 1560
 tgtgtattaa ggtcaaaact gtcctctcgg aatttttcgc gcgcgcaaaa tgtaaaacat
 1620
 agaaattacc agcgacttga gtacgttgct taagcttggc gtaatcatgg tcatagctgt
 1680
 ttcctgtgtg aaattgttat ccgctcacia ttccacacia catacgagcc ggaagcataa
 1740
 agtgtaaagc ctgggggtgcc taatgagtga gctaactcac attaatgctg ttgcgctcac
 1800
 tgcccgtttt ccagtcggga aacctgtcgt gccagctgca ttaatgaatc ggccaacgcg
 1860
 cggggagagg cggtttgcgt attgggcgct cttccgcttc ctgcgtcact gactcgctgc
 1920
 gctcggctgt tcggctgcgg cgagcgggtat cagctcactc aaaggcggta atacggttat
 1980
 ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca
 2040
 ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc
 2100
 atcacaaaaa tcgacgctca agtcagaggt ggcgaaaccc gacaggacta taaagatacc
 2160
 aggcgtttcc ccctggaagc tccctcgtgc gctctcctgt tccgaccctg ccgcttacgg
 2220
 gatacctgtc cgcctttctc ccttcgggaa gcgtggcgct ttctcatagc tcacgctgta
 2280
 ggtatctcag ttcggtgtag gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac gaacccccg
 2340
 ttcagcccga ccgctgcgcc ttatccggta actatcgtct tgagtccaac ccggttaagac
 2400
 acgacttatc gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag
 2460
 gcggtgctac agagttcttg aagtgggtggc ctaactacgg ctacactaga aggacagtat
 2520
 ttggtatctg cgctctgctg aagccagtta ccttcggaaa aagagttggg agctcttgat
 2580
 ccggcaaaca aaccaccgct ggtagcgggtg gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc
 2640
 gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc tacgggggtct gacgctcagt
 2700
 ggaacgaaaa ctcacgttaa gggattttgg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct
 2760
 agatcctttt aaattaaaaa tgaagtttta aatcaatcta aagtatatat gagtaaacct
 2820

ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcagtg aggcacctat ctcagcgatc tgtctatttc
 2880
 gttcatccat agttgcctga ctccccgtcg tgtagataac tacgatacgg gagggcttac
 2940
 catctggccc cagtgtctgca atgataccgc gagacccacg 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 cagctccggg tcccaacgat caaggcgagt tacatgatcc cccatgttgt
 3240
 gcaaaaaagc ggtagctcc ttcggctctc 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
 taaaagtgtc catcattgga aaacgttctt cggggcgaaa actctcaagg atcttaccgc
 3540
 tgttgagatc cagttcgatg taaccctctc 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 ctcgcgcggt
 3900
 tcggtgatga cggtgaaaac ctctgacaca tgcagctccc ggagacgggc 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 cggtgcgggc ctcttcgcta ttacgccagc
 4200
 tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt aacgccaggg ttttcccagt
 4260
 cagcagttg 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 tggctctgctt tcaagccctg cactgcgct acagtgccac
 4680
 caactgtaaa gcggtagtaa gctgcagtgg tcgactgggtg gtagcatata ctaccttatt
 4740
 tatacgctcc gagctgtttt tcagcatgct agcacccaac gccgagcgag agtatataac
 4800
 tcccatcatt gccacaagc ttatgccact tattagcgct cgctctgccg tttgcttagt
 4860
 cataatatct accgccgttt acgcagcaga cgctatctgc gacacaattg gatttgcat
 4920
 accgcgcatg tggatgtgta ttttaatgag atcaacctcc atgaagcgta actagggggc
 4980
 ctcccactga ggcactaccg gcttagcagc tgactaacac agtataaaac gtgagaagaa
 5040
 atcagtctca tgcgccatta gcgctaggct agttagcgct 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 aataaccgcg
 5400
 accgcattct ggacggggcc aactgcacgc tgatcgattc attgctgggt gatccccact
 5460
 gcgatggctt tcaaaacgaa aagtgggact tgttcatcga acgcagcaag gcattcagca
 5520
 actgctaccc atacgacgtg cccgaatata ccagcctgcg aagcctgatc gcgagctctg
 5580
 ggaccctgga gttcaccaat gagaacttca attggaccgg agtgacccaa aacggtggct
 5640
 ccagcgctg taaaagggga cccaataaca gtttctttag caagttgaat tggctttaca
 5700
 agagcggcaa tacttaccg atgttgaatg tgaccatgcc caacagtgc gactttgata
 5760
 aactgtacat atggggcgctg caccatccca gcacggaccg cgaacagata aacctgtacg
 5820
 tgcaggccag cgggaagata atcgtgagca ccaagcgag ccagcagacc atcattccca
 5880
 acattggcag ccgaccgtgg gtgcgcggtc tgagctcccg catcagcata tactggacca
 5940
 ttgtcaagcc gggagacatc ctgatcatca actctaattg caatcttctc gcccacgcg
 6000
 gctacttcaa gatgcagacc ggcaaaagca gtgtgatgag gagcgacgcc cccatcgaca
 6060
 cctgcaatag cgaatgcac acccccaatg gcagcatccc caacgacaag cttttccaga
 6120
 acgtgaataa gatcacctac ggcgcggtgc ccaagtacat caagcagaac accctgaagc
 6180
 tggccaccgg catgcgcaac atccccgagc gacagacacg gggcattttt ggcgcaatcg
 6240
 cagggttcat tgagaatggc tgggagggaa tggttaacgg ctggtacggc ttccgccatc
 6300

agaactctga aggaatcggc caagctgcgg atctgaagtc cacgcaagca gccatcaacc
 6360
 agatcaacgg caagcttaac cgcgtgattg aaaagacgaa cgagaaattc caccaaatag
 6420
 agaaagaatt cagcgagggtg gagggccgca tccaagacct cgagcgctac gtggaggaca
 6480
 ccaagatcga cctgtggagc tacaatgccg agctcctggt cgccttgga aaccaacaca
 6540
 ccattgacct gaccgacagc gagatgaata aactcttcga gaagacccgg 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 pU-1-3-p430-BGHKBGH

<400> 24

cctgtgcctt ctagttgcca gccatctggt gtttgcccct ccccggtgcc ttccttgacc
 60
 ctggaagggtg ccactccac tgccttttcc taataaaatg aggaaattgc atcgcatgtg
 120
 ctgagtaggt gtcattctat tctgggggggt 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 ctggcagtgt tcctgcgccg gttgcattcg attcctgttt
 780
 gtaattgtcc ttttaacagc gatcgcgtat ttcgtctcgc tcaggcgcaa tcacgaatga
 840
 ataacggttt ggttgatgcg agtgattttg atgacgagcg taatggctgg cctggtgaac
 900

aagtctggaa agaaatgcat aagcttttgc cattctcacc ggattcagtc gtcactcatg
960
gtgatttctc acttgataac cttatTTTTg acgaggggaa attaataagg 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 gtgggggtggg 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 atcgcctagg tttccgccgt gcctggtgtc gagggccac
1620
ccctgtaacc aacatcgatg ggggcctgct gctccttcgc taccttagga ccgttatagt
1680
tacgtcaagc ttggcgtaat catggtcata gctgtttcct gtgtgaaatt gttatccgct
1740
cacaattcca cacaacatac gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaattg
1800
agtgaactaa ctcacattaa ttgcgttgcg ctactgccc gctttccagt cgggaaacct
1860
gtcgtgccag ctgcattaat gaatcgcca acgcgcggg agaggcggtt tgcgtattgg
1920
gcgctcttcc gcttcctcgc tactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc
1980
ggtatcagct cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg
2040
aaagaacatg tgagcaaaaag gccagcaaaa ggccaggaa cgtaaaaagg ccgcgttgct
2100
ggcgtttttc cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca
2160
gaggtggcga aaccgacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct
2220
cgtgcgctct cctgttccga ccctgccgct taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc
2280
gggaagcgtg gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat ctcagttcgg tgtaggtcgt
2340
tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc cccggttcag cccgaccgct gcgccttata
2400
cggtaactat cgtcttgagt ccaaccgggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc
2460
cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgtaggcggg gctacagagt tcttgaagtg
2520
gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtatttggg atctgcgctc tgctgaagcc
2580
agttaccttc gaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag
2640

cggtggtttt tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga
 2700
 tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggAAC gaaaactcac gttaagggat
 2760
 tttggtcatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaaatt aaaaatgaag
 2820
 ttttaaataca atctaaagta tatatgagta aacttgggtc gacagttacc aatgcttaat
 2880
 cagtgaggca cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagtgtg 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 tggatatggc tcattcagct ccggttccca
 3240
 acgatcaagg cgagttacat gatcccccat gttgtgcaaa aaagcgggta gtccttcgg
 3300
 tcctccgatc gttgtcagaa gtaagttggc cgcagtgtta tcactcatgg 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 ggaataagg gcgacacgga aatgttgaat
 3720
 actcactc 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 cgggtgttg 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 gccctccct
 4380

tttggctctg ggtatthtagc ttccctccca cttctcattc cactttctcc acctgcacct
 4440
 tttccatctc ctctccaact cgccgccatg agacccgagg gagtttcgcg gggccgcgcc
 4500
 tcctctgtct ccatctccaa ctagtgtcga cctctatthg aggacccgcc gagtacccca
 4560
 caagagtatg taaaagctg tcattctcaa ctactgagaa taatatcaaa gctaaagata
 4620
 aaccctgagg agtttccacg ggaaccagag tctaggctcg tgcgcggata catcgaatac
 4680
 gccagcctag agcgtaagcc acatacgcg cttccttgct tccagcgcggt gaacctacac
 4740
 attgacgggg aatthttgat ccataaaatg ctagcgthca atgctgcgat gcgccccatcc
 4800
 gcagaagagt tgttgctcta ccaatgtht atgaatctgt aggatgacta acagatthtg
 4860
 ggtggagacg gcgtgggcga tactgtataa agthgtacta cttaccagcc cagtcagtgt
 4920
 gctgtagtgc caccacctgt aaagctgtga taagctgcag ttgcggccgc cgggtac
 4977

<210> 25

<211> 6678

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

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

<400> 25

cctgtgcctt ctagttgcca gccatctgtt gthtgccct ccccggtgcc ttccttgacc
 60
 ctggaagggtg ccaactccac tgtcctthcc taataaaatg aggaaattgc atcgcatthgt
 120
 ctgagtaggt gtcattctat tctgggggggt ggggtggggc aggacagcaa gggggaggat
 180
 tgggaagaca atagcaggca tgctggggat gcggtgggct ctatggatcc tagggataac
 240
 agggtaatcg atthattcaa caaagccacg thgtgtctca aaatctctga thttacatth
 300
 cacaagataa aaatatatca tcatgaacaa taaaactgtc tgcttacata aacagtaata
 360
 caaggggtgt tatgagccat attcaacggg aaacgtctth ctcgaggccg cgattaaatt
 420
 ccaacatgga tgctgattta tatgggtata aatgggctcg cgataatgtc gggcaatcag
 480
 gtgcgacaat ctatcgatth tatgggaagc ccgatgcgcc agagthgtth ctgaaacatg
 540
 gcaaaggtag cgttgccaat gatgthacag atgagatggt cagactaaac tggctgacgg
 600
 aatthtatgcc tcttccgacc atcaagcatt thtatccgtac tctgatgat gcatggthac
 660
 tcaccactgc gatccccggg aaaacagcat tccaggthatt agaagaatat cctgatthcag
 720
 gtgaaaatat thttgatgcg ctggcagtht tctgcgccg gthgcattcg atthctgtht
 780
 gtaatthtcc thttaacagc gatcgcgtht thctgtctgc tcaggcgcaa tcacgaatga
 840
 ataacgtht gthtgatgcg agthattht atgacgagcg taatggctgg cctgthgaac
 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 gtgggggtggg gcaggacagc aagggggagg attggaaga
1380
caatagcagg catgctgggg atgcggtggg ctctatggat ccgaccctcc ccggggctaa
1440
aaagctgcgt cttcacgccc gaggcgctta ttgccactg ggtacggggc gcgcttttat
1500
atgtgtaacg tcccaccggt gtgacgcacg tactacggtt gttctaaata gctgtccccg
1560
tgattgcctc ggctgcacac atcgccatagg tttccgccgt gcctggtgtc gagggccac
1620
ccctgtaacc aacatcgatg ggggcctgct gtccttcgc taccttagga ccgttatagt
1680
tacgtcaagc ttggcgtaat catggtcata gctgtttcct gtgtgaaatt gttatccgct
1740
cacaattcca cacaacatac gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaattg
1800
agtgaactaa ctcacattaa ttgcgttgcg ctactgccc gctttccagt cgggaaacct
1860
gtcgtgccag ctgcattaa gaatcgcca acgcgcggg agaggcggtt tgcgtatttg
1920
gcgctcttcc gcttcctcgc tctactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc
1980
ggtatcagct cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg
2040
aaagaacatg tgagcaaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct
2100
ggcgtttttc cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca
2160
gaggtggcga aaccgacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct
2220
cgtgcgctct cctgttccga ccctgccgct taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc
2280
gggaagcgtg gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat ctgagttcgg ttaggtcgt
2340
tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc cccggttcag cccgaccgct gcgccttate
2400
cggtaaactat cgtcttgagt ccaaccgggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc
2460
cactggtaac aggattagca gagcgaggta ttaggcgggt gctacagagt tcttgaagt
2520
gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtatttggt atctgcgctc tgctgaagcc
2580
agttaccttc gaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag
2640

cggtggtttt tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga
 2700
 tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaaac gaaaactcac gttaagggat
 2760
 tttggtcatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaat aaaaatgaag
 2820
 ttttaaataca atctaaagta tatatgagta aacttgggtct 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
 tcctccgatc gttgtcagaa gtaagttggc cgcagtgtta tcactcatgg 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
 actcactc 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 cgggtgttg cgggtgtcgg ggctggctta actatgcggc
 4080
 atcagagcag attgtactga gagtgcacca tatgcgggtg 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 gccctccct
 4380

tttggctctg ggtatthtagc ttccctccca 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 acatacgcg cttccttgct tccagcgcggt gaacctacac
 4740
 attgacgggg aatttttgat ccataaaatg ctagcggttca atgctgcatg gcgcccattc
 4800
 gcagaagagt tgttgctcta cccaatgttt atgaatctgt aggatgacta acagatttgg
 4860
 ggtggagacg gcgtgggcca tactgtataa agttgtacta cttaccagcc cagtcatgtg
 4920
 gctgtagtgc caccacctgt aaagctgtga taagctgcag ttgcggccgc cgatggaggc
 4980
 aaaattgttc gtgctgttct gcgccttcac tgctctgaag gcagacacca tctgctggg
 5040
 ttaccagcc aataattcca ccgacacggt ggataccatc ctggagaaga acgtgaccgt
 5100
 gactcattcc gtgaacctct tggagaactc acacaatggt aaattgtgca gccttaacgg
 5160
 caaagccccg ctgcaattgg ggaattgtaa cgtggccgga tggatactgg ggaacccccg
 5220
 gtgcgacctt ctctgaccg ccaacagttg gtcctacatc attgagacga gcaacagcaa
 5280
 gaatggcgcc tgctatcctg gggagttcgc tgactacgag gagctgcgcg agcagttgtc
 5340
 tacagtcagc agcttcgaaa gattcgagat cttcccaaag gccactagct ggcccaacca
 5400
 cgatactacc aagggcacta cagtgaattg cagccacagc ggtgccaata gcttctaccg
 5460
 caacctgctg tggatcgtga agaagggtaa cagctacccc aagctgagca aatcttacac
 5520
 aaacaacaaa ggcaaagagg tgttggttat ctggggcgctg catcatcccc caaccgactc
 5580
 cgatcagcaa acctgtacc agaacaacca cacctacgtg agcgtcggtg gctctaagta
 5640
 ttaccagcgc ttcacccccg aaatcgtcgc acgaccgaag gtgagagggc aggcggggag
 5700
 aatgaactac tactggacct tgctggatca aggcgacact attaccttcg aggctaccgg
 5760
 caacttgatc gccccgtggc acgcgttcgc cctcaataaa ggatctaata gcggcataat
 5820
 gatgagtgat gccacgtgc ataactgcac cacgaagtgc cagaccctc acggcgccact
 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 gcaagggttc ggctacgccg cagaccagaa
 6120

gagcacccaa atagcaatcg atggcatctc caacaagggtg aacagcgtga tcgaaaagat
 6180
 gaacatccag ttcacaagcg tggggaagga gttcaataac ctggaaaagc gcatcgagaa
 6240
 tctgaacaag aaggttgacg atgggttcct cgatgtctgg acctataacg ccgagctcct
 6300
 gatactgctt gagaacgagc gcaccctgga cttccacgac ttcaacgtga aaaacctgta
 6360
 cgaaaagggtc 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 Leu Glu Asn Ser His Asn Gly Lys Leu Cys Ser Leu Asn Gly Lys
      50      55      60

Ala Pro Leu Gln Leu Gly Asn Cys Asn Val Ala Gly Trp Ile Leu Gly
      65      70      75      80

Asn Pro Glu Cys Asp Leu Leu Leu Thr Ala Asn Ser Trp Ser Tyr Ile
      85      90      95

Ile Glu Thr Ser Asn Ser Lys Asn Gly Ala Cys Tyr Pro Gly Glu Phe
      100      105      110

Ala Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Thr Val Ser Ser Phe
      115      120      125

Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Ala Thr Ser Trp Pro Asn His Asp
      130      135      140

Thr Thr Lys Gly Thr Thr Val Ser Cys Ser His Ser Gly Ala Asn Ser
      145      150      155      160

Phe Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Ile Val Lys Lys Gly Asn Ser Tyr Pro
      165      170      175

Lys Leu Ser Lys Ser Tyr Thr Asn Asn Lys Gly Lys Glu Val Leu Val
      180      185      190

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

```

```

Tyr Gln Asn Asn His Thr Tyr Val Ser Val Gly Ser Ser Lys Tyr Tyr
 210                               215                220

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

Ala Gly Arg Met Asn 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

Fig. 1A

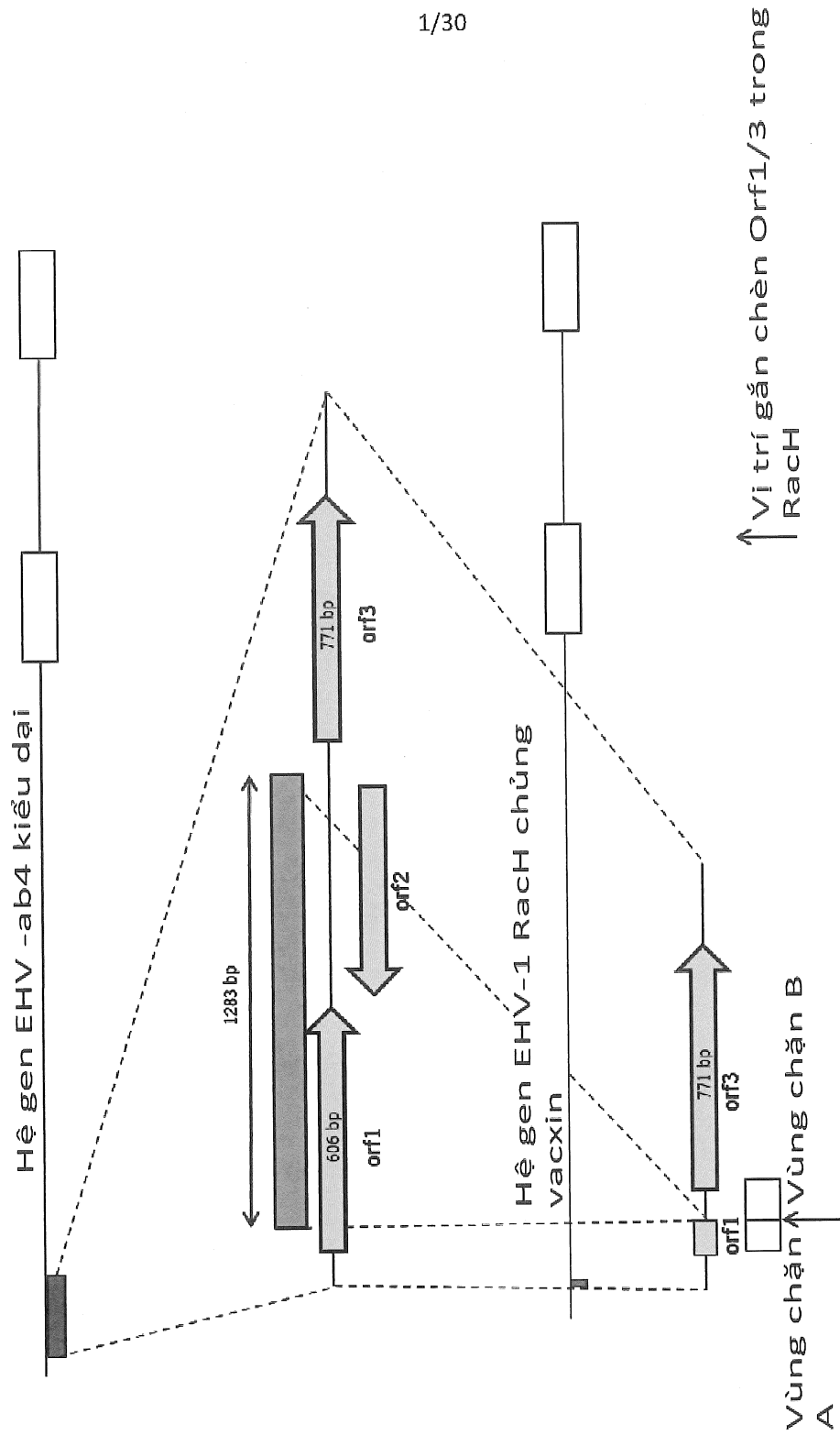


Fig. 1B

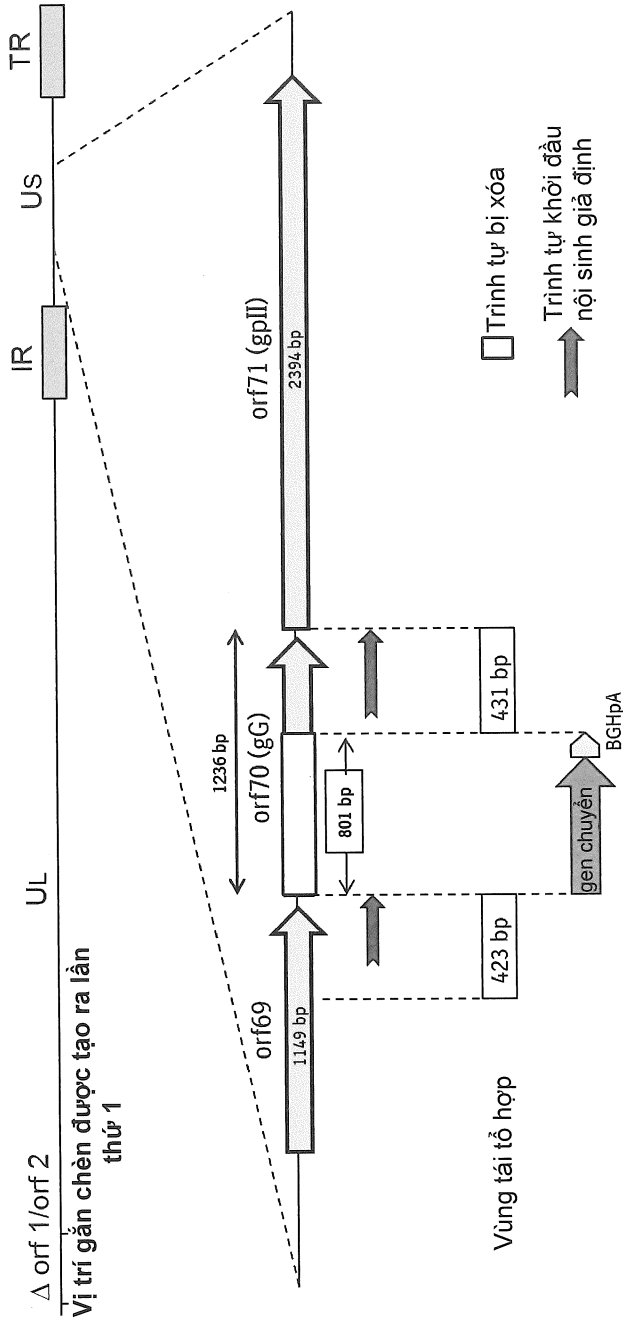
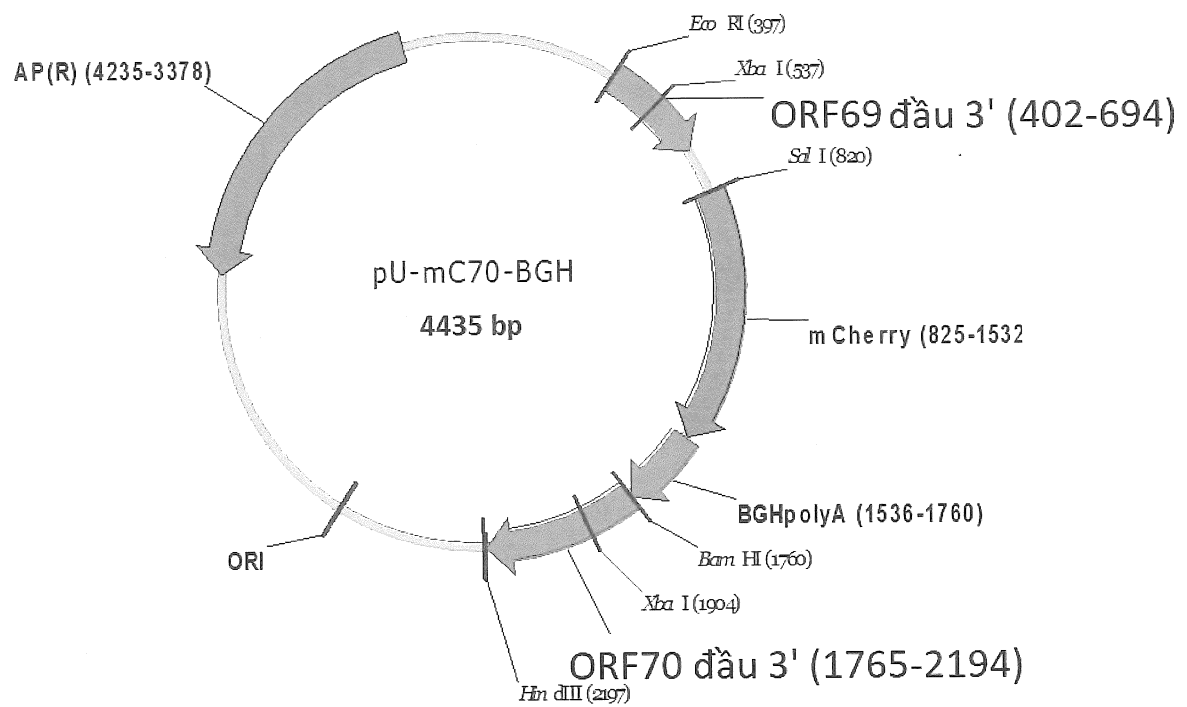


Fig. 2

3/30



ORF69 đầu 3' Trình tự ADN hệ gen virus chặn vị trí gắn chèn ngược chiều

ORF70 đầu 3' Trình tự ADN hệ gen virus chặn vị trí gắn chèn xuôi chiều

BGHpolyA Trình tự polyadenyl hóa

ORI Điểm khởi đầu sao chép của vector plasmit

Apr Gen kháng ampicilin Betalactamase

*Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Sal*I, *Xba*I cho biết các vị trí phân cắt endonucleaza giới hạn

Fig. 3a

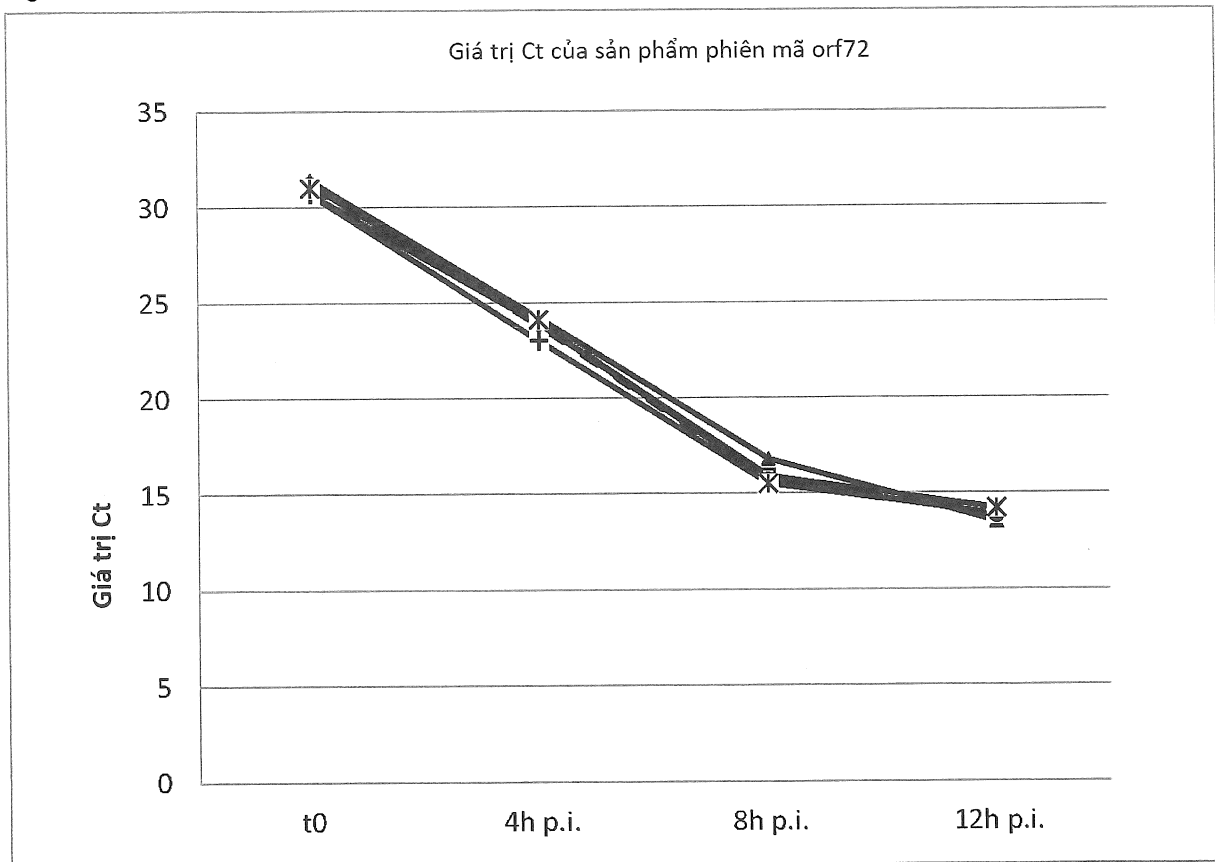


Fig. 3b

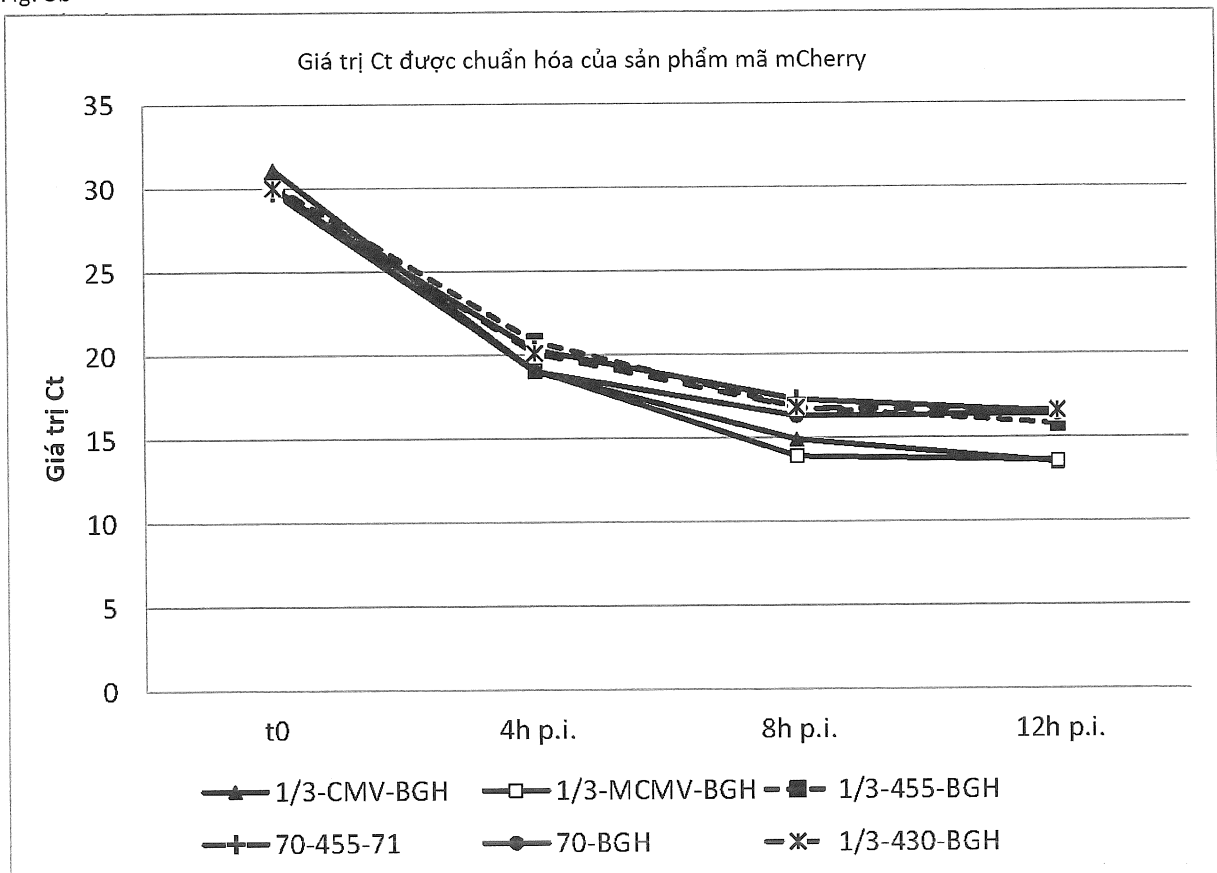


Fig. 4

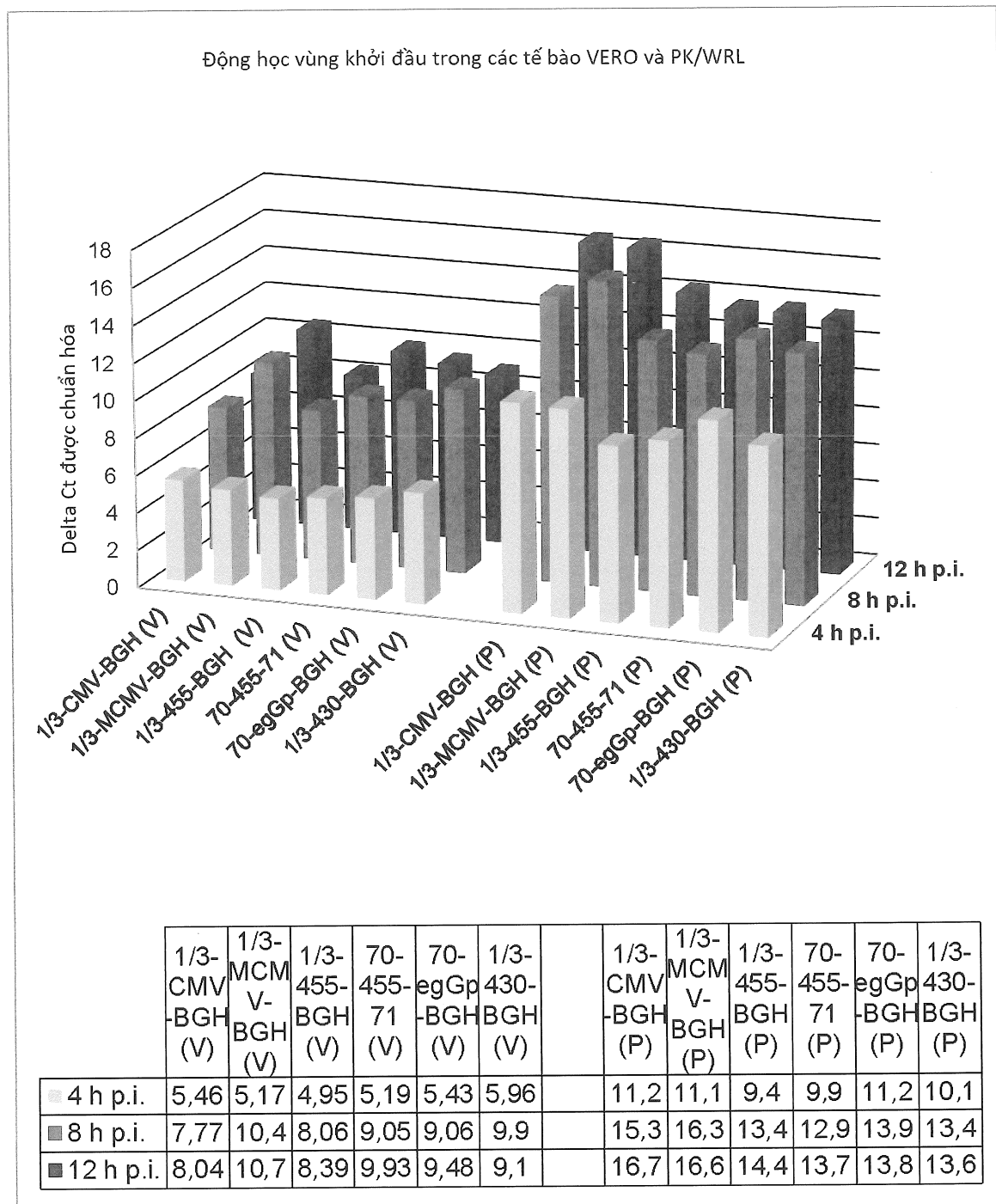
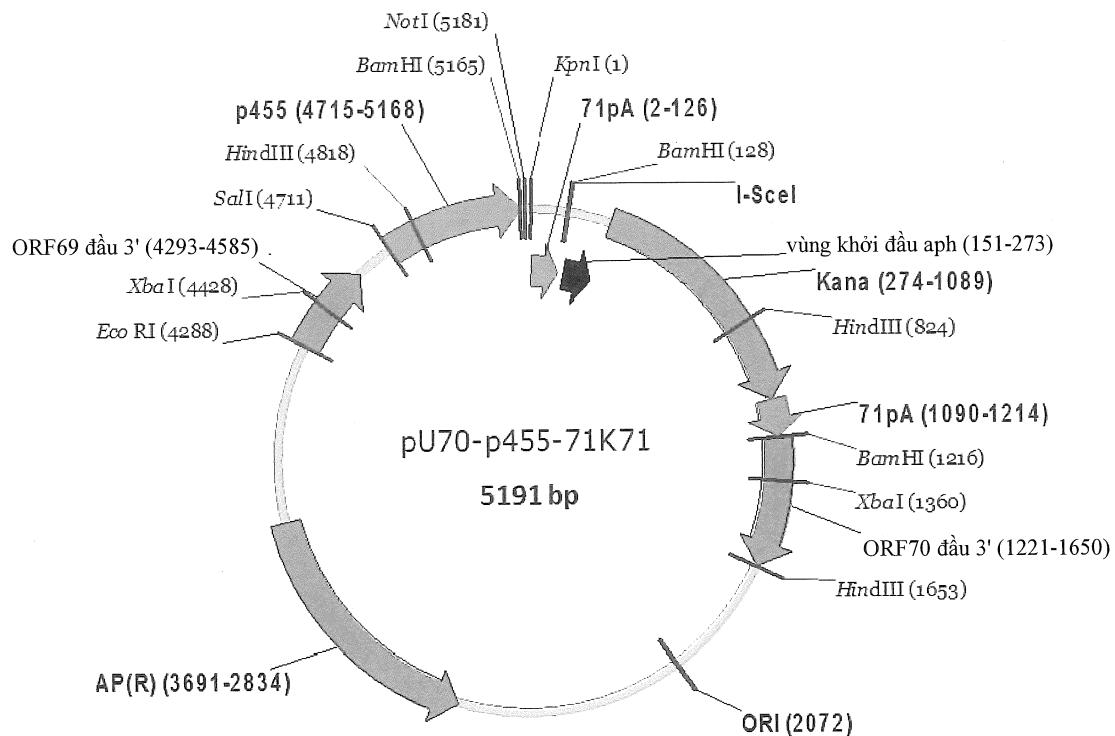


Fig. 5



ORF69 đầu 3' Trình tự ADN hệ gen virus chặn vị trí gắn chèn ngược chiều

ORF70 đầu 3' Trình tự ADN hệ gen virus chặn vị trí gắn chèn xuôi chiều

p455 Vùng khởi đầu điều khiển sự biểu hiện của gen chuyển

71pA Trình tự polyadenyl hóa

I-SceI Vị trí phân cắt cho I-SceI

Vùng khởi đầu aph Vùng khởi đầu của sinh vật nhân sơ điều khiển sự biểu hiện của gen kháng kanamycin

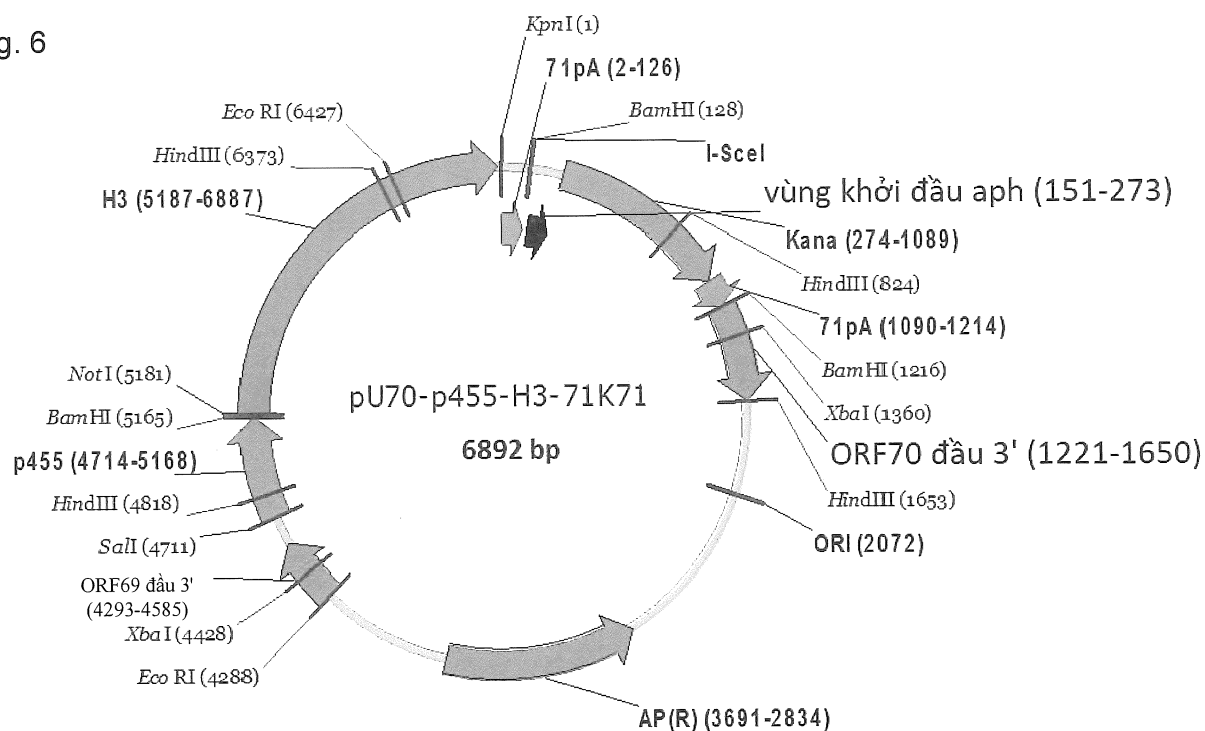
Kana ORF kháng kanamycin

ORI Điểm khởi đầu sao chép của vector plasmit

Apr Kháng ampicilin

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

Fig. 6



ORF69 đầu 3' Trình tự ADN hệ gen virus chặn vị trí gắn chèn ngược chiều

ORF70 đầu 3' Trình tự ADN hệ gen virus chặn vị trí gắn chèn xuôi chiều

p455 Vùng 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 cho I-SceI

Vùng khởi đầu aph Vùng khởi đầu của sinh vật nhân sơ điều khiển sự biểu hiện của gen kháng kanamycin

Kana ORF kháng kanamycin

ORI Điểm khởi đầu sao chép của vector plasmit

Apr Kháng ampicillin

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

Fig. 7

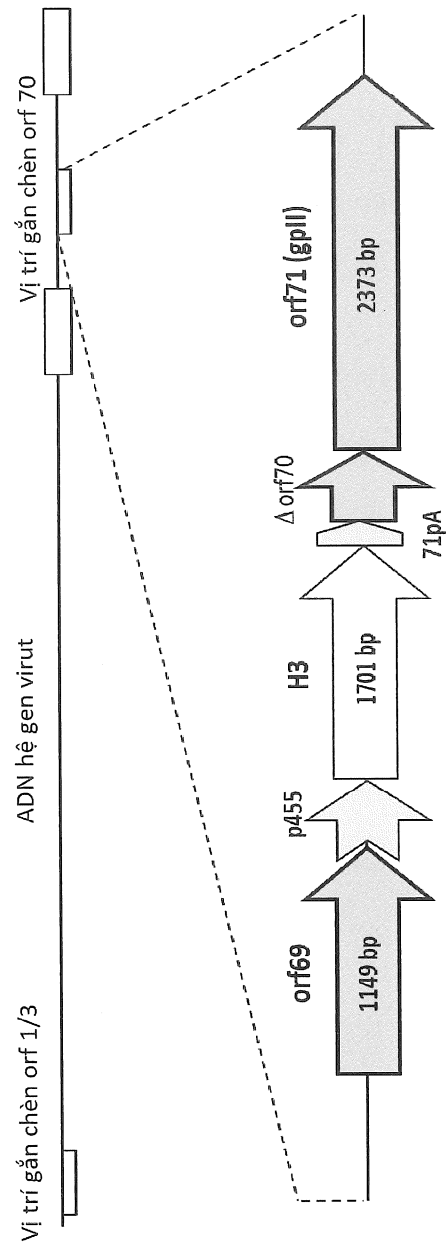
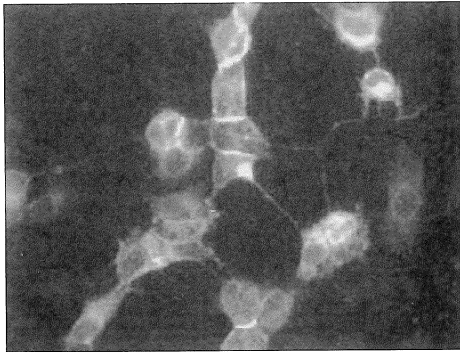


Fig. 8

rEHV-1 RacH-SE70-455-H3



Kháng thể đơn dòng kháng H3

Fig. 9

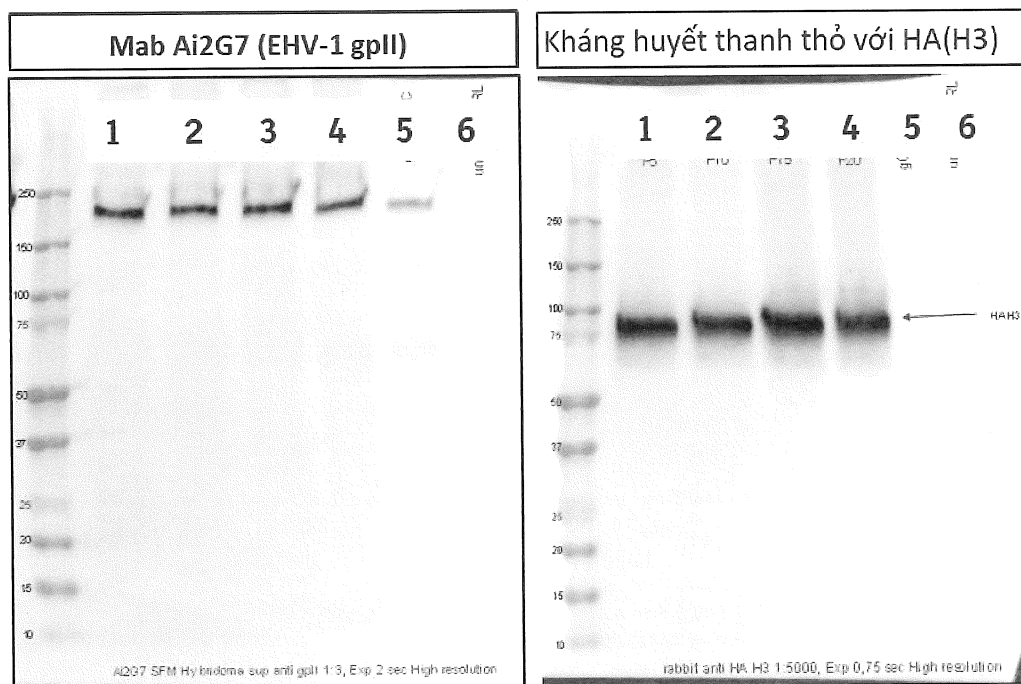


Fig. 10a

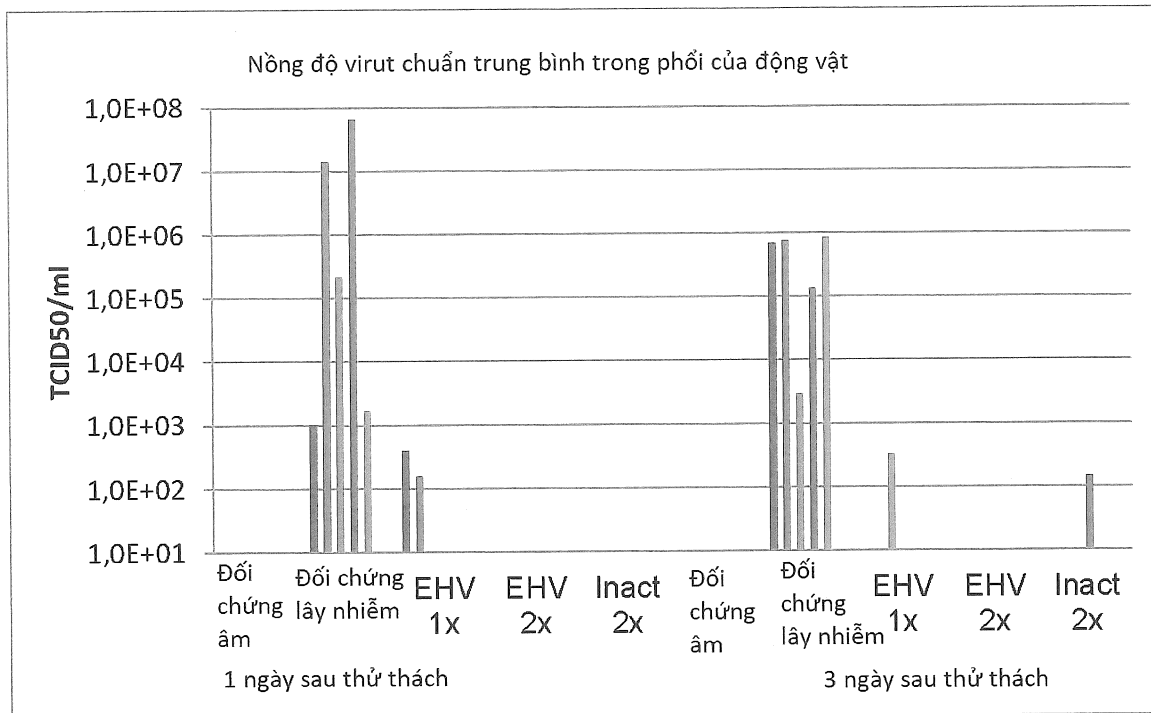


Fig. 10b

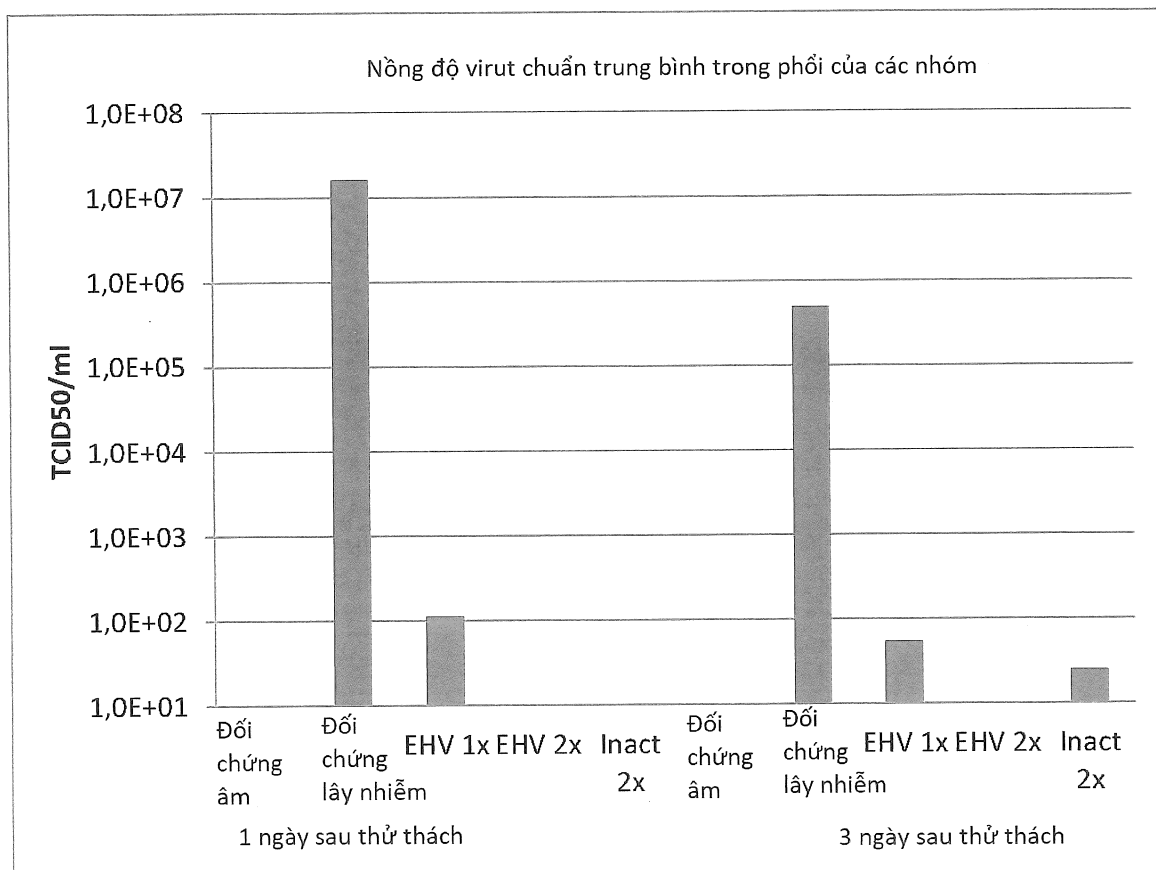
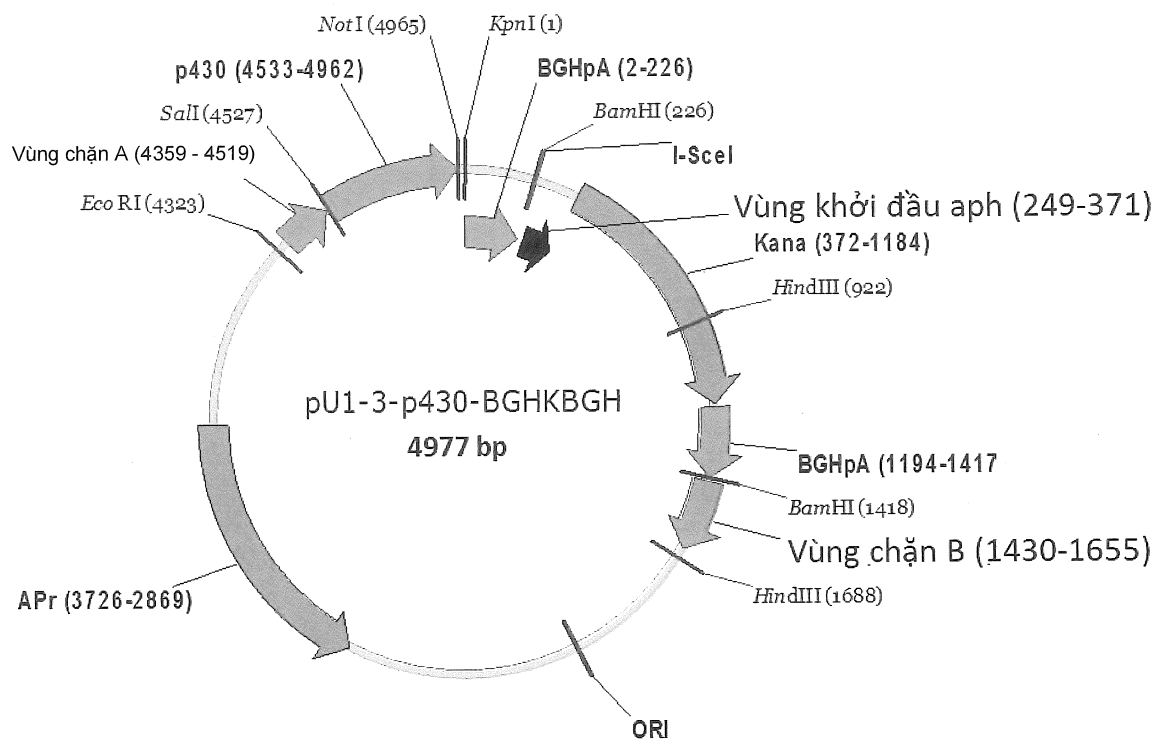
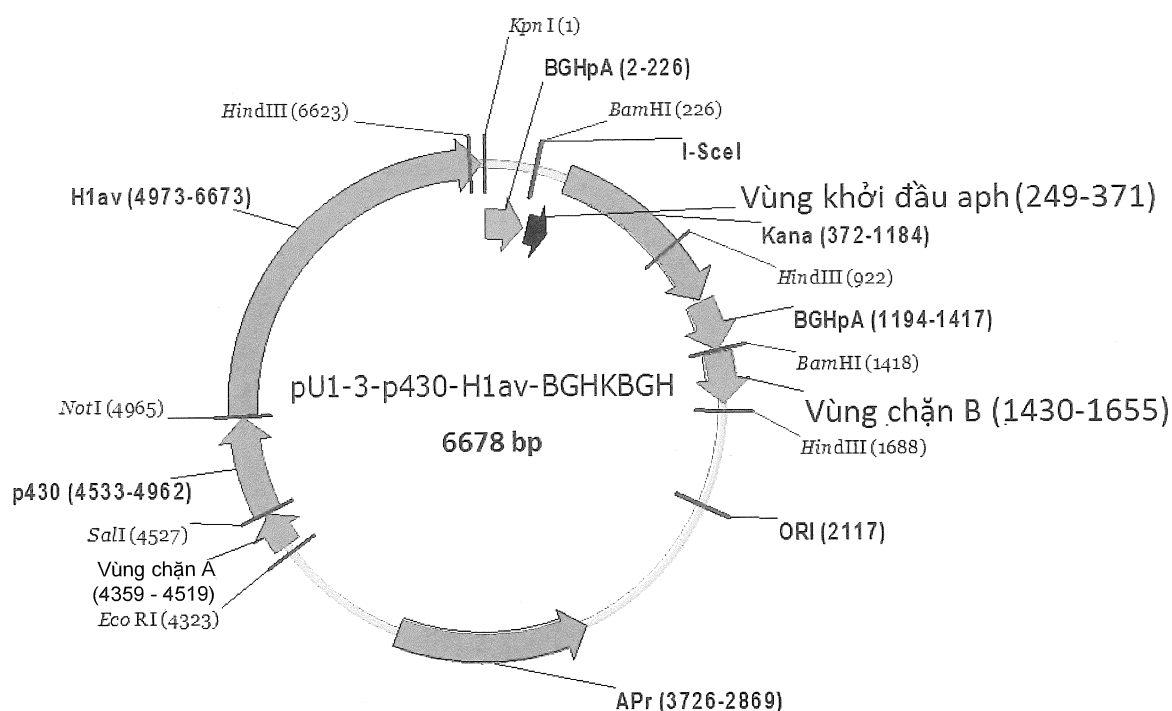


Fig. 11



Vùng chặn A	Trình tự ADN hệ gen virus chặn vị trí gắn chèn ngược chiều
Vùng chặn B	Trình tự ADN hệ gen virus chặn vị trí gắn chèn xuôi chiều
p430	Vùng khởi đầu điều khiển sự biểu hiện của gen chuyển
BGHPA	Trình tự polyadenyl hóa
I-Sce1	Vị trí phân cắt cho I-Sce1
Vùng khởi đầu aph	Vùng khởi đầu của sinh vật nhân sơ điều khiển sự biểu hiện của gen
Kana	ORF kháng kanamycin
ORI	Điểm khởi đầu sao chép của vector plasmit
Apr	Kháng ampicillin
EcoRI, SalI, NotI, HindIII, KpnI, BamHI cho biết các vị trí phân cắt endonucleaza giới hạn	

Fig. 12



Vùng chặn A	Trình tự ADN hệ gen virus chặn vị trí gắn chèn ngược chiều
Vùng chặn B	Trình tự ADN hệ gen virus chặn vị trí gắn chèn xuôi chiều
p430	Vùng khởi đầu điều khiển sự biểu hiện của gen chuyển
BGHPA	Trình tự polyadenyl hóa
I-SceI	Vị trí phân cắt cho I-SceI
Vùng khởi đầu aph	Vùng khởi đầu của sinh vật nhân sơ điều khiển sự biểu hiện của gen
Kana	ORF kháng kanamycin
ORI	Điểm khởi đầu sao chép của vector plasmit
Apr	Kháng ampicillin
EcoRI, SalI, NotI, HindIII, KpnI, BamHI cho biết các vị trí phân cắt endonucleaza giới hạn	

Fig. 13

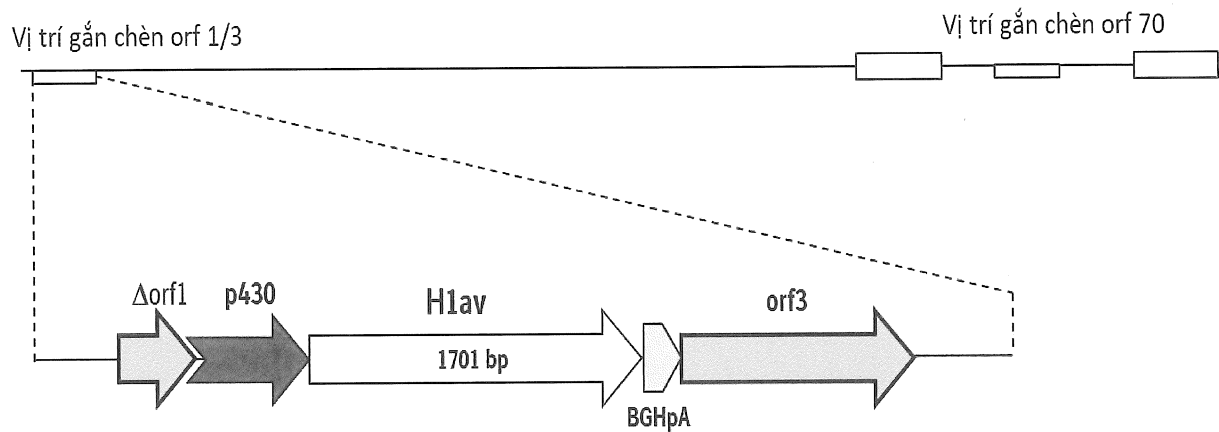
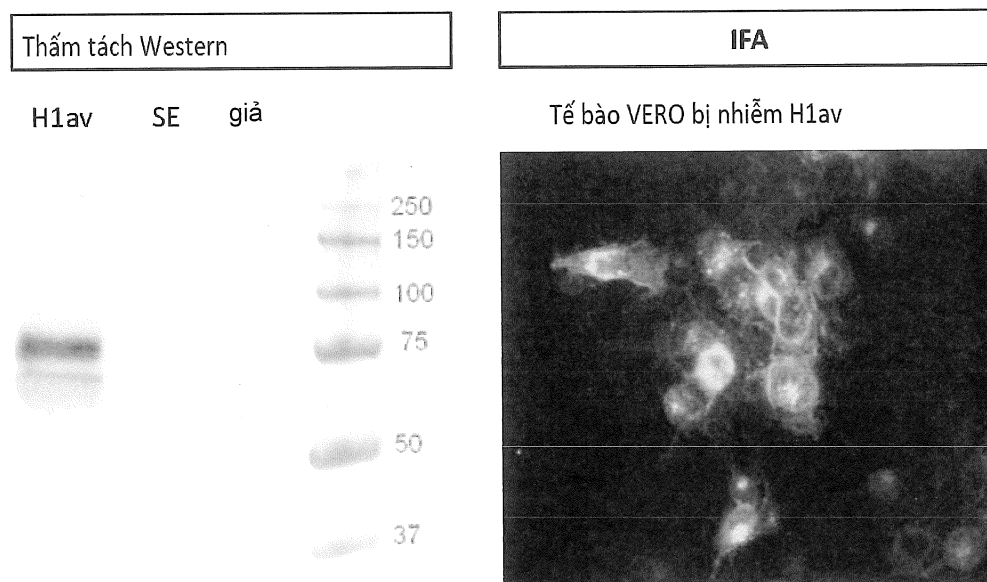


Fig. 14



Kháng thể đơn dòng kháng PA-34929

H1av = rEHV-1 RacH-SE1/3-430-H1av

SE = rEHV-RacH-SE (đối chứng)

Giả dược = Tế bào không bị nhiễm (đối chứng)

Kháng thể đơn dòng kháng H1-C102

Fig. 15

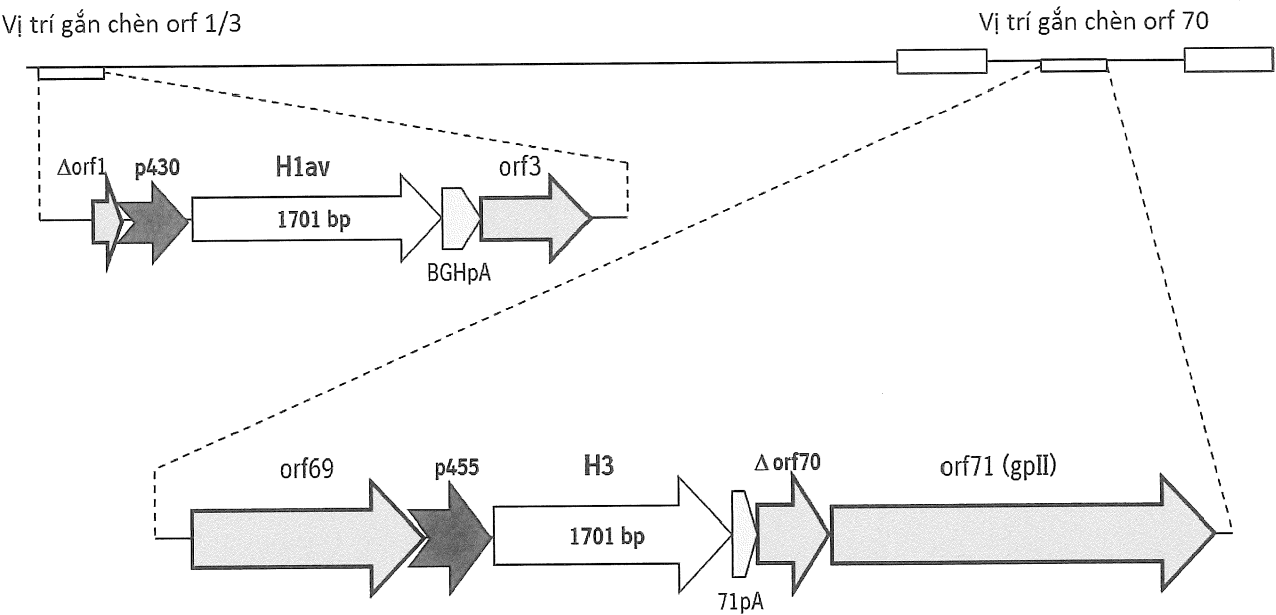


Fig. 16

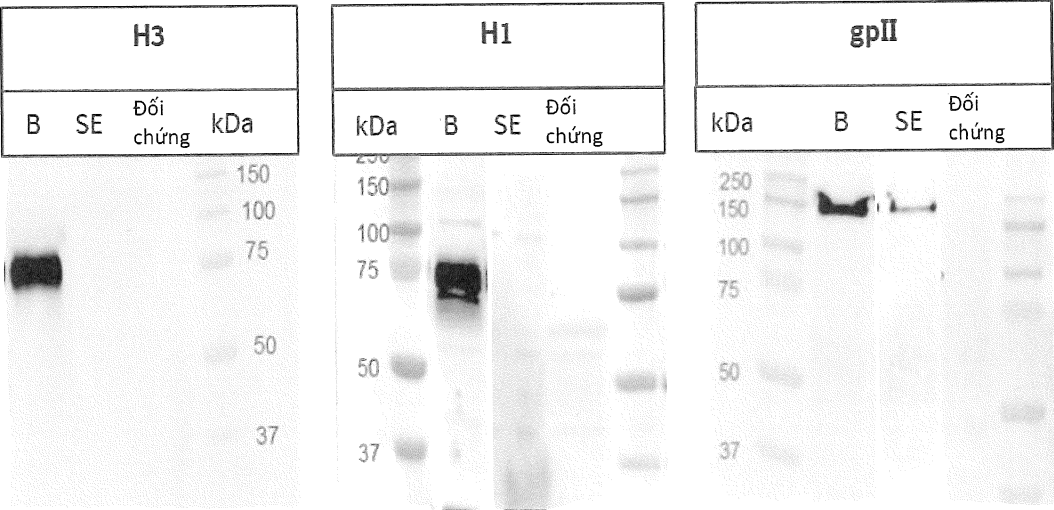


Fig. 17

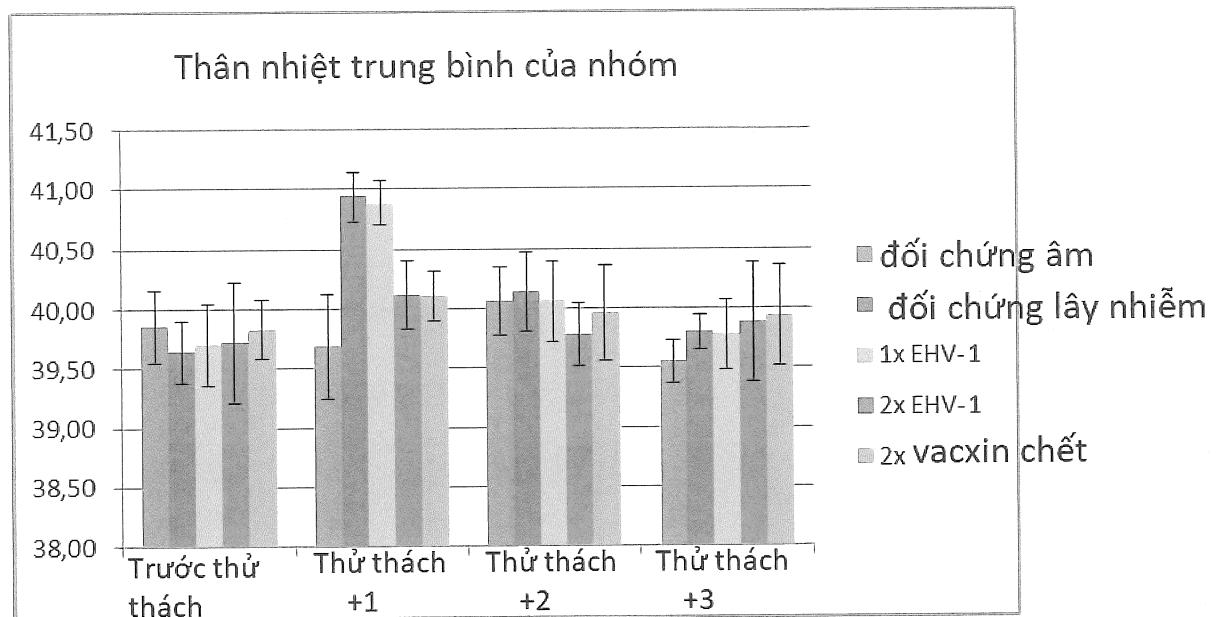


Fig. 18

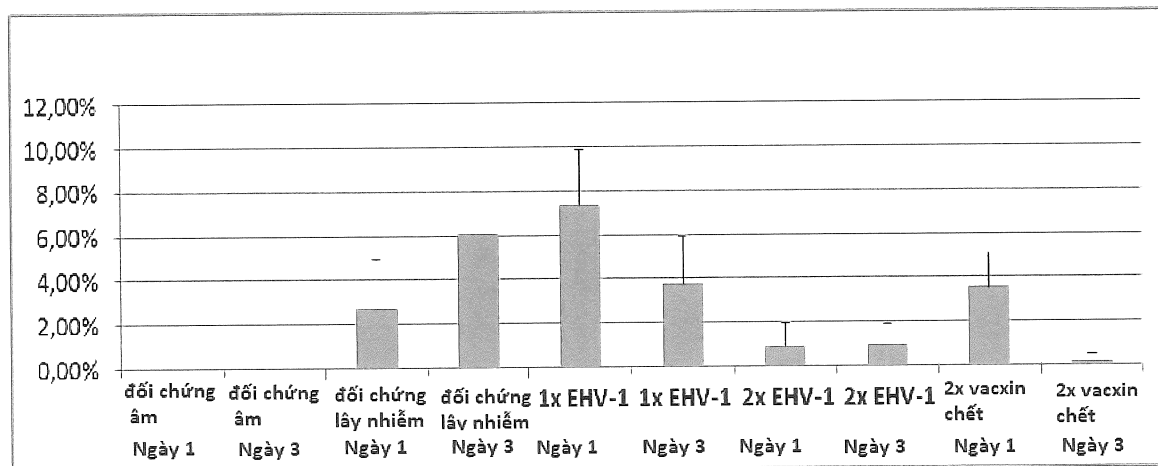


Fig. 19

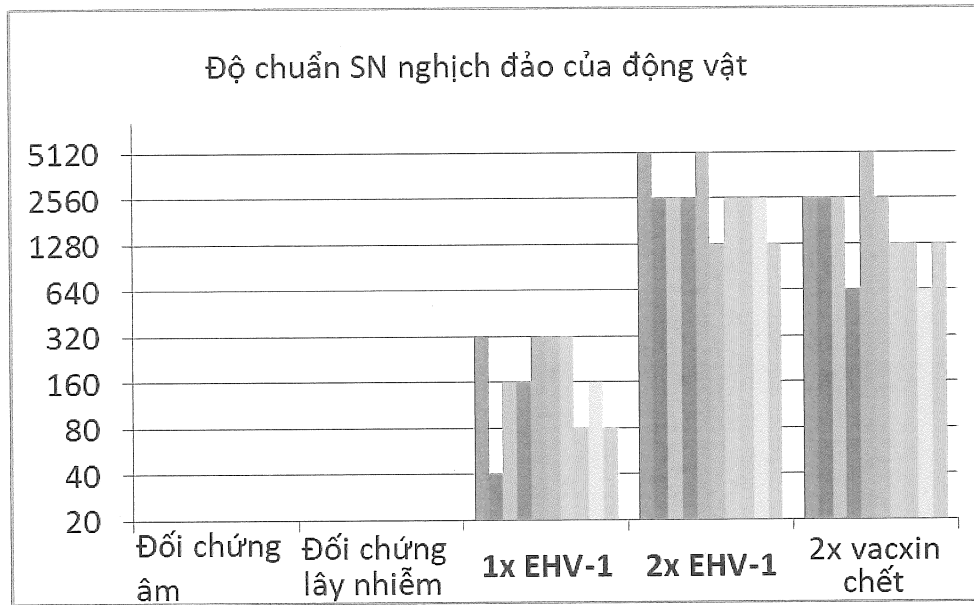


Fig. 20

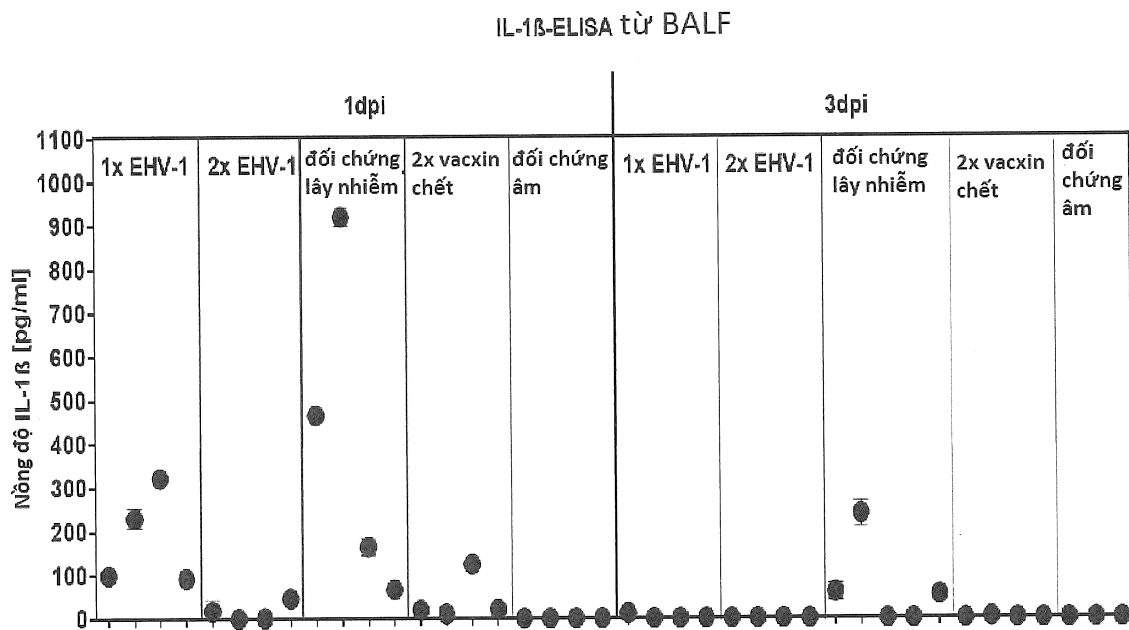
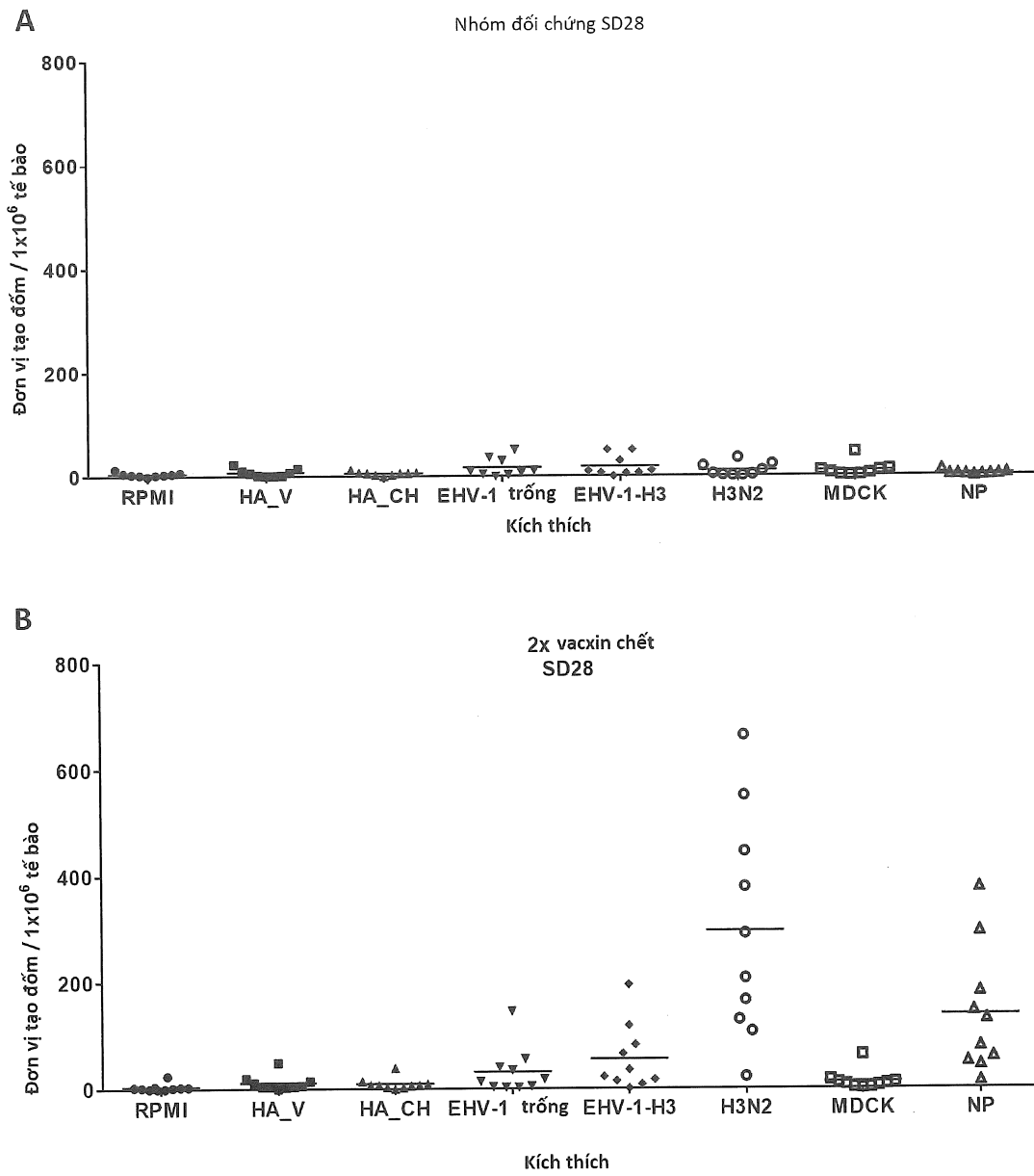


Fig. 21



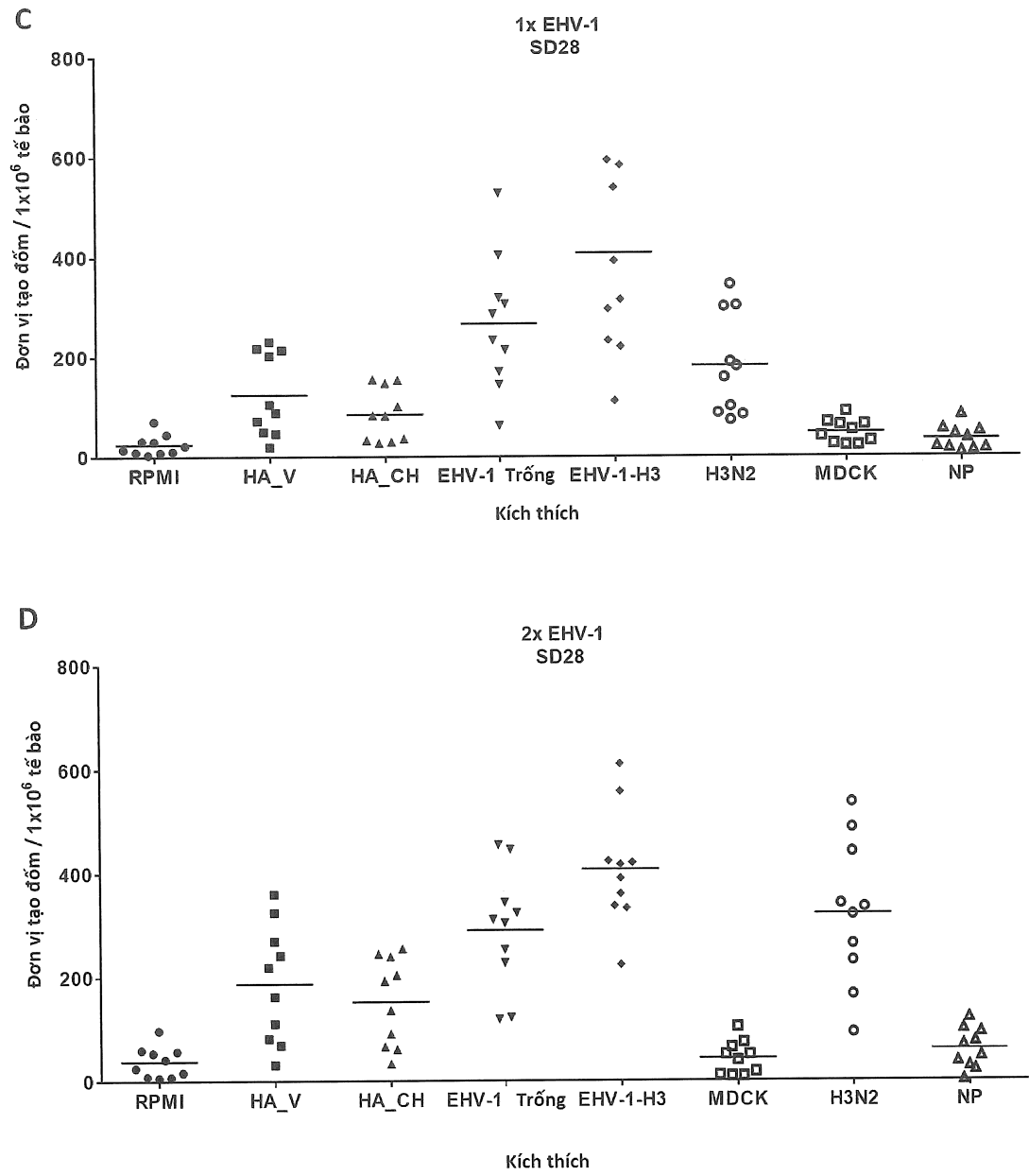
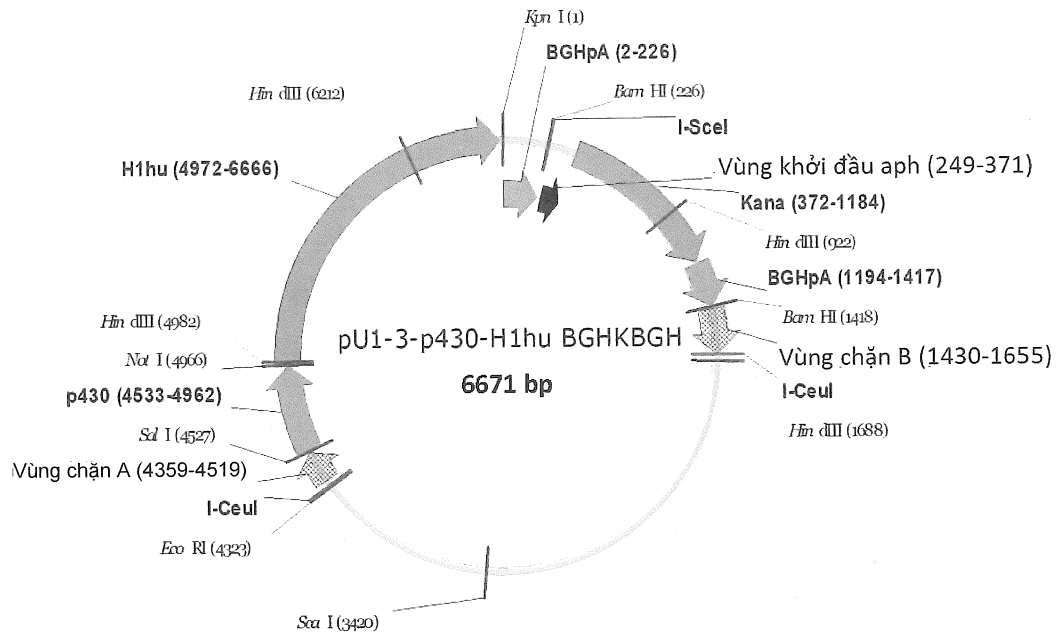
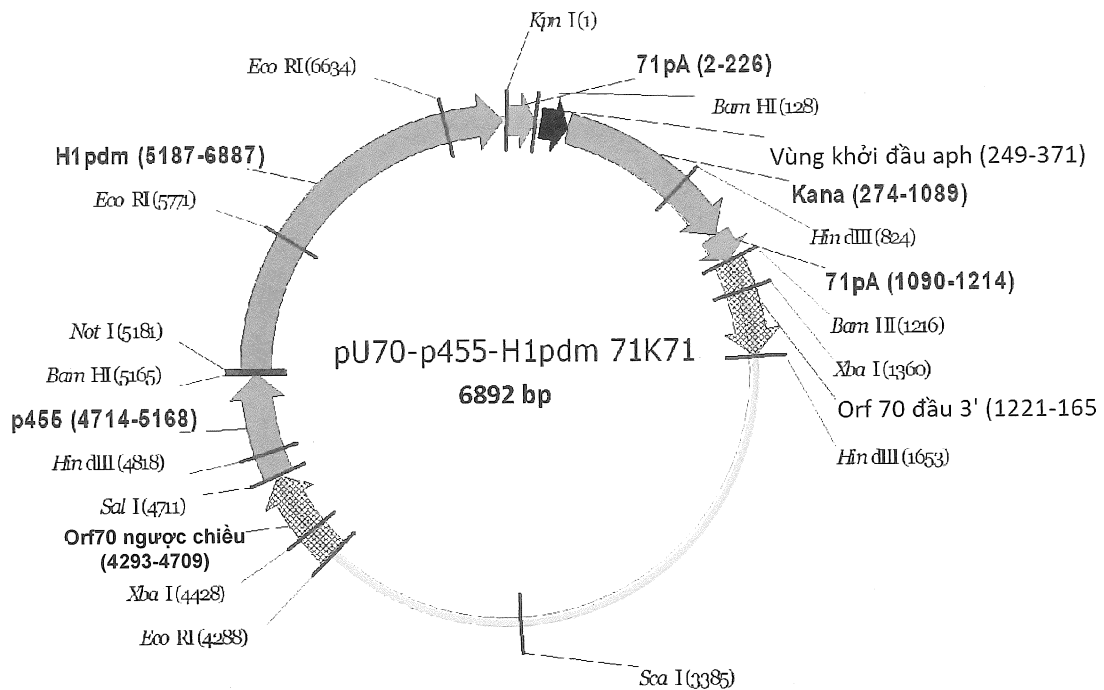


Fig. 22



- Vùng chặn A** Trình tự ADN hệ gen virus chặn vị trí gắn chèn ngược chiều
- Vùng chặn B** Trình tự ADN hệ gen virus chặn vị trí gắn chèn xuôi chiều
- p430** Vùng khởi đầu điều khiển sự biểu hiện của gen chuyển
- BGHPA** Trình tự polyadenyl hóa
- I-Sce1** Vị trí phân cắt cho I-Sce1
- Vùng khởi đầu aph** Vùng khởi đầu của sinh vật nhân sơ điều khiển sự biểu hiện của gen kháng kanamycin
- Kana** ORF kháng kanamycin
- ORI** Điểm khởi đầu sao chép của vector plasmid
- Apr** Kháng ampicillin
- EcoRI, SalI, NotI, HindIII, KpnI, BamHI cho biết các vị trí phân cắt endonuclease giới hạn

Fig. 23



- Vùng chặn A** Trình tự ADN hệ gen virus chặn vị trí gắn chèn ngược chiều
Vùng chặn B Trình tự ADN hệ gen virus chặn vị trí gắn chèn xuôi chiều
p430 Vùng khởi đầu điều khiển sự biểu hiện của gen chuyển
BGHpA Trình tự polyadenyl hóa
I-Sce1 Vị trí phân cắt cho I-Sce1
Vùng khởi đầu aph Vùng khởi đầu của sinh vật nhân sơ điều khiển sự biểu hiện của gen
Kana ORF kháng kanamycin
ORI Điểm khởi đầu sao chép của vector plasmit
Apr Kháng ampicillin
EcoRI, Sall, NotI, HindIII, KpnI, BamHI cho biết các vị trí phân cắt endonucleaza giới hạn

Fig. 24

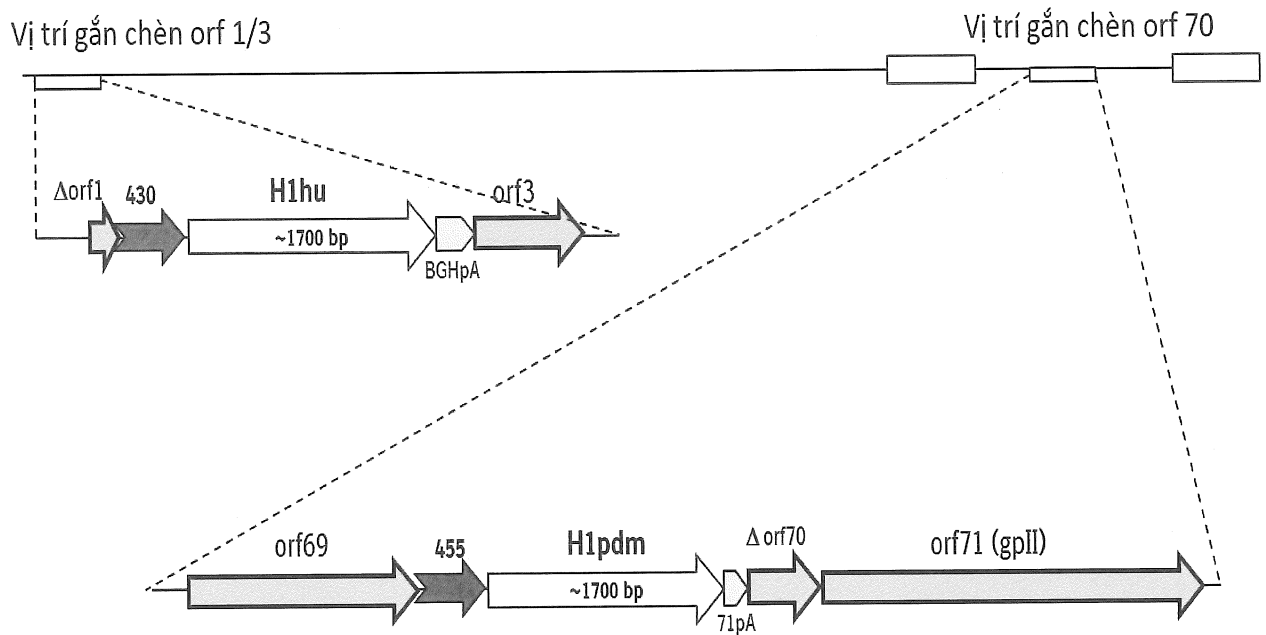


Fig. 25

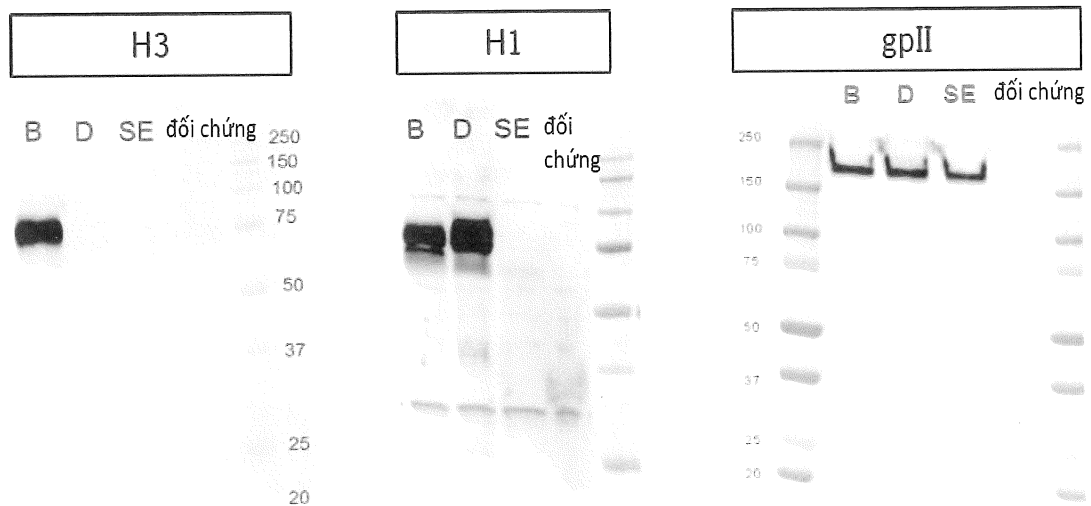


Fig. 26

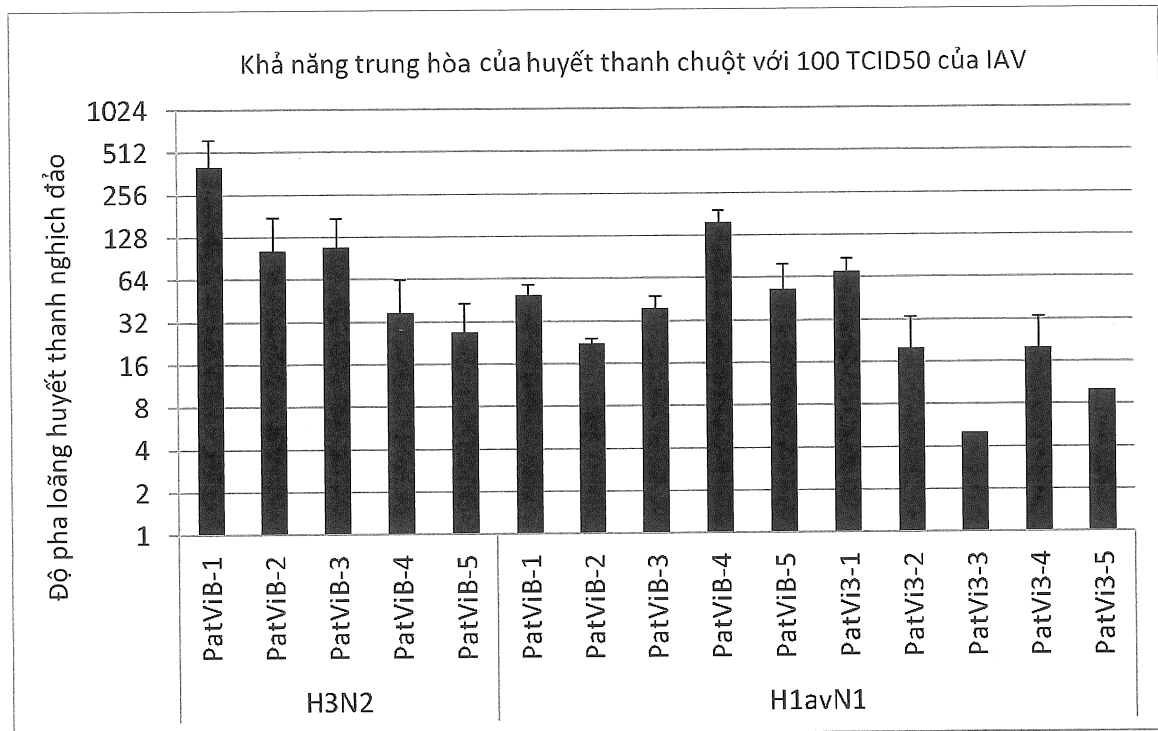


Fig. 27

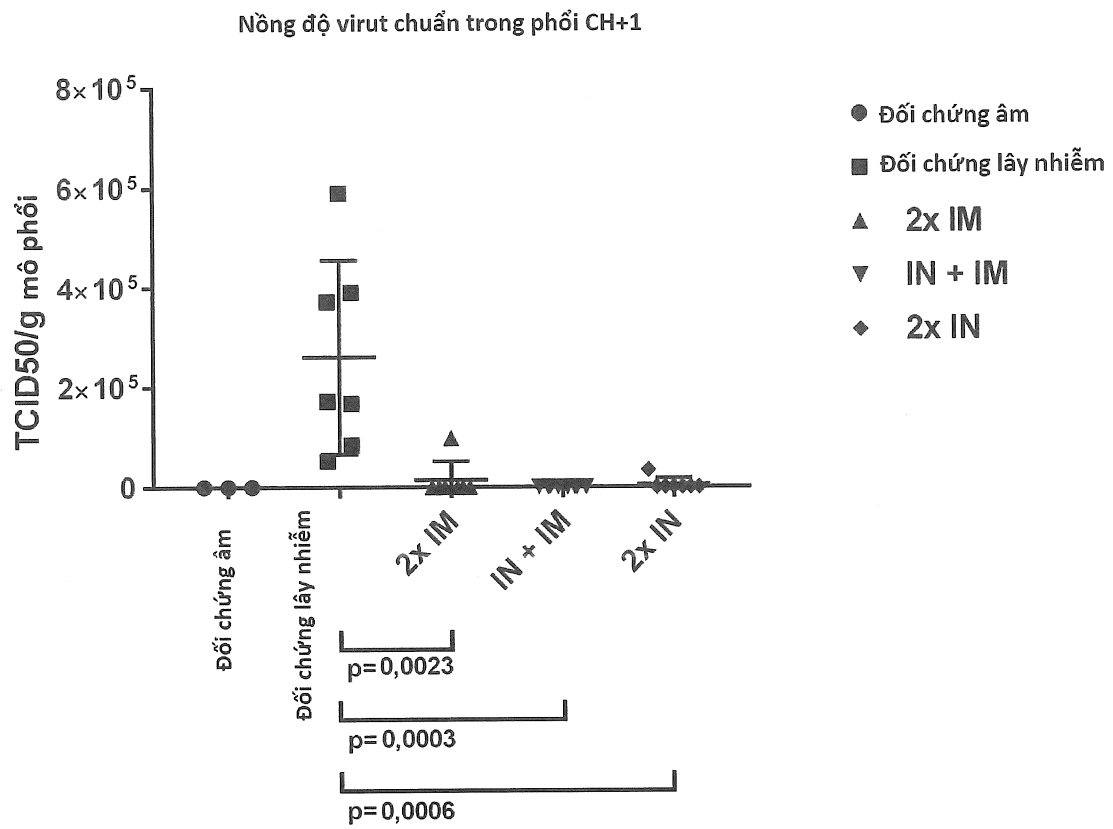


Fig. 28

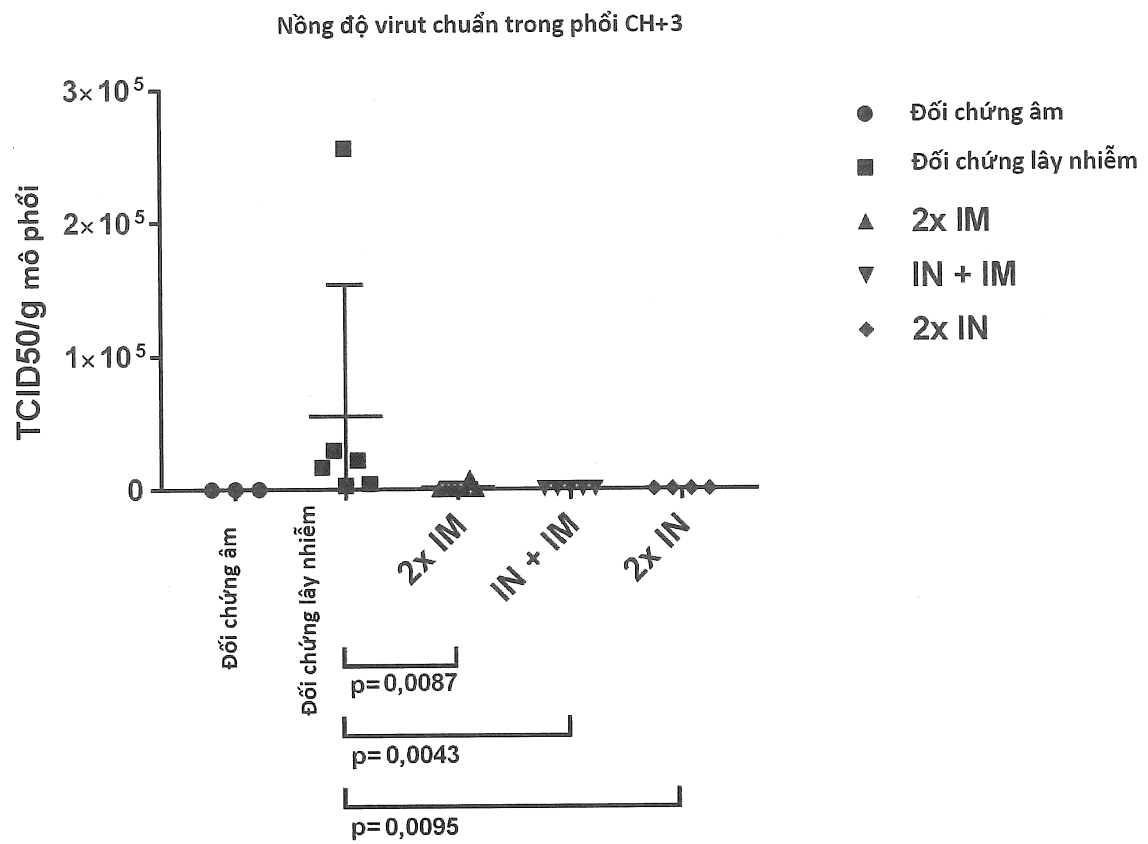


Fig. 29

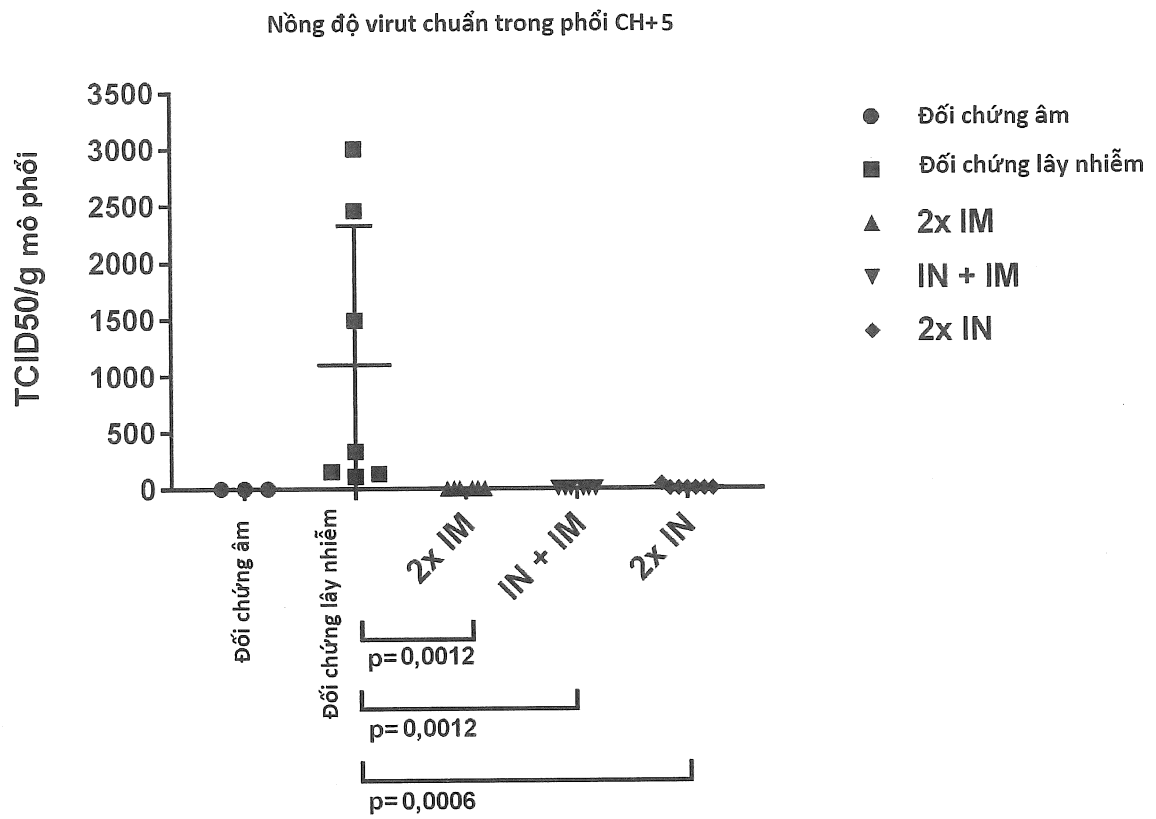


Fig. 30

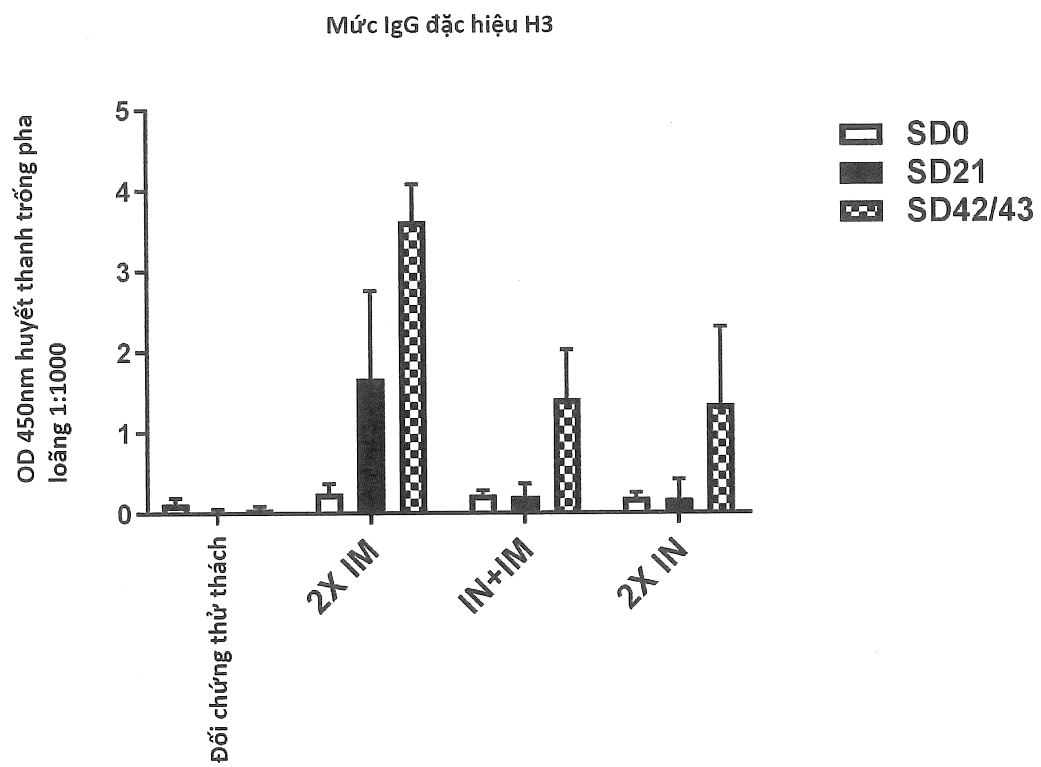


Fig. 31

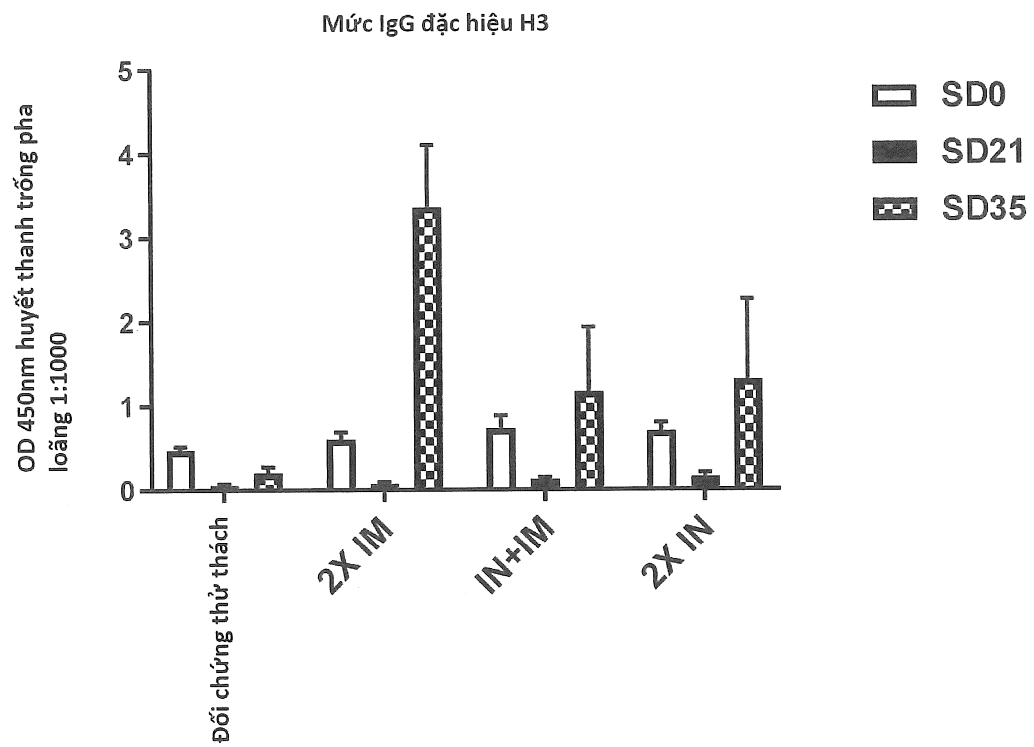


Fig. 32

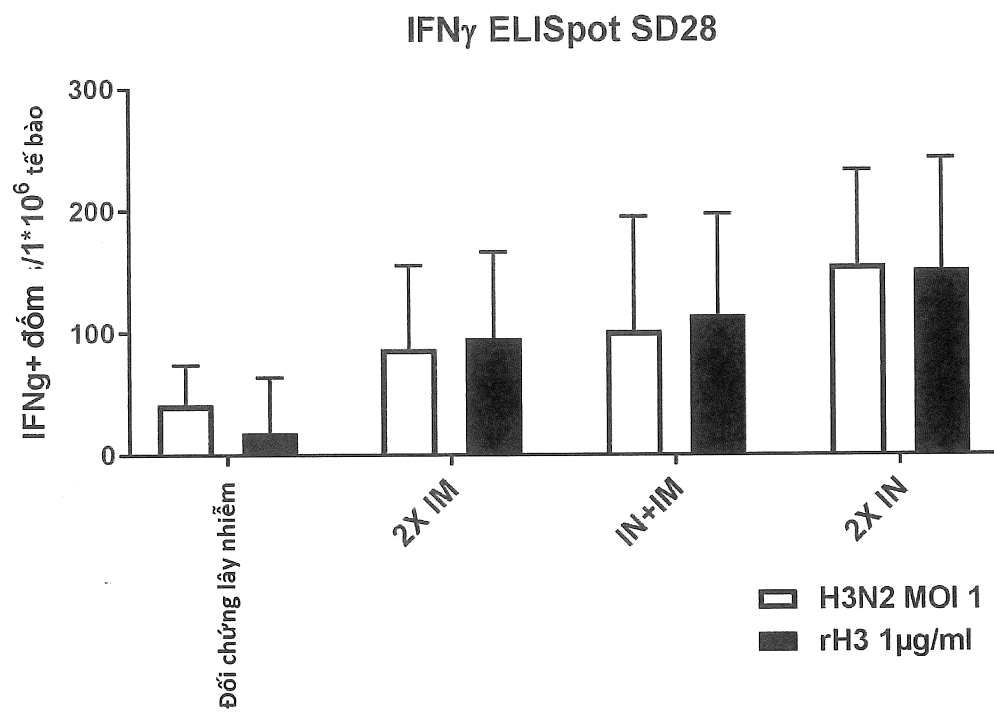


Fig. 33

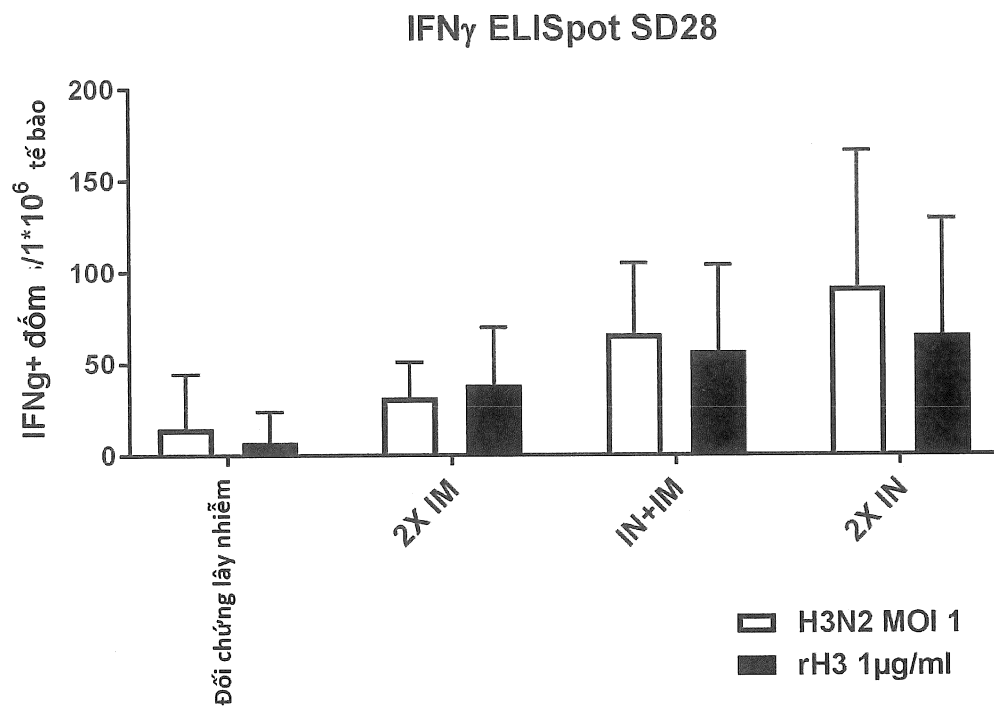


Fig. 34

