



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

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0045273

(51)^{2020.01} A61K 39/145; C07K 14/11; A61P 37/04; (13) B
A61K 39/39; A61P 31/16

(21) 1-2021-02943 (22) 05/11/2019
(86) PCT/CN2019/115471 05/11/2019 (87) WO2020/093984 14/05/2020
(30) PCT/CN2018/114050 06/11/2018 CN
(45) 25/04/2025 445 (43) 25/08/2021 401A
(71) BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH (DE)
Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim am Rhein, Germany
(72) MUNDT, Egbert Siegfried (DE); CUI, Xiaoping (US); HU, Zenglei (CN).
(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) CHẾ PHẨM SINH MIỄN DỊCH CHỐNG LẠI PHÂN NHÓM H5 CỦA VIRUT
GÂY BỆNH CÚM GIA CẦM

(21) 1-2021-02943

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch, bao gồm protein hemagglutinin thuộc phân nhóm H5 của virus gây bệnh cúm gia cầm. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp phân biệt động vật bị lây nhiễm tự nhiên AIV với động vật đã được chủng ngừa bằng chế phẩm sinh miễn dịch này. Chế phẩm sinh miễn dịch này có thể tạo ra sự bảo vệ rộng hơn, hiệu quả hơn, lâu dài và khởi phát sớm đối với gia cầm.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực thú y, đặc biệt là chế phẩm sinh miễn dịch chống lại phân nhóm virus cúm gia cầm H5.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Virus cúm gia cầm (AIV - Avian influenza virus) thuộc loại virus cúm A, và nó xuất hiện tự nhiên giữa các loài chim thủy sinh hoang dã trên toàn thế giới và có thể lây nhiễm cho gia cầm và các loài chim khác, bao gồm cả động vật có vú. Virus cúm A được chia thành các phân nhóm dựa trên cơ sở hai protein trên bề mặt của virus này: hemagglutinin (HA) và neuraminidaza (NA). Có 18 phân nhóm HA đã biết và 11 phân nhóm NA đã biết. Có thể có nhiều tổ hợp khác nhau giữa các protein HA và NA. Ví dụ, “virus H5N1” có nghĩa là virus có phân nhóm HA 5 và phân nhóm NA 1.

Có chín phân nhóm virus H5 đã biết (H5N1, H5N2, H5N3, H5N4, H5N5, H5N6, H5N7, H5N8, và H5N9, ở đây gọi là "H5Nx"). Hầu hết các virus H5 được xác định trên toàn thế giới ở các loài chim hoang dã và gia cầm là virus cúm gia cầm có khả năng gây bệnh thấp, nhưng một số virus chứa H5 thuộc virus cúm gia cầm (HPAI) có độc lực cao. Các virus H5Nx tiến hóa nhanh chóng và dẫn đến sự biến đổi kháng nguyên khác nhau đáng kể giữa các dòng khác nhau cho thấy mối quan hệ tiến hóa giữa các dòng H5 khác nhau. Sự lây nhiễm virus HPAI đối với gia cầm có thể gây ra bệnh nặng với tỷ lệ tử vong cao.

Đối với các quốc gia có virus H5Nx lưu hành, việc chủng ngừa đã được sử dụng để kiểm soát bệnh. Các loại vắc-xin AIV phổ biến nhất là vắc-xin chứa toàn bộ virus đã được làm bất hoạt (vắc-xin đã được làm bất hoạt) được điều chế bằng cách làm bất hoạt toàn bộ virus và tạo nhũ tương với các chất bổ trợ thích hợp. Tuy nhiên, vắc-xin đã được làm bất hoạt không thể bảo vệ rộng rãi chống lại các nhóm khác nhau. Do sự phát triển nhanh chóng của AIV, con người phải liên tục phát triển các loại vắc-xin mới chống lại các nhóm khác nhau. Hơn nữa, việc sản xuất vắc-xin đã được làm bất

hoạt đòi hỏi một lượng lớn AIV sống, và do đó sự an toàn sinh học là một vấn đề nghiêm trọng.

Protein HA là glycoprotein gắn kết thụ thể và dung hợp màng của virus cúm A. Protein HA đã được biết có khả năng tạo ra các kháng thể bảo vệ, và do đó các nhà nghiên cứu trở nên quan tâm đến việc phát triển các vắc-xin tiểu đơn vị dựa trên protein HA tái tổ hợp. WO2007/019094 bộc lộ phân tử HA bao gồm axit amin thay thế ở vị trí gắn kết thụ thể làm cho phân tử HA có tính kháng nguyên cao hơn so với phân tử HA thiếu hụt sự thay thế axit amin ở vị trí gắn kết thụ thể của nó. WO2008/052173 bộc lộ protein hemagglutinin của phân nhóm virus cúm gia cầm H5 (sau đây được gọi là "Protein HA thuộc phân nhóm AIV H5" hoặc "protein HA H5") bao gồm một số đột biến axit amin, và vắc-xin chứa protein H5 HA bổ trợ có thể tạo ra mức bảo vệ tránh khỏi bệnh lâm sàng gây ra bởi virus cúm A. Tuy nhiên, các bộc lộ nêu trên không liên quan đến mức bảo vệ rộng rãi hơn đối với virus cúm A thuộc các nhóm khác nhau.

WO2013/148164 bộc lộ phương pháp tạo ra H5N1 đã được tối ưu hóa và polypeptit HA cúm H1N1 dựa trên thể phân lập cúm H5N1 ở người và H1N1 ở lợn. Hạt giống virus cúm (VLP) bao gồm polypeptit HA bệnh cúm đã được tối ưu hóa cũng được tạo ra. Kết quả thí nghiệm cho thấy VLP có thể tạo ra đáp ứng kháng thể có thể nhận biết virus cúm thuộc hai nhóm khác nhau ở chuột, nhưng hiệu quả bảo vệ chỉ đạt 40-60%.

Cần phát triển loại vắc-xin có thể bảo vệ rộng hơn, hiệu quả hơn, lâu dài và khởi phát sớm đối với gia cầm chống lại phân nhóm AIV H5.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất chế phẩm sinh miễn dịch, bao gồm protein hemagglutinin của phân nhóm virus cúm gia cầm H5, trong đó protein hemagglutinin bao gồm: (a) các gốc axit amin 120N hoặc 120S, 155N, và 223N hoặc 223S; và (b) một hoặc nhiều gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm: 61D, 87I, 99A, 102A, 110N, 136S, 140D, 149S, 156T, 157P, 170N, 172T, 178R, 190V, 191L, 200A, 226V, 243D, 268Y, 279A

và 298I; với việc đánh số dựa vào các gốc axit amin như được nêu trong SEQ ID NO:1.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp điều chế chế phẩm sinh miễn dịch, bao gồm: (i) nuôi cấy tế bào chứa véc-tơ biểu hiện biểu hiện protein hemagglutinin của phân nhóm H5 của virus gây bệnh cúm gia cầm; và (ii) thu hoạch toàn bộ môi trường nuôi cấy tế bào; trong đó protein hemagglutinin bao gồm: (a) các gốc axit amin 120N hoặc 120S, 155N, và 223N hoặc 223S; và (b) một hoặc nhiều gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm: 61D, 87I, 99A, 102A, 110N, 136S, 140D, 149S, 156T, 157P, 170N, 172T, 178R, 190V, 191L, 200A, 226V, 243D, 268Y, 279A và 298I; với việc đánh số dựa vào các gốc axit amin như được nêu trong SEQ ID NO:1.

Sáng chế cũng đề xuất chế phẩm sinh miễn dịch, dùng để ngăn ngừa và/hoặc điều trị lây nhiễm gây ra bởi virus gây bệnh cúm gia cầm, tốt hơn là bởi H5Nx. Theo một phương án, H5Nx là H5N1, H5N2 và/hoặc H5N6. Theo một phương án, H5Nx là H5N1. Theo một phương án, H5Nx là H5N2. Theo một phương án, H5Nx là H5N6. Theo một phương án, H5Nx là H5N1 và H5N2. Theo một phương án, H5Nx là H5N2 và H5N6.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp phân biệt động vật bị lây nhiễm tự nhiên AIV với động vật đã được chủng ngừa bằng chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế.

Chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế có thể tạo ra mức bảo vệ rộng hơn, hiệu quả hơn, lâu dài và khởi phát sớm đối với gia cầm. Theo một phương án, chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế tạo ra mức bảo vệ rộng hơn đối với gia cầm. Theo một phương án, chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế tạo ra mức bảo vệ hiệu quả hơn đối với gia cầm. Theo một phương án, chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế tạo ra mức bảo vệ lâu dài đối với gia cầm. Theo một phương án, chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế tạo ra mức bảo vệ khởi phát sớm đối với gia cầm.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các hình vẽ sau tạo thành một phần của sáng chế và được bao gồm trong sáng chế để chứng minh thêm các khía cạnh nhất định của sáng chế. Sáng chế có thể được

hiều rõ hơn bằng cách tham khảo một hoặc nhiều hình vẽ này kết hợp với phần mô tả chi tiết về các phương án cụ thể được giới thiệu ở đây.

Fig. 1: Trình tự H5Con1 được tạo ra bằng phương pháp tuần tự từ 444 trình tự đã phân lập từ năm 1996 đến 2012.

Fig. 2: Trình tự H5Con3 được tạo ra bằng phương pháp một vòng từ 297 trình tự của các nhánh cụ thể đã phân lập từ năm 1996 đến 2012.

Fig. 3: Trình tự H5Con5 được tạo ra bằng phương pháp một vòng từ 196 trình tự đã phân lập từ năm 2005 đến 2012.

Fig. 4: Cấu trúc của plasmit dịch chuyển pVL1393-H5Con5Mut.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm sinh miễn dịch, bao gồm protein HA H5, trong đó protein HA H5 bao gồm: (a) các gốc axit amin 120N hoặc 120S, 155N, và 223N hoặc 223S; và (b) một hoặc nhiều gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm: 61D, 87I, 99A, 102A, 110N, 136S, 140D, 149S, 156T, 157P, 170N, 172T, 178R, 190V, 191L, 200A, 226V, 243D, 268Y, 279A và 298I; với việc đánh số dựa vào các gốc axit amin như được nêu trong SEQ ID NO:1.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “chế phẩm sinh miễn dịch”, cũng được đặt tên là “vắc-xin”, để chỉ chế phẩm bao gồm ít nhất một kháng nguyên tạo ra đáp ứng miễn dịch với chế phẩm. Vật chủ sẽ thể hiện đáp ứng miễn dịch điều trị hoặc bảo vệ để chống lại các lây nhiễm mới sẽ được tăng cường và/hoặc mức độ nghiêm trọng của các dấu hiệu lâm sàng giảm xuống.

Trình tự axit amin của protein HA H5 được thiết kế thông qua một loạt sự sắp hàng trình tự axit amin HA, thể hệ tiếp theo của trình tự axit amin liên ứng và phân tích các gốc phổ biến nhất ở mỗi vị trí. Như được sử dụng ở đây, các thuật ngữ “protein hemagglutinin theo sáng chế”, “protein HA của phân nhóm AIV H5 ” và “protein HA H5” có thể hoán đổi cho nhau.

Như được sử dụng ở đây, SEQ ID NO:1 là trình tự axit amin của protein HA của chủng A/duck/China/E319-2/03 nhưng thiếu hụt peptit tín hiệu của đầu tận cùng amino (trình tự axit amin của protein HA của chủng A/duck/China/E319-2/03 cũng đã được công bố trong WO2008/052173). SEQ ID NO:1 được sử dụng làm trình tự tiêu chuẩn của protein HA để xác định vị trí axit amin của protein HA theo sáng chế.

Việc đánh số vị trí axit amin của protein HA theo sáng chế như được sử dụng ở đây để chỉ vị trí axit amin như được nêu trong SEQ ID NO:1. Ví dụ, ký hiệu “120N hoặc 120S” nghĩa là N hoặc S ở vị trí tương ứng với vị trí 120 của trình tự nêu trong SEQ ID NO:1. “155N” nghĩa là N ở vị trí tương ứng với vị trí 155 của trình tự nêu trong SEQ ID NO:1. “223N hoặc 223S” nghĩa là N hoặc S ở vị trí tương ứng với vị trí 223 của trình tự nêu trong SEQ ID NO:1. “61D” nghĩa là D ở vị trí tương ứng với vị trí 61 của trình tự nêu trong SEQ ID NO:1. “87I” nghĩa là I ở vị trí tương ứng với vị trí 87 của trình tự nêu trong SEQ ID NO:1. “99A” nghĩa là A ở vị trí tương ứng với vị trí 99 của trình tự nêu trong SEQ ID NO:1. “102A” nghĩa là A ở vị trí tương ứng với vị trí 102 của trình tự nêu trong SEQ ID NO:1. “110N” nghĩa là N ở vị trí tương ứng với vị trí 110 của trình tự nêu trong SEQ ID NO:1. “136S” nghĩa là S ở vị trí tương ứng với vị trí 136 của trình tự nêu trong SEQ ID NO:1. “140D” nghĩa là D ở vị trí tương ứng với vị trí 140 của trình tự nêu trong SEQ ID NO:1. “149S” nghĩa là S ở vị trí tương ứng với vị trí 149 của trình tự nêu trong SEQ ID NO:1. “156T” nghĩa là T ở vị trí tương ứng với vị trí 156 của trình tự nêu trong SEQ ID NO:1. “157P” nghĩa là P ở vị trí tương ứng với vị trí 157 của trình tự nêu trong SEQ ID NO:1. “170N” nghĩa là N ở vị trí tương ứng với vị trí 170 của trình tự nêu trong SEQ ID NO:1. “172T” nghĩa là T ở vị trí tương ứng với vị trí 172 của trình tự nêu trong SEQ ID NO:1. “178R” nghĩa là R ở vị trí tương ứng với vị trí 178 của trình tự nêu trong SEQ ID NO:1. “190V” nghĩa là V ở vị trí tương ứng với vị trí 190 của trình tự nêu trong SEQ ID NO:1. “191L” nghĩa là L ở vị trí tương ứng với vị trí 191 của trình tự nêu trong SEQ ID NO:1. “200A” nghĩa là A ở vị trí tương ứng với vị trí 200 của trình tự nêu trong SEQ ID NO:1. “226V” nghĩa là V ở vị trí tương ứng với vị trí 226 của trình tự nêu trong SEQ ID NO:1. “243D” nghĩa là D ở vị trí tương ứng với vị trí 243 của trình tự nêu trong SEQ ID NO:1. “268Y” nghĩa là Y ở vị trí tương ứng với vị trí 268 của trình tự nêu

trong SEQ ID NO:1. “279A” nghĩa là A ở vị trí tương ứng với vị trí 279 của trình tự nêu trong SEQ ID NO:1. “298I” nghĩa là I ở vị trí tương ứng với vị trí 298 của trình tự nêu trong SEQ ID NO:1. Phương pháp xác định vị trí của các axit amin là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, sự sắp hàng axit amin được thực hiện bằng cách sử dụng chương trình BLAST.

Theo một phương án của chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế, protein HA H5 bao gồm gốc axit amin bất kỳ trong số các gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm: 61D, 87I, 99A, 102A, 110N, 136S, 140D, 149S, 156T, 157P, 170N, 172T, 178R, 190V, 191L, 200A, 226V, 243D, 268Y, 279A và 298I. Theo một phương án, protein HA H5 theo sáng chế bao gồm hai gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm: 61D, 87I, 99A, 102A, 110N, 136S, 140D, 149S, 156T, 157P, 170N, 172T, 178R, 190V, 191L, 200A, 226V, 243D, 268Y, 279A và 298I. Theo một phương án, protein HA H5 theo sáng chế bao gồm ba, bốn, năm, ..., hoặc tất cả các gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm: 61D, 87I, 99A, 102A, 110N, 136S, 140D, 149S, 156T, 157P, 170N, 172T, 178R, 190V, 191L, 200A, 226V, 243D, 268Y, 279A và 298I. Toàn bộ protein HA từ AIV có trong tự nhiên có chiều dài khoảng 568 gốc axit amin, và tất cả các gốc axit amin ngược dòng của axit amin 514 nằm trên bề mặt của virus. Tin rằng các vị trí axit amin nêu trên theo sáng chế được xác định nằm trong vùng axit amin 60-300 của protein HA bao gồm hầu hết các epitop sinh miễn dịch. Theo một phương án, protein HA H5 theo sáng chế còn bao gồm các gốc axit amin 120N hoặc 120S, 155N, và 223N hoặc 223S. Theo một phương án, protein HA H5 theo sáng chế bao gồm các gốc axit amin 120N, 155N, và 223N. Theo một phương án, protein HA H5 theo sáng chế bao gồm các gốc axit amin 120N, 155N, và 223S. Theo một phương án, protein HA H5 theo sáng chế bao gồm các gốc axit amin 120S, 155N, và 223N. Theo một phương án, protein HA H5 theo sáng chế bao gồm các gốc axit amin 120S, 155N, và 223S.

Theo một phương án của chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế, protein HA H5 bao gồm các gốc axit amin 61D, 87I, 99A, 102A, 110N, 120N, 136S, 140D, 149S, 155N, 156T, 157P, 170N, 172T, 178R, 190V, 191L, 200A, 223N, 226V, 243D, 268Y, 279A và 298I. Theo một phương án, protein HA H5 theo sáng chế bao gồm các gốc axit amin 61D, 87I, 99A, 102A, 110N, 120S, 136S, 140D, 149S, 155N, 156T, 157P,

170N, 172T, 178R, 190V, 191L, 200A, 223S, 226V, 243D, 268Y, 279A và 298I. Theo một phương án, protein HA H5 theo sáng chế bao gồm các gốc axit amin 61D, 87I, 99A, 102A, 110N, 120S, 136S, 140D, 149S, 155N, 156T, 157P, 170N, 172T, 178R, 190V, 191L, 200A, 223N, 226V, 243D, 268Y, 279A và 298I. Theo một phương án, protein HA H5 theo sáng chế bao gồm các gốc axit amin 61D, 87I, 99A, 102A, 110N, 120N, 136S, 140D, 149S, 155N, 156T, 157P, 170N, 172T, 178R, 190V, 191L, 200A, 223S, 226V, 243D, 268Y, 279A và 298I.

Theo một phương án của chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế, protein HA H5 bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO: 6. Theo một phương án, protein HA H5 theo sáng chế bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO: 5. Theo một phương án, protein HA H5 theo sáng chế bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO: 6. Theo một phương án, protein HA H5 theo sáng chế bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO: 5.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “Protein HA H5 theo sáng chế” có thể là dạng đã được phân lập của protein HA H5, hoặc dạng không được phân lập của protein HA H5, ví dụ, protein HA H5 chứa trong môi trường nuôi cấy tế bào. Theo một phương án của chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế, protein HA H5 là dạng không được phân lập của protein HA H5. Theo một phương án của chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế, protein HA H5 là dạng đã được phân lập của protein HA H5.

Theo một phương án của chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế, protein HA H5 được điều chế bằng cách biểu hiện phân tử axit nucleic mã hóa protein HA H5.

Theo một phương án, phân tử axit nucleic theo sáng chế có thể được tối ưu hóa codon tiếp để biểu hiện trong tế bào. Thuật ngữ "phân tử axit nucleic đã được tối ưu hóa codon" như được sử dụng ở đây nghĩa là phân tử axit nucleic đã được chọn sao cho các codon là tối ưu để biểu hiện trong một hệ thống cụ thể (như các loài hoặc các nhóm loài cụ thể). Tối ưu hóa codon không thay đổi trình tự axit amin của protein đã được ghi mã. Theo một phương án, phân tử axit nucleic theo sáng chế được tối ưu hóa codon để biểu hiện trong tế bào côn trùng.

Theo một phương án, phân tử axit nucleic theo sáng chế bao gồm trình tự axit nucleic như được nêu trong SEQ ID NO: 10. Theo một phương án, phân tử axit nucleic theo sáng chế bao gồm trình tự axit nucleic như được nêu trong SEQ ID NO: 10. Theo một phương án, phân tử axit nucleic theo sáng chế bao gồm trình tự axit nucleic như được nêu trong SEQ ID NO: 11. Theo một phương án, phân tử axit nucleic theo sáng chế bao gồm trình tự axit nucleic như được nêu trong SEQ ID NO: 11.

Phân tử axit nucleic theo sáng chế có thể được chứa trong véc-tơ biểu hiện. Theo một phương án, véc-tơ biểu hiện theo sáng chế là virut, plasmit, cosmit hoặc thể thực khuẩn. Véc-tơ có thể bao gồm ADN hoặc ARN, tốt hơn là ADN.

Véc-tơ và phương pháp tạo ra và/hoặc sử dụng véc-tơ (hoặc thể tái tổ hợp) để biểu hiện có thể bằng hoặc tương tự với 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, Công bố đơn 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 (baculovirut tái tổ hợp); Richardson, C. D. (Editor), Methods in Molecular Biology 39, "Baculovirus Expression Protocols" (1995 Humana Press Inc.); Smith et al., "Production of Human Beta Interferon in Insect Cells Infected with a Baculovirus Expression Vector", Molecular and Cellular Biology, December, 1983, Vol. 3, No. 12, p. 2156-2165; Pennock et al., "Strong and Regulated Expression of Escherichia coli B-Galactosidase in Infect Cells with a 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 ngày 16 tháng 10 năm 1986; Công bố đơn patent 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; các patent Mỹ số 5,591,439, 5,552,143; WO 98/00166; đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 08/675,556, và 08/675,566 đều nộp ngày 3 tháng 7 năm 1996 (adenovirut tái tổ hợp); 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; and 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 các patent Mỹ số 5,591,639, 5,589,466, và 5,580,859, cũng như WO 90/11092, WO93/19183, WO94/21797, WO95/11307, WO95/20660; Tang et al., Nature, and Furth et al., Analytical Biochemistry, đề cập đến véc-tơ biểu hiện ADN, không kể những cái khác. Cũng xem WO 98/33510; Ju et al., Diabetologia, 41: 736-739, 1998 (hệ thống biểu hiện lentivirut); 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., Patent Mỹ số 4,394,448 (phương pháp cài xen AND vào tế bào sống); McCormick et al., Patent Mỹ số 5,677,178 (sử dụng virut gây bệnh ở tế bào); và Patent Mỹ số 5,928,913 (véc-tơ để phân phối gen); cũng như các tài liệu khác được trích dẫn ở đây.

Theo một phương án, véc-tơ biểu hiện theo sáng chế là véc-tơ virut.

Theo một phương án, véc-tơ biểu hiện theo sáng chế là virut gây bệnh mụn rộp, như virut gây bệnh Aujeszky, virut gây bệnh mụn rộp ở ngựa hoặc virut gây bệnh mụn rộp sinh dục. Theo một phương án, véc-tơ biểu hiện theo sáng chế là adenovirut, như adenovirut lợn. Theo một phương án, véc-tơ biểu hiện theo sáng chế là virut gây bệnh đậu mùa, như virut gây bệnh đậu mùa ở súc vật, virut gây bệnh đậu gà, virut gây bệnh đậu chim hoàng yến hoặc virut gây bệnh đậu mùa lợn.

Theo một phương án, véc-tơ virut là baculovirut tái tổ hợp. Theo một phương án, baculovirut tái tổ hợp theo sáng chế có nguồn gốc từ BaculoGold (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, Calif.). Theo một phương án, baculovirut tái tổ hợp theo sáng chế có nguồn gốc từ baculovirut Sapphire™ (Allele Biotechnology). Theo một phương án, baculovirut tái tổ hợp theo sáng chế bao gồm phân tử axit nucleic mã hóa protein HA H5 theo sáng chế. Theo một phương án, baculovirut tái tổ hợp theo sáng chế bao gồm phân tử axit nucleic có trình tự như được nêu trong SEQ ID NO: 10. Theo một phương án, baculovirut tái tổ hợp theo sáng chế bao gồm phân tử axit nucleic có trình tự như được nêu trong SEQ ID NO: 11.

Theo một phương án của chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế, protein HA H5 được chứa trong môi trường nuôi cấy tế bào. Môi trường nuôi cấy tế bào theo sáng chế có thể là toàn bộ môi trường nuôi cấy tế bào thu được từ quy trình nuôi cấy tế bào, bao gồm tế bào và môi trường nuôi cấy, hoặc một phần của môi trường nuôi cấy tế bào chứa protein HA, Ví dụ, một phần của môi trường nuôi cấy tế bào chứa protein HA thu được bằng cách lọc hoặc bước tách khác bất kỳ.

Theo một phương án, môi trường nuôi cấy tế bào bao gồm protein HA H5, trong đó protein HA H5 bao gồm: (a) các gốc axit amin 120N hoặc 120S, 155N, và 223N hoặc 223S; và (b) một hoặc nhiều gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm: 61D, 87I, 99A, 102A, 110N, 136S, 140D, 149S, 156T, 157P, 170N, 172T, 178R, 190V, 191L, 200A, 226V, 243D, 268Y, 279A và 298I; với việc đánh số dựa vào các gốc axit amin như được nêu trong SEQ ID NO:1. Theo một phương án, môi trường nuôi cấy tế bào bao gồm protein HA H5, trong đó protein HA H5 bao gồm các gốc axit amin 61D, 87I, 99A, 102A, 110N, 120N, 136S, 140D, 149S, 155N, 156T, 157P, 170N, 172T, 178R, 190V, 191L, 200A, 223N, 226V, 243D, 268Y, 279A và 298I. Theo một phương án, môi trường nuôi cấy tế bào bao gồm protein HA H5, trong đó protein HA H5 bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO: 6. Theo một phương án, môi trường nuôi cấy tế bào bao gồm protein HA H5, trong đó protein HA H5 bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO: 5.

Chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế còn bao gồm chất bổ trợ. Theo một phương án, chế phẩm sinh miễn dịch được pha chế trong chất bổ trợ. “Chất bổ trợ” như được sử dụng ở đây, có thể bao gồm nhôm hydroxit và nhôm phosphat, saponin, ví dụ, 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. Nhũ tương có thể dựa trên cụ thể dầu parafin lỏng nhẹ (loại Dược điển Châu Âu); dầu isoprenoit như squalane hoặc squalene; dầu thu được từ quá trình oligome hóa alken, cụ thể là isobuten hoặc dextran; este của axit hoặc của rượu chứa nhóm alkyl mạch thẳng, cụ thể hơn là dầu thực vật, ethyl oleat, propylen glycol di-(caprylate/caprat), glyxeryl tri-(caprylat/caprat) hoặc propylen glycol dioleat; este của axit béo mạch nhánh hoặc rượu, 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 được ưu tiên là chất hoạt động bề mặt không ion, cụ thể là este của sorbitan, của mannit (ví dụ, anhydromannitol oleat), của glycol, của polyglycerol, của propylen glycol và của oleic, isostearic, ricinoleic hoặc axit hydroxystearic, được etoxyl hóa tùy ý, và copolyme khối polyoxypropylen-polyoxyetylen, cụ thể là sản phẩm Pluronic, cụ thể là L121. Xem, Hunter et al., *The Theory and Practical Application of Adjuvants* (Ed. Stewart-Tull, D. E. S.), John Wiley và Sons, NY, pp51-94 (1995) và Todd et al., *Vaccine* 15:564-570 (1997). Các chất bổ trợ được lấy làm ví dụ là nhũ tương SPT được mô tả trong trang 147 của “*Vaccine Design, The Subunit và Adjuvant Approach*” edited by M. Powell và M. Newman, Plenum Press, 1995, và nhũ tương MF59 được mô tả trong trang 183 của cùng tài liệu này.

Ví dụ khác nữa về chất bổ trợ là hợp chất được chọn từ các polyme của axit acrylic hoặc metacrylic và copolyme của maleic anhydrua và dẫn xuất alkenyl. Các hợp chất bổ trợ có lợi là các polyme của axit acrylic hoặc metacrylic được tạo liên kết chéo, cụ thể là với polyalkenyl ete của đường hoặc rượu đa chức. Các hợp chất này được gọi bằng thuật ngữ carbome (Pharmeuropa Vol. 8, No. 2, June 1996). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này cũng có thể tham khảo patent Mỹ số 2,909,462 mô tả các polyme acrylic như vậy được tạo liên kết chéo với hợp chất đã 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 thế bằng các gốc béo chưa bão hòa có ít nhất 2 nguyên tử cacbon. Các gốc được ưu tiên là các gốc chứa từ 2 đến 4 nguyên tử cacbon, ví dụ, vinyl, alyl và các nhóm chưa bão hòa kiểu etylen khác. Chính các gốc chưa bão hòa có thể chứa các phần tử thế khác như methyl. Các sản phẩm được bán dưới tên Carbopol; (BF Goodrich, Ohio, USA) đặc biệt thích hợp. Chúng được liên kết chéo với alyl sucroza hoặc với alyl pentaerythritol. Trong số đó, có thể kể đến Carbopol 974P, 934P và 971P. Tốt nhất là sử dụng Carbopol 971P. Trong số các copolyme của dẫn xuất maleic anhydrua và alkenyl, là các copolyme EMA (Monsanto), là copolyme của maleic anhydrua và etylen. Sự hòa tan của các polyme này trong nước dẫn đến một dung dịch axit sẽ được trung hòa, tốt hơn là đến độ pH sinh lý, để thu được dung dịch bổ trợ mà chính chế phẩm sinh miễn dịch, miễn dịch hoặc vắc-xin sẽ được kết hợp vào.

Các chất bổ trợ thích hợp khác nữa bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, hệ thống chất bổ trợ RIBI (Ribi Inc.), co-polyme khối (CytRx, Atlanta GA), SAF-M (Chiron, Emeryville CA), monophosphoryl lipid A, chất bổ trợ Avridine lipid-amin, độc tố ruột không bền với nhiệt từ E. coli (tái tổ hợp hoặc dạng khác), độc tố bệnh dịch tả, IMS 1314 hoặc muramyl dipeptit, hoặc xytokin tự nhiên hoặc tái tổ hợp hoặc các chất tương tự chúng hoặc các chất kích thích giải phóng xytokin nội sinh, trong số nhiều chất khác.

Theo một phương án, chế phẩm sinh miễn dịch được pha chế thành nhũ tương nước trong dầu với chất bổ trợ thích hợp. Chất bổ trợ có thể bao gồm dầu và chất hoạt động bề mặt. Theo một phương án, chất bổ trợ là MONTANIDE™ ISA 71R VG (do Seppic Inc sản xuất, Lô số: 365187). Chất bổ trợ có thể được bổ sung với lượng nằm trong khoảng từ 100 µg đến khoảng 10 mg trong mỗi liều. Thậm chí tốt hơn nữa là, chất bổ trợ được bổ sung với lượng nằm trong khoảng từ 100 µg đến khoảng 10 mg trong mỗi liều. Thậm chí tốt hơn nữa là, chất bổ trợ được bổ sung với lượng nằm trong khoảng từ 500 µg đến khoảng 5 mg trong mỗi liều. Thậm chí tốt hơn nữa là, chất bổ trợ được bổ sung với lượng nằm trong khoảng từ 750 µg đến khoảng 2,5 mg trong mỗi liều. Tốt nhất là, chất bổ trợ được bổ sung với lượng nằm trong khoảng từ 1 mg trong mỗi liều. Theo một phương án, chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế bao gồm

khoảng 7 phần của pha dầu chứa chất bổ trợ và khoảng 3 phần của pha nước chứa protein HA H5 theo sáng chế trong mỗi liều.

Đã bất ngờ phát hiện ra rằng chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế có thể dẫn đến thu được sự bảo vệ rộng hơn đối với gia cầm. Thuật ngữ “sự bảo vệ rộng hơn đối với gia cầm” như được sử dụng ở đây bao hàm sự bảo vệ rộng chống lại các phân nhóm AIV H5 khác nhau. Các phân nhóm như vậy bao hàm, hoặc theo phương án khác nữa bao gồm H5N1, H5N2 và/hoặc H5N6. Theo phương án khác nữa, thuật ngữ “sự bảo vệ rộng hơn đối với gia cầm” cũng bao hàm sự bảo vệ chống lại các nhánh khác nhau của phân nhóm AIV H5. Các nhánh AIV H5 như vậy bao hàm hoặc theo phương án khác nữa bao gồm 2.3.4.4, 2.3.2.1, 2.3.2.1d, 2.3.4.4d và/hoặc 7.2.

Ngoài ra, sự bảo vệ tạo ra bởi chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế có thời gian khởi phát sớm và kéo dài. Thuật ngữ “thời gian khởi phát sớm” hoặc “sự khởi phát bảo vệ sớm” như được sử dụng ở đây có nghĩa là sự bảo vệ một phần chống lại virut AIV H5 lây nhiễm có thể thu được 7 ngày sau khi chủng ngừa. Sự bảo vệ hoàn toàn chống lại virut AIV H5 lây nhiễm có thể thu được 14 ngày sau khi chủng ngừa. Thuật ngữ “thời gian kéo dài” hoặc “sự bảo vệ lâu dài đối với gia cầm” bao hàm thời gian bảo vệ ít nhất là 42 ngày sau khi chủng ngừa.

Chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế có thể tạo ra sự bảo vệ đối với gà với các ngày tuổi khác nhau, thậm chí từ lúc mới nở, tức là ngày một của cuộc đời. Chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế không bị giới hạn ở đường dùng, và hiệu lực bảo vệ của chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế không bị ảnh hưởng bởi các đường dùng khác nhau.

Theo khía cạnh khác, sáng chế cũng đề xuất phương pháp điều chế chế phẩm sinh miễn dịch, bao gồm: (i) nuôi cấy tế bào chứa véc-tơ biểu hiện có khả năng biểu hiện protein HA H5; và (ii) thu hoạch protein HA H5 hoặc toàn bộ môi trường nuôi cấy tế bào bao gồm protein HA H5, trong đó protein HA H5 bao gồm: (a) các gốc axit amin 120N hoặc 120S, 155N, và 223N hoặc 223S; và (b) một hoặc nhiều gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm: 61D, 87I, 99A, 102A, 110N, 136S, 140D, 149S,

156T, 157P, 170N, 172T, 178R, 190V, 191L, 200A, 226V, 243D, 268Y, 279A và 298I; với việc đánh số dựa vào các gốc axit amin như được nêu trong SEQ ID NO:1.

Theo một phương án của phương pháp theo sáng chế, protein HA H5 bao gồm các gốc axit amin 61D, 87I, 99A, 102A, 110N, 120N, 136S, 140D, 149S, 155N, 156T, 157P, 170N, 172T, 178R, 190V, 191L, 200A, 223N, 226V, 243D, 268Y, 279A và 298I. Theo một phương án, protein HA H5 bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO: 6. Theo một phương án, protein HA H5 bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO: 5.

Theo một phương án của phương pháp theo sáng chế, véc-tơ biểu hiện là baculovirut tái tổ hợp bao gồm phân tử axit nucleic theo sáng chế. Theo một phương án, phân tử axit nucleic theo sáng chế như được nêu trong SEQ ID NO: 10. Theo một phương án, phân tử axit nucleic theo sáng chế như được nêu trong SEQ ID NO: 11. Theo một phương án, baculovirut tái tổ hợp có nguồn gốc từ sản phẩm thương mại được bán dưới nhãn hiệu Baculovirut Sapphire™ (Allele Biotechnology). Theo một phương án, tế bào là tế bào côn trùng. Theo một phương án, tế bào côn trùng là tế bào SF+. Theo một phương án, tế bào SF+ là một sản phẩm thương mại được bán bởi Protein Sciences Corporation (Meriden, CT).

Theo một phương án của phương pháp theo sáng chế, phương pháp bao gồm bước điều chế baculovirut tái tổ hợp bao gồm phân tử axit nucleic theo sáng chế. Theo một phương án, phân tử axit nucleic theo sáng chế như được nêu trong SEQ ID NO: 10. Theo một phương án, phân tử axit nucleic theo sáng chế như được nêu trong SEQ ID NO: 11. Theo một phương án, baculovirut tái tổ hợp có nguồn gốc từ sản phẩm thương mại được bán dưới nhãn hiệu Baculovirut Sapphire™ (Allele Biotechnology).

Theo một phương án của phương pháp theo sáng chế, phương pháp bao gồm bước lấy nhiễm tế bào với baculovirut tái tổ hợp theo sáng chế. Theo một phương án, tế bào là tế bào côn trùng. Theo một phương án, tế bào côn trùng là tế bào SF+. Theo một phương án, tế bào SF+ là sản phẩm thương mại được bán bởi Protein Sciences Corporation (Meriden, CT).

Theo một phương án của phương pháp theo sáng chế, phương pháp bao gồm bước điều chế baculovirut tái tổ hợp bao gồm phân tử axit nucleic theo sáng chế, và lây nhiễm tế bào côn trùng với baculovirut tái tổ hợp. Theo một phương án, baculovirut tái tổ hợp có nguồn gốc từ sản phẩm thương mại được bán dưới nhãn hiệu Baculovirut Sapphire™ (Allele Biotechnology). Theo một phương án, phân tử axit nucleic theo sáng chế như được nêu trong SEQ ID NO: 10. Theo một phương án, phân tử axit nucleic theo sáng chế như được nêu trong SEQ ID NO: 11. Theo một phương án, tế bào côn trùng là tế bào SF+. Theo một phương án, tế bào SF+ là sản phẩm thương mại được bán bởi Protein Sciences Corporation (Meriden, CT).

Theo một phương án của phương pháp theo sáng chế, phương pháp bao gồm: (i) điều chế baculovirut tái tổ hợp bao gồm phân tử axit nucleic theo sáng chế; (ii) lây nhiễm tế bào côn trùng với baculovirut tái tổ hợp; (iii) nuôi cấy tế bào côn trùng trong môi trường nuôi cấy; và (iv) thu hoạch protein HA H5 theo sáng chế hoặc toàn bộ môi trường nuôi cấy tế bào bao gồm protein HA H5 theo sáng chế. Theo một phương án, baculovirut tái tổ hợp có nguồn gốc từ sản phẩm thương mại được bán dưới nhãn hiệu Baculovirut Sapphire™ (Allele Biotechnology). Theo một phương án, phân tử axit nucleic theo sáng chế như được nêu trong SEQ ID NO: 10. Theo một phương án, phân tử axit nucleic theo sáng chế như được nêu trong SEQ ID NO: 11. Theo một phương án, tế bào côn trùng là tế bào SF+. Theo một phương án, tế bào SF+ là sản phẩm thương mại được bán bởi Protein Sciences Corporation (Meriden, CT).

Theo một phương án của phương pháp theo sáng chế, môi trường nuôi cấy để nuôi cấy tế bào theo sáng chế sẽ được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Theo một phương án, môi trường nuôi cấy là môi trường tế bào côn trùng không chứa huyết thanh. Theo một phương án, môi trường nuôi cấy là môi trường không chứa huyết thanh Ex-CELL 420 (Ex-CELL® 420 cho tế bào côn trùng, Sigma-Aldrich, Cat. 14420C).

Theo một phương án của phương pháp theo sáng chế, tế bào côn trùng được nuôi cấy trong điều kiện thích hợp để biểu hiện protein HA H5. Theo một phương án, tế bào côn trùng được ủ trong khoảng thời gian lên đến mười ngày, tốt hơn là từ

khoảng hai ngày đến khoảng mười ngày, tốt hơn nữa là từ khoảng bốn ngày đến khoảng chín ngày, và thậm chí tốt hơn nữa là từ khoảng năm ngày đến khoảng tám ngày. Theo một phương án, điều kiện thích hợp để nuôi cấy tế bào côn trùng bao gồm nhiệt độ nằm trong khoảng 22 - 32°C, tốt hơn là nằm trong khoảng 24 - 30°C, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng 25 - 29°C, thậm chí tốt hơn nữa là nằm trong khoảng 26 - 28°C, và tốt nhất là khoảng 27°C.

Theo một phương án của phương pháp theo sáng chế, phương pháp còn bao gồm bước làm bất hoạt môi trường nuôi cấy tế bào theo sáng chế. Phương pháp làm bất hoạt thông thường bất kỳ đều có thể được sử dụng cho các mục đích theo sáng chế, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phương pháp điều trị hóa học và / hoặc vật lý.

Theo một phương án, bước làm bất hoạt bao gồm việc bổ sung etylenimin nhị phân đã được tạo vòng (BEI), tốt hơn là ở nồng độ nằm trong khoảng từ 1 đến khoảng 20 mM, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 2 đến khoảng 10 mM, tốt hơn nữa là khoảng 5 mM hoặc 10 mM. Theo một phương án, bước làm bất hoạt bao gồm việc bổ sung dung dịch của 2-bromoetylenamin hydrobromua mà sẽ được tạo vòng để tạo ra BEI trong NaOH.

Theo một phương án, bước làm bất hoạt được thực hiện trong khoảng 25 - 40°C, tốt hơn là trong khoảng 28 - 39°C, tốt hơn nữa là trong khoảng 30 - 39°C, tốt hơn nữa là trong khoảng 35 - 39°C. Theo một phương án, bước làm bất hoạt được thực hiện trong 24 - 72 giờ, tốt hơn là trong khoảng 30 - 72 giờ, tốt hơn nữa là trong khoảng 48 - 72 giờ. Nói chung, bước làm bất hoạt được thực hiện cho đến khi không phát hiện được sự sao chép của véc-tơ virus.

Theo một phương án của phương pháp theo sáng chế, phương pháp còn bao gồm bước trung hòa sau bước làm bất hoạt. Bước trung hòa bao gồm bổ sung một lượng tương đương của chất trung hòa chất làm bất hoạt trong dung dịch. Theo một phương án, chất làm bất hoạt là BEI. Theo một phương án, chất làm trung hòa là natri thiosulfat. Theo một phương án, khi chất làm bất hoạt là BEI, một lượng tương đương của natri thiosulfat sẽ được bổ sung. Ví dụ, trong trường hợp BEI được bổ sung vào nồng độ cuối cùng là 5mM, dung dịch natri thiosulfat 1,0M được bổ sung vào thu được

nồng độ tối thiểu cuối cùng là 5 mM để làm trung hòa BEI còn lại bất kỳ. Theo một phương án, bước trung hòa bao gồm bổ sung dung dịch natri thiosulfat vào nồng độ cuối cùng nằm trong khoảng từ 1 đến 20 mM, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 2 đến 10 mM, tốt hơn nữa là 5 mM hoặc 10 mM, khi chất làm bất hoạt là BEI. Theo một phương án, chất làm trung hòa được bổ sung sau khi bước làm bất hoạt hoàn thành, có nghĩa là không thể phát hiện được sự sao chép của véc-tơ virus. Theo một phương án, chất làm trung hòa được bổ sung sau bước làm bất hoạt được thực hiện trong 24 giờ. Theo một phương án, chất làm trung hòa được bổ sung sau bước làm bất hoạt được thực hiện trong 30 giờ. Theo một phương án, chất làm trung hòa được bổ sung sau bước làm bất hoạt được thực hiện trong 48 giờ. Theo một phương án, chất làm trung hòa được bổ sung sau bước làm bất hoạt được thực hiện trong 72 giờ.

Lượng protein HA H5 chứa trong chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế có thể được định lượng bằng cách sử dụng phương pháp thông thường bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ, thử nghiệm hemagglutinin hóa (xem *OIE Terrestrial Manual 2015*, Chapter 2.3.1 & 2.3.2, Avian Influenza (lây nhiễm virus gây bệnh cúm gia cầm)). Theo một phương án, lượng protein HA H5 chứa trong chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế được xác định bằng thử nghiệm hemagglutinin hóa với tế bào hồng cầu gà, và lượng protein HA H5 có thể được biểu thị bằng đơn vị thử nghiệm hemagglutinin (HAU).

Thuật ngữ “HAU” để chỉ đơn vị hoạt tính để ngưng kết tế bào hồng cầu (RBC), và 1 HAU protein hemagglutinin để chỉ đơn vị tối thiểu gây ra sự ngưng kết khi hemagglutinin được trộn với RBC. HAU có thể được đánh giá bằng thử nghiệm hiệu giá ngưng kết hồng cầu. Trong thử nghiệm này, mẫu chứa protein hemagglutinin được đưa vào pha loãng theo chuỗi hai lần trong đĩa 96 giếng, và dung dịch RBC được bổ sung vào các giếng. Giá trị của HAU là độ pha loãng lớn nhất của mẫu dẫn đến ngưng kết hoàn toàn RBC. Ví dụ, nếu độ pha loãng lớn nhất của mẫu 25 μ l là 256, lượng protein hemagglutinin chứa trong mẫu là 256 HAU trên 25 μ l.

Để khơi ra đáp ứng miễn dịch hiệu quả theo sáng chế, lượng protein HA H5 chứa trong chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế là ít nhất 32 HAU trong mỗi liều.

Do đó, chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế bao gồm ít nhất 32 HAU trong mỗi liều protein HA H5 theo sáng chế. Theo khía cạnh khác nữa, chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế bao gồm ít nhất 64 HAU trong mỗi liều protein HA H5 theo sáng chế. Theo khía cạnh khác nữa, chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế bao gồm ít nhất 128 HAU trong mỗi liều protein HA H5 theo sáng chế. Theo khía cạnh khác nữa, chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế bao gồm ít nhất 256 HAU trong mỗi liều protein HA H5 theo sáng chế.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể xác định giới hạn trên của lượng protein HA H5 chỉ bằng cách tiến hành thử nghiệm thông thường. Nói chung, giới hạn trên được sử dụng bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ là khoảng 1024 HAU trong mỗi liều, nhưng cũng có thể cao hơn. Theo khía cạnh khác nữa, chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế bao gồm ít nhất 32 đến 1024 HAU trong mỗi liều protein HA H5 theo sáng chế. Theo khía cạnh khác nữa, chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế bao gồm ít nhất 64 đến 1024 HAU trong mỗi liều protein HA H5 theo sáng chế. Theo khía cạnh khác nữa, chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế bao gồm ít nhất 128 đến 1024 HAU trong mỗi liều protein HA H5 theo sáng chế. Theo khía cạnh khác nữa, chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế bao gồm ít nhất 256 đến 1024 HAU trong mỗi liều protein HA H5 theo sáng chế.

So với các loại vắc-xin bất hoạt toàn bộ virus thông thường được yêu cầu sản xuất ở Cấp độ An toàn sinh học 2 hoặc 3 (BSL-2, BSL-3), phương pháp sản xuất nêu trên nhằm sản xuất protein HA H5 đã được phân loại theo yêu cầu an toàn sinh học cấp độ 1.

Theo khía cạnh khác, sáng chế cũng đề xuất phương pháp ngăn ngừa và/hoặc điều trị lây nhiễm gây ra bởi AIV, bao gồm bước dùng lượng hữu hiệu của chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế, cho đối tượng cần điều trị. Sáng chế cũng đề xuất chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế dùng để ngăn ngừa và/hoặc điều trị lây nhiễm gây ra bởi AIV.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “ngăn ngừa” để chỉ sự giảm tỷ lệ mắc phải hoặc mức độ nghiêm trọng của các dấu hiệu lâm sàng của nhiễm cúm cho đến bao gồm

việc ngăn ngừa hoàn toàn các dấu hiệu lâm sàng đó. Hiệu lực bảo vệ ngăn ngừa của chế phẩm sinh miễn dịch có thể được đánh giá dựa trên tỷ lệ sống sót của đối tượng đã được chủng ngừa chống lại các nhóm AIV khác nhau. Theo một phương án, hiệu lực bảo vệ của chế phẩm sinh miễn dịch tăng ít nhất 10%, tốt hơn nữa là ít nhất 20%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 30%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 40%, tốt hơn nữa là ít nhất 50%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 60%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 70%, tốt hơn nữa là ít nhất 80%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 90%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 95%, và tốt nhất là 100% so với đối tượng không được tiếp nhận vắc-xin theo sáng chế nhưng đã phơi nhiễm với mức AIV lây nhiễm. Theo một phương án, hiệu lực bảo vệ của chế phẩm sinh miễn dịch là 100% đối với đối tượng đã được chủng ngừa chống lại các nhóm AIV khác nhau.

Theo một phương án, đối tượng cần được điều trị có thể là gia cầm, thậm chí tốt hơn nữa là chim, gà, vịt, gà tây và các loài tương tự. Theo một phương án, đối tượng là gà hoặc vịt.

Theo một phương án, AIV là phân nhóm H5. Theo một phương án, AIV là H5Nx. Theo một phương án, AIV HPAI H5Nx lưu hành chủ yếu ở Châu Á, Trung Đông và Châu Phi. Theo một phương án, H5Nx là H5N1, H5N2 và/hoặc H5N6 Theo một phương án, H5Nx là H5N1. Theo một phương án, H5Nx là H5N2. Theo một phương án, H5Nx là H5N6. Theo một phương án, H5Nx là H5N1 và H5N2. Theo một phương án, H5Nx là H5N2 và H5N6. Theo một phương án, AIV là nhánh 2, tốt hơn là nhánh 2.3, và tốt hơn nữa là các nhánh 2.3.4 và 2.3.2. Theo một phương án, AIV là nhánh 2.3.4.4, 2.3.2.1, 2.3.2.1d, hoặc 2.3.4.4d. Theo một phương án, AIV là nhánh 7.2.

H5Nx thuộc phân nhóm H5N1, H5N2 và/hoặc H5N6 là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "nhánh" để chỉ một nhóm các đơn vị phân loại sinh học (như loài) bao gồm tất cả con cháu của một tổ tiên chung. A/goose/Guangdong/1/96 được coi là tổ tiên của tất cả các virus thuộc dòng H5 và được định danh là nhánh 0. Danh pháp này hiện được sử dụng để phân biệt các nhóm biến thể của gen H5 HA, cho đến nay có khoảng 20 nhánh virus khác biệt đã được

chính thức xác định. Ngoài nhánh 0, 9 nhánh bổ sung (1-9) đã được mô tả và xác định dựa trên tất cả các trình tự được lưu giữ. Tuy nhiên, hầu hết các virus đã bị tuyệt chủng theo thời gian. Virus dòng H5 đã tiếp tục lưu hành trên gia cầm và chim hoang dã ở các khu vực châu Á, Trung Đông và châu Phi và tiếp tục phát triển. Chiếm ưu thế nhất dẫn đến các bệnh lây nhiễm lưu hành ở một số quốc gia khác nhau là virus nhánh 2, và các dòng phụ tiếp theo là kết quả của sự dịch chuyển của kháng nguyên được mô tả là nhánh bậc 2, 3, 4 và thậm chí là bậc 5. Danh pháp và nhánh đã xuất hiện có thể được nhìn thấy từ WHO/OIE/FAO. Tiếp tục tiến tới một danh pháp thống nhất cho virus gây bệnh cúm gia cầm H5N1 độc lực cao: mức độ phân kỳ thuộc nhánh virus 2.2. Influenza Other Respiration Viruses. *Letter*. 2009;3:59–62; WHO/OIE/FAO. Continued evolution of highly pathogenic avian influenza A (H5N1): updated nomenclature. *Influenza Other Respiration Viruses* 2012;6:1–5; và WHO-OIE-FAO HNEWG. Revised and updated nomenclature for highly pathogenic avian influenza A (H5N1) viruses. *Influenza Other Respiration Viruses* 2014;8:384–388.

Ví dụ, H5Nx thuộc nhánh 2.3.4.4 được mô tả trong *Lee et al., Emerging Infectious Diseases*, 2016; *Volume* 22(7) pp.1283-1284 và trong *Lee et al., Journal Veterinary Science* 2017; *Vol.(S1)*, pp.269-280. Avian influenza isolate A/common magpie/Hong Kong/5052/2007 (H5N1) được mô tả trong *Smith et al., Emerging Infectious Diseases*, 2009; *Volume* 15(3), pp.402-407 thuộc nhánh 2.3.2.1. Thể phân lập H5Nx khác thuộc nhánh 2.3.2.1, bao gồm A/chicken/India/CL03485/2011 (H5N1) hoặc A/chicken/India/CA0302/2011 (H5N1) được mô tả, ví dụ, trong *Bhat et al., 2015, Microbial Pathogenesis; volume* 88, pp.87-93. H5Nx khác nữa thuộc phân nhánh 2.3.2.1 cũng như thuộc 2.3.4.4, bao gồm 2.3.4.4d như, ví dụ, A/duck/Vietnam/HU1-1507/2014 (H5N6) hoặc A/duck/Vietnam/ HU1-1151/2014 (H5N6) được mô tả trong *Nguyen et al., 2019, Scientific Reports* 9; *Article* 7723, pp.1-13. Th thể phân lập H5Nx thuộc nhánh 7.2, bao gồm, ví dụ, (A/chicken/Gansu/62012 (H5N1)) được mô tả và xác định đặc điểm, ví dụ, trong *Liu et al., Journal of Virology* 2016, *Volume* 90(21), pp.9797-9804.

Theo một phương án, chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế có thể được dùng dưới da (S.C.) hoặc trong cơ (I.M.).

Thời gian dùng chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế có thể được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này theo yêu cầu thực tế. Ví dụ, đối với gà thịt trắng có tuổi thọ khoảng 40-50 ngày, chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế có thể được dùng trong một liều duy nhất; đối với gà thịt vàng có tuổi thọ khoảng 70 ngày, chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế có thể được dùng trong hai liều; và đối với gà như gà giống có tuổi thọ hơn một năm hoặc lâu hơn, chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế có thể được dùng trong nhiều liều. Theo một phương án, chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế được dùng trong một liều duy nhất. Theo một phương án, chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế được dùng trong nhiều liều, như 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10 liều. Theo một phương án, Khoảng thời gian trong khoảng hai liều là khoảng 4-6 tuần, như 4 tuần, 5 tuần hoặc 6 tuần.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này cũng có thể xác định khi liều dùng thứ nhất được đưa ra theo yêu cầu thực tế. Ví dụ, khi gà được chủng ngừa. Theo một phương án, chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế có thể được dùng đầu tiên vào ngày 1 tuổi hoặc muộn hơn, vào ngày 7 tuổi hoặc muộn hơn, vào ngày 10 tuổi hoặc muộn hơn, vào ngày 15 tuổi hoặc muộn hơn, hoặc vào ngày 21 tuổi hoặc muộn hơn. Theo một phương án, chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế được dùng vào ngày 1 tuổi hoặc muộn hơn, vào ngày 7 tuổi hoặc muộn hơn, vào ngày 10 tuổi hoặc muộn hơn, vào ngày 15 tuổi hoặc muộn hơn, hoặc vào ngày 21 tuổi hoặc muộn hơn. Theo một phương án, chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế được dùng từ ngày 1 ngày tuổi, từ ngày 7 ngày tuổi, từ ngày 10 tuổi, từ ngày 15 ngày tuổi, hoặc từ ngày 21 ngày tuổi trong một lần dùng duy nhất. Theo một phương án, chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế được dùng từ ngày 1 ngày tuổi trong một lần dùng duy nhất.

Theo khía cạnh khác, sáng chế cũng đề xuất phương pháp phân biệt động vật bị lây nhiễm tự nhiên AIV với động vật đã được chủng ngừa vắc-xin hoặc chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế. Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế để điều chế chất để phân biệt giữa động vật bị lây nhiễm tự nhiên AIV và động vật đã được chủng ngừa.

Theo một phương án, phương pháp bao gồm: a) phân tích mẫu của động vật trong thử nghiệm miễn dịch và/hoặc thử nghiệm phân tích bộ gen về sự có mặt của chất đánh dấu cúm gia cầm không có mặt trong chế phẩm sinh miễn dịch nhưng có mặt trong động vật bị lây nhiễm tự nhiên, trong đó thử nghiệm miễn dịch là thử nghiệm miễn dịch enzym hoặc thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym, hoặc thử nghiệm kết tủa gel aga, hoặc thử nghiệm thẩm tách Western b) xác định xem mẫu là dương tính hay âm tính với chất đánh dấu cúm gia cầm, và c) để tương quan kết quả thử nghiệm với tình trạng của động vật được thử nghiệm, trong đó động vật dương tính với chất đánh dấu cúm gia cầm là động vật bị lây nhiễm tự nhiên và động vật âm tính với chất đánh dấu cúm gia cầm là động vật đã được chủng ngừa bằng chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vắc-xin theo sáng chế.

Theo một phương án, phương pháp bao gồm: a) phân tích mẫu của động vật trong thử nghiệm miễn dịch và/hoặc thử nghiệm phân tích bộ gen về sự có mặt của chất đánh dấu cúm gia cầm đặc hiệu với chế phẩm sinh miễn dịch nhưng không có mặt trong động vật bị lây nhiễm tự nhiên, trong đó thử nghiệm miễn dịch là thử nghiệm miễn dịch enzym hoặc thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym, b) xác định xem mẫu là dương tính hoặc âm tính với chất đánh dấu cúm gia cầm, và c) làm tương quan kết quả thử nghiệm với tình trạng của động vật được thử nghiệm, trong đó động vật dương tính với chất đánh dấu cúm gia cầm là động vật đã được chủng ngừa bằng chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vắc-xin theo sáng chế.

Theo một phương án, động vật có thể là gia cầm, thậm chí tốt hơn nữa là chim, gà, vịt, gà tây và các loài tương tự. Theo một phương án, động vật là gà hoặc vịt.

Theo một phương án, AIV là phân nhóm H5. Theo một phương án, AIV là H5Nx. Theo một phương án, AIV là HPAI H5Nx lưu hành chủ yếu ở Châu Á, Trung Đông và Châu Phi. Theo một phương án, H5Nx là H5N1, H5N2 và/hoặc H5N6. Theo một phương án, H5Nx là H5N1. Theo một phương án, H5Nx là H5N2. Theo một phương án, H5Nx là H5N6. Theo một phương án, H5Nx là H5N1 và H5N2. Theo một phương án, H5Nx là H5N2 và H5N6.

Theo một phương án, AIV là nhánh 2, tốt hơn là nhánh 2.3, và tốt hơn nữa là các nhánh 2.3.4 và 2.3.2. Theo một phương án, AIV là nhánh 2.3.4.4 hoặc 2.3.2.1, 2.3.2.1d, hoặc 2.3.4.4d. Theo một phương án, AIV là nhánh 7.2.

Động vật được chủng ngừa vắc-xin hoặc chế phẩm sinh miễn dịch bao gồm protein HA H5 theo sáng chế sẽ chỉ có đáp ứng kháng thể chống lại kháng nguyên cụ thể này, trong khi đáp ứng âm tính với các thành phần virus khác. Một lợi thế nữa theo sáng chế là nó có lợi đối với khái niệm DIVA với ELISA đặc hiệu để phân biệt giữa động vật bị lây nhiễm AIV và động vật đã được chủng ngừa.

Theo khía cạnh khác, sáng chế cũng đề xuất kit, bao gồm protein HA H5 theo sáng chế, phân tử axit nucleic, véc-tơ, tế bào, hoặc vắc-xin hoặc chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế. Theo một phương án, kit có thể được sử dụng cho đối tượng như gia cầm, thậm chí tốt hơn nữa là chim, gà, vịt, gà tây và các loài tương tự. Theo một phương án, khi gà được chủng ngừa, protein HA H5, vắc-xin hoặc chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế có thể được sử dụng để chủng ngừa vào ngày 1 tuổi hoặc muộn hơn, vào ngày 7 tuổi hoặc muộn hơn, vào ngày 10 tuổi hoặc muộn hơn, vào ngày 15 tuổi hoặc muộn hơn, hoặc vào ngày 21 tuổi hoặc muộn hơn. Theo một phương án, chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế được dùng từ ngày 1 ngày tuổi, từ ngày 7 ngày tuổi, từ ngày 10 tuổi, từ ngày 15 ngày tuổi, hoặc từ ngày 21 ngày tuổi trong một lần dùng duy nhất. Theo một phương án, chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế được dùng từ ngày 1 ngày tuổi trong một lần dùng duy nhất.

Trừ khi có quy định khác, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học được sử dụng ở đây có cùng nghĩa như thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật mà sáng chế này thuộc về tại thời điểm nộp đơn. Nghĩa và phạm vi của các thuật ngữ phải rõ ràng; tuy nhiên, trong trường hợp có nghĩa mơ hồ tiềm ẩn bất kỳ, các định nghĩa được cung cấp ở đây được ưu tiên hơn từ điển hoặc định nghĩa bên ngoài bất kỳ. Hơn nữa, trừ khi có quy định khác, các thuật ngữ số ít sẽ bao gồm các từ số nhiều và các thuật ngữ số nhiều sẽ bao gồm số ít. Ở đây, việc sử dụng "hoặc" có nghĩa là "và/hoặc" trừ khi có quy định khác. Hơn nữa, việc sử dụng thuật ngữ "bao gồm", cũng như các dạng khác như "bao gồm" và "được bao gồm" không

làm giới hạn phạm vi của sáng chế. Tất cả các patent và các công bố được đề cập ở đây được đưa vào bản mô tả bằng cách tham khảo.

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

Cũng cần hiểu rằng thuật ngữ được sử dụng ở đây là chỉ nhằm mục đích mô tả các phương án cụ thể theo sáng chế, và không được dự định để giới hạn phạm vi của sáng chế. Cần phải lưu ý rằng, như được sử dụng trong bản mô tả và phần Yêu cầu bảo hộ kèm theo, các dạng số ít bằng tiếng Anh "a", "an" và "the" bao gồm các tham chiếu số nhiều trừ khi có quy định rõ ràng trong bản mô tả. Do đó, ví dụ, tham chiếu đến "kháng nguyên" bao gồm hỗn hợp của hai hoặc nhiều kháng nguyên, tham chiếu đến "chất mang" bao gồm hỗn hợp của hai hoặc nhiều chất mang, và các chất tương tự.

MỆNH ĐỀ

Các mệnh đề sau cũng được mô tả ở đây và một phần của bản mô tả theo sáng chế:

1. Chế phẩm sinh miễn dịch bao gồm protein hemagglutinin thuộc phân nhóm H5 của virus gây bệnh cúm gia cầm, trong đó protein hemagglutinin bao gồm:

- (a) các gốc axit amin 120N hoặc 120S, 155N, và 223N hoặc 223S; và
 - (b) một hoặc nhiều gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm: 61D, 87I, 99A, 102A, 110N, 136S, 140D, 149S, 156T, 157P, 170N, 172T, 178R, 190V, 191L, 200A, 226V, 243D, 268Y, 279A và 298I;
- với việc đánh số dựa vào các gốc axit amin như được nêu trong SEQ ID NO:1

2. Chế phẩm sinh miễn dịch theo mệnh đề 1, trong đó protein hemagglutinin bao gồm:

- (a) các gốc axit amin 61D, 87I, 99A, 102A, 110N, 120N, 136S, 140D, 149S, 155N, 156T, 157P, 170N, 172T, 178R, 190V, 191L, 200A, 223N, 226V, 243D, 268Y, 279A và 298I;
- (b) trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO: 6; hoặc
- (c) trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO: 5.

3. Chế phẩm sinh miễn dịch theo mệnh đề 1 hoặc 2, trong đó protein hemagglutinin bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO: 6.

4. Chế phẩm sinh miễn dịch theo mệnh đề 1 hoặc 2, trong đó protein hemagglutinin bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO: 5.

5. Chế phẩm sinh miễn dịch theo mệnh đề bất kỳ trong số các mệnh đề từ 1 đến 4, trong đó protein hemagglutinin được chứa trong môi trường nuôi cấy tế bào, và môi trường nuôi cấy tế bào được điều chế bằng cách nuôi cấy tế bào chứa véc-tơ biểu hiện có khả năng biểu hiện protein hemagglutinin như được xác định trong mệnh đề bất kỳ trong số các mệnh đề từ 1 đến 4.

6. Chế phẩm sinh miễn dịch theo mệnh đề bất kỳ trong số các mệnh đề từ 1 đến 5, trong đó véc-tơ biểu hiện bao gồm phân tử axit nucleic mã hóa protein hemagglutinin như được xác định trong mệnh đề bất kỳ trong số các mệnh đề từ 1 đến 4.

7. Chế phẩm sinh miễn dịch theo mệnh đề 6, trong đó phân tử axit nucleic có trình tự như được nêu trong SEQ ID NO: 10.

8. Chế phẩm sinh miễn dịch theo mệnh đề 6, trong đó phân tử axit nucleic có trình tự như được nêu trong SEQ ID NO: 11.

9. Chế phẩm sinh miễn dịch theo mệnh đề bất kỳ trong số các mệnh đề từ 5 đến 8, trong đó véc-tơ biểu hiện là baculovirut, và tế bào là tế bào côn trùng.

10. Chế phẩm sinh miễn dịch theo mệnh đề bất kỳ trong số các mệnh đề từ 5 đến 9, trong đó môi trường nuôi cấy tế bào được đưa vào bước làm bất hoạt, tốt hơn là bước làm bất hoạt bằng etylenimin nhị phân.

11. Chế phẩm sinh miễn dịch theo mệnh đề bất kỳ trong số các mệnh đề từ 5 đến 10, trong đó chế phẩm sinh miễn dịch bao gồm một phân hoặc toàn bộ môi trường nuôi cấy tế bào.

12. Chế phẩm sinh miễn dịch theo mệnh đề bất kỳ trong số các mệnh đề từ 1 đến 11, trong đó chế phẩm sinh miễn dịch còn bao gồm chất bổ trợ.

13. Chế phẩm sinh miễn dịch theo mệnh đề 12, trong đó chất bổ trợ là nhũ tương nước trong dầu.

14. Chế phẩm sinh miễn dịch theo mệnh đề bất kỳ trong số các mệnh đề từ 1 đến 13, trong đó chế phẩm sinh miễn dịch được dùng trong một liều duy nhất hoặc được dùng trong nhiều liều; và/hoặc chế phẩm sinh miễn dịch được dùng dưới da hoặc trong cơ; và/hoặc chế phẩm sinh miễn dịch là để dùng cho động vật ở 1 ngày tuổi trở lên, ở 7 ngày tuổi trở lên, ở 10 ngày tuổi trở lên, ở 15 ngày tuổi trở lên, hoặc ở 21 ngày tuổi trở lên.

15. Chế phẩm sinh miễn dịch theo mệnh đề bất kỳ trong số các mệnh đề từ 1 đến 14, trong đó chế phẩm sinh miễn dịch là để dùng cho động vật ở 1 ngày tuổi trở lên, ở 7 ngày tuổi trở lên, ở 10 ngày tuổi trở lên, ở 15 ngày tuổi trở lên, hoặc ở 21 ngày tuổi trở lên.

16. Chế phẩm sinh miễn dịch theo mệnh đề bất kỳ trong số các mệnh đề từ 1 đến 14, trong đó chế phẩm sinh miễn dịch là để dùng cho động vật từ ngày 21 ngày tuổi.

17. Chế phẩm sinh miễn dịch theo mệnh đề bất kỳ trong số các mệnh đề từ 1 đến 14, trong đó chế phẩm sinh miễn dịch là để dùng cho động vật từ ngày 15 ngày tuổi.

18. Chế phẩm sinh miễn dịch theo mệnh đề bất kỳ trong số các mệnh đề từ 1 đến 14, trong đó chế phẩm sinh miễn dịch là để dùng cho động vật từ ngày 7 ngày tuổi.

19. Chế phẩm sinh miễn dịch theo mệnh đề bất kỳ trong số các mệnh đề từ 1 đến 14, trong đó chế phẩm sinh miễn dịch là để dùng cho động vật từ ngày 1 ngày tuổi.

20. Chế phẩm sinh miễn dịch theo mệnh đề bất kỳ trong số các mệnh đề từ 1 đến 14, trong đó chế phẩm sinh miễn dịch là để dùng cho động vật từ ngày 1 ngày tuổi.

21. Chế phẩm sinh miễn dịch theo mệnh đề bất kỳ trong số các mệnh đề từ 1 đến 20, dùng để ngăn ngừa và/hoặc điều trị lây nhiễm gây ra bởi virus gây bệnh cúm gia cầm, tốt hơn là bởi H5Nx, tốt hơn nữa là bởi một hoặc nhiều H5N1, H5N2 và H5N6.

22. Chế phẩm sinh miễn dịch theo mệnh đề bất kỳ trong số các mệnh đề từ 1 đến 20, dùng để ngăn ngừa và/hoặc điều trị lây nhiễm gây ra bởi virus gây bệnh cúm gia cầm H5N1.

23. Chế phẩm sinh miễn dịch theo mệnh đề bất kỳ trong số các mệnh đề từ 1 đến 20, dùng để ngăn ngừa và/hoặc điều trị lây nhiễm gây ra bởi virus gây bệnh cúm gia cầm H5N2.

24. Chế phẩm sinh miễn dịch theo mệnh đề bất kỳ trong số các mệnh đề từ 1 đến 20, dùng để ngăn ngừa và/hoặc điều trị lây nhiễm gây ra bởi virus gây bệnh cúm gia cầm H5N6.

25. Chế phẩm sinh miễn dịch theo mệnh đề bất kỳ trong số các mệnh đề từ 1 đến 20, dùng để ngăn ngừa và/hoặc điều trị lây nhiễm gây ra bởi virus gây bệnh cúm gia cầm H5Nx thuộc nhánh 2, tốt hơn là nhánh 2.3, và tốt hơn nữa là các nhánh 2.3.4 hoặc 2.3.2.

26. Chế phẩm sinh miễn dịch theo mệnh đề bất kỳ trong số các mệnh đề từ 1 đến 20, dùng để ngăn ngừa và/hoặc điều trị lây nhiễm gây ra bởi virus gây bệnh cúm gia cầm H5Nx thuộc nhánh 2.

27. Chế phẩm sinh miễn dịch theo mệnh đề bất kỳ trong số các mệnh đề từ 1 đến 20, dùng để ngăn ngừa và/hoặc điều trị lây nhiễm gây ra bởi virus gây bệnh cúm gia cầm H5Nx thuộc nhánh 2.3.

28. Chế phẩm sinh miễn dịch theo mệnh đề bất kỳ trong số các mệnh đề từ 1 đến 20, dùng để ngăn ngừa và/hoặc điều trị lây nhiễm gây ra bởi virus gây bệnh cúm gia cầm H5Nx thuộc nhánh 2.3.4.

29. Chế phẩm sinh miễn dịch theo mệnh đề bất kỳ trong số các mệnh đề từ 1 đến 20, dùng để ngăn ngừa và/hoặc điều trị lây nhiễm gây ra bởi virus gây bệnh cúm gia cầm H5Nx thuộc nhánh 2.3.4.4.

30. Chế phẩm sinh miễn dịch theo mệnh đề bất kỳ trong số các mệnh đề từ 1 đến 20, dùng để ngăn ngừa và/hoặc điều trị lây nhiễm gây ra bởi virus gây bệnh cúm gia cầm H5Nx thuộc nhánh 2.3.4.4d.

31. Chế phẩm sinh miễn dịch theo mệnh đề bất kỳ trong số các mệnh đề từ 1 đến 20, dùng để ngăn ngừa và/hoặc điều trị lây nhiễm gây ra bởi virus gây bệnh cúm gia cầm H5Nx thuộc nhánh 2.3.2.

32. Chế phẩm sinh miễn dịch theo mệnh đề bất kỳ trong số các mệnh đề từ 1 đến 20, dùng để ngăn ngừa và/hoặc điều trị lây nhiễm gây ra bởi virus gây bệnh cúm gia cầm H5Nx thuộc nhánh 2.3.2.1

33. Chế phẩm sinh miễn dịch theo mệnh đề bất kỳ trong số các mệnh đề từ 1 đến 20, dùng để ngăn ngừa và/hoặc điều trị lây nhiễm gây ra bởi virus gây bệnh cúm gia cầm H5Nx thuộc nhánh 2.3.2.1d.

34. Chế phẩm sinh miễn dịch theo mệnh đề bất kỳ trong số các mệnh đề từ 1 đến 20, dùng để ngăn ngừa và/hoặc điều trị lây nhiễm gây ra bởi virus gây bệnh cúm gia cầm H5Nx thuộc nhánh 7.2.

35. Chế phẩm sinh miễn dịch theo mệnh đề bất kỳ trong số các mệnh đề từ 1 đến 34, trong đó chế phẩm sinh miễn dịch được dùng trong một liều duy nhất.

36. Chế phẩm sinh miễn dịch theo mệnh đề bất kỳ trong số các mệnh đề từ 1 đến 34, trong đó chế phẩm sinh miễn dịch được dùng dưới dạng một liều duy nhất và trong đó liều duy nhất này là hữu hiệu để ngăn ngừa và/hoặc điều trị lây nhiễm gây ra bởi virus gây bệnh cúm gia cầm.

37. Chế phẩm sinh miễn dịch theo mệnh đề bất kỳ trong số các mệnh đề từ 1 đến 34, trong đó chế phẩm sinh miễn dịch được dùng dưới dạng một liều duy nhất và trong đó liều duy nhất này là hữu hiệu để ngăn ngừa và/hoặc điều trị lây nhiễm gây ra bởi một hoặc nhiều H5N1, H5N2 và H5N6.

38. Chế phẩm sinh miễn dịch theo mệnh đề bất kỳ trong số các mệnh đề từ 1 đến 34, trong đó chế phẩm sinh miễn dịch được dùng dưới dạng một liều duy nhất và trong đó liều duy nhất này là hữu hiệu để ngăn ngừa và/hoặc điều trị lây nhiễm gây ra bởi H5Nx bất kỳ như được nêu trong các mệnh đề 22-34.

39. Phương pháp phân biệt động vật bị lây nhiễm tự nhiên virus gây bệnh cúm gia cầm với động vật đã được chủng ngừa bằng chế phẩm sinh miễn dịch theo mệnh đề bất kỳ trong số các mệnh đề từ 1 đến 13, bao gồm:

- (a) phân tích mẫu của động vật trong thử nghiệm miễn dịch và/hoặc thử nghiệm phân tích bộ gen về sự có mặt của chất đánh dấu cúm gia cầm không có mặt trong chế phẩm sinh miễn dịch nhưng có mặt trong động vật bị lây nhiễm tự nhiên, trong đó thử nghiệm miễn dịch là thử nghiệm miễn dịch enzym hoặc thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym,
- (b) xác định xem mẫu là dương tính hoặc âm tính với chất đánh dấu cúm gia cầm, và
- (c) làm tương quan kết quả thử nghiệm với tình trạng của động vật được thử nghiệm, trong đó động vật dương tính với chất đánh dấu cúm gia cầm là động vật bị lây nhiễm tự nhiên và động vật âm tính với chất đánh dấu cúm gia cầm là động vật đã được chủng ngừa bằng chế phẩm sinh miễn dịch theo mệnh đề bất kỳ trong số các mệnh đề từ 1 đến 13.

40. Phương pháp phân biệt động vật bị lây nhiễm tự nhiên virus gây bệnh cúm gia cầm với động vật đã được chủng ngừa bằng chế phẩm sinh miễn dịch theo mệnh đề bất kỳ trong số các mệnh đề từ 1 đến 13, bao gồm:

- (a) phân tích mẫu của động vật trong thử nghiệm miễn dịch và/hoặc thử nghiệm phân tích bộ gen về sự có mặt của chất đánh dấu cúm gia cầm đặc hiệu với chế phẩm sinh miễn dịch nhưng không có mặt trong động vật bị lây nhiễm tự nhiên, trong đó thử nghiệm miễn dịch là thử nghiệm miễn dịch enzym hoặc thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym,
- (b) xác định xem mẫu là dương tính hoặc âm tính với chất đánh dấu cúm gia cầm, và
- (c) làm tương quan kết quả thử nghiệm với tình trạng của động vật được thử nghiệm, trong đó động vật dương tính với chất đánh dấu cúm gia cầm là động vật đã được chủng ngừa bằng chế phẩm sinh miễn dịch theo mệnh đề bất kỳ trong số các mệnh đề từ 1 đến 13.

TỔNG QUAN VỀ TRÌNH TỰ

Các trình tự sau được trình bày chi tiết và được đề cập bằng cách này trong sáng chế:

SEQ ID NO: 1: Trình tự axit amin của protein HA của chủng duck/China/E319-2/03 nhưng thiếu hụt peptit tín hiệu của đầu tận cùng amino.

SEQ ID NO: 2: Trình tự axit amin của H5Con1.

SEQ ID NO: 3: Trình tự axit amin của H5Con3.

SEQ ID NO: 4: Trình tự axit amin của H5Con5.

SEQ ID NO: 5: Trình tự axit amin của H5Con5Mut.

SEQ ID NO: 6: Trình tự axit amin từ vị trí 60 đến 300 của H5Con5Mut.

SEQ ID NO: 7: Trình tự axit nucleic đã được tối ưu hóa của H5Con1.

SEQ ID NO: 8: Trình tự axit nucleic đã được tối ưu hóa của H5Con3.

SEQ ID NO: 9: Trình tự axit nucleic đã được tối ưu hóa của H5Con5.

SEQ ID NO: 10: Trình tự axit nucleic đã được tối ưu hóa của H5ConMut.

SEQ ID NO: 11: Trình tự axit nucleic đã được tối ưu hóa mã hóa trình tự axit amin từ vị trí 60 đến 300 của H5Con5Mut.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau được đưa vào nhằm minh họa thêm cho sáng chế được mô tả ở đây và để chứng minh các phương án theo sáng chế. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này cần hiểu rằng các kỹ thuật được bộc lộ trong các ví dụ tuân theo các kỹ thuật đại diện do các tác giả sáng chế tìm ra để hoạt động tốt trong thực tế sáng chế, và do đó có thể được coi là tạo thành các phương thức thực hành nó. Tuy nhiên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này nên hiểu rằng, theo sáng chế, nhiều thay đổi có thể được thực hiện trong các phương án cụ thể được bộc lộ và vẫn thu được kết quả giống hoặc tương tự cũng nằm trong tinh thần và phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1: Tạo ra trình tự axit amin liên ứng H5 HA và thể đột biến của chúng

Tạo ra trình tự axit amin liên ứng 1 HA bệnh cúm H5N1 1

Để tạo ra trình tự axit amin liên ứng 1 HA bệnh cúm H5N1 1 (H5Con1), 444 trình tự axit amin HA bệnh cúm chim H5N1 được phân lập ở Trung Quốc từ năm 1996 đến năm 2012 được thu gom và phân tích. 444 trình tự axit amin HA này được bao gồm thuộc nhánh 0, nhánh 2.2, nhánh 2.3.2, nhánh 2.3.2.1, nhánh 2.3.4, nhánh 2.4, nhánh 2.5, nhánh 3, nhánh 4, nhánh 5, nhánh 6 nhánh 7 và nhánh 9. Fig. 1 thể hiện phương pháp tuần tự để tạo ra H5Con1 từ 444 trình tự axit amin đã phân lập từ năm 1996 đến 2012. Trước tiên, 13 trình tự axit amin liên ứng tầng 1 được tạo ra, và mỗi tầng đại diện cho một nhánh riêng lẻ bằng cách sử dụng (1) 36 trình tự thuộc nhánh 0; (2) 31 trình tự thuộc nhánh 2.2; (3) 8 trình tự thuộc nhánh 2.3.2; (4) 49 trình tự thuộc nhánh 2.3.2.1, (5) 2 trình tự thuộc nhánh 2.3.3; (6) 210 trình tự thuộc nhánh 2.3.4; (7)

18 trình tự thuộc nhánh 2.4; (8) 6 trình tự thuộc nhánh 2.5; (9) 9 trình tự thuộc nhánh 3; (10) 5 trình tự thuộc nhánh 4; (11) 8 trình tự thuộc nhánh 5; (12) 3 trình tự thuộc nhánh 6; (13) 34 trình tự thuộc nhánh 7; và (14) 21 trình tự thuộc nhánh 9. Trình tự axit amin liên ứng cuối cùng là trình tự axit amin liên ứng tầng 2 được tạo ra bằng cách sắp hàng và phân tích tất cả 13 trình tự axit amin liên ứng tầng 1 bằng phần mềm MEGA 5.0. Trình tự axit amin liên ứng cuối cùng này được định danh là H5Con1 (SEQ ID NO: 2).

Tạo ra trình tự liên ứng HA 3 bệnh cúm H5N1

Để tạo ra trình tự axit amin liên ứng HA 3 bệnh cúm H5N1 (H5Con3), 297 trình tự axit amin HA bệnh cúm chim H5N1 được phân lập ở Trung Quốc từ năm 1996 đến năm 2012 được thu gom và phân tích. 297 trình tự axit amin HA này được cấu thành chỉ từ các nhánh cụ thể, tức là nhánh 2.3.2.1, nhánh 2.3.4, và nhánh 7. Fig. 2 thể hiện phương pháp một vòng để tạo ra H5Con3 từ 297 trình tự axit amin của các nhánh cụ thể đã phân lập từ năm 1996 đến 2012. Trình tự axit amin liên ứng cuối cùng được tạo ra bằng cách sắp hàng và phân tích (1) 49 trình tự thuộc nhánh 2.3.2.1, (2) 214 trình tự thuộc nhánh 2.3.4; và (3) 34 trình tự thuộc nhánh 7 bằng phần mềm MEGA 5.0. Trình tự axit amin liên ứng cuối cùng này được định danh là H5Con3 (SEQ ID NO: 3).

Tạo ra trình tự axit amin liên ứng HA 5 bệnh cúm H5N1

Để tạo ra trình tự axit amin liên ứng HA 5 bệnh cúm H5N1 5 (H5Con5), 196 trình tự axit amin HA bệnh cúm chim H5N1 được phân lập ở Trung Quốc từ năm 2005 đến năm 2012 được thu gom và phân tích. 196 trình tự axit amin HA này là từ các nhánh 0, 2.2, 2.3.1, 2.3.2, 2.3.2.1, 2.3.4, 2.4, 7 và 9. Fig. 3 thể hiện phương pháp một vòng để tạo ra H5Con5 từ 196 trình tự axit amin đã phân lập từ năm 2005 đến 2012. Tổng số 196 trình tự axit amin được sắp hàng đồng thời bằng phần mềm MEGA 5.0. Trình tự axit amin liên ứng cuối cùng được định danh là H5Con5 (SEQ ID NO: 4).

Phương pháp tạo ra H5Con1, H5Con3 và H5Con5 được tóm tắt trong Bảng 1.

Bảng 1. Bảng tóm tắt về ba trình tự axit amin liên ứng

	Kho vốn trình tự	Phương pháp sắp hàng
H5Con1	Tất cả trình tự axit amin (tổng số 444)	Tuần tự
H5Con3	Chỉ có nhánh 2.3.4 + 2.3.2.1 + 7,0	Một vòng
H5Con5	196 trình tự axit amin: 2005-2012	Một vòng

Tạo ra thể đột biến trình tự axit amin liên ứng HA 5 bệnh cúm H5N1

Để tạo ra thể đột biến trình tự axit amin liên ứng HA 5 bệnh cúm H5N1 (H5Con5Mut), hai đột biến axit amin được đưa vào trình tự axit amin của H5Con5. Ở các vị trí axit amin 120 và 223, cả hai Serin (S) được gây đột biến thành Asparagin (N), tức là S120N, và S223N. Trình tự axit amin của H5Con5Mut được thể hiện bằng SEQ ID NO: 5.

Phân tích về H5Con1, H5Con3 và H5Con5

Bảng 2 thể hiện tỷ lệ phần trăm đồng nhất của trình tự axit amin liên ứng của H5Con1, H5Con3 và H5Con5 và các trình tự từ các nhánh thông dụng. Bảng 3 thể hiện tiếp cách sử dụng axit amin của mỗi trình tự trong số các trình tự axit amin liên ứng của H5Con1, H5Con3 và H5Con5 ở một số vị trí kháng nguyên đã được dự đoán của protein HA H5.

Bảng 2. Tóm tắt về tỷ lệ phần trăm đồng nhất của trình tự axit amin liên ứng của H5Con1, H5Con3 và H5Con5 và các trình tự từ các nhánh thông dụng

Nhánh	Tỷ lệ phần trăm đồng nhất								
	2.3.2.1	2.3.4	2.2	2.3.1	2.3.2	2.4	7	0	9
H5Con1	94,89	98,06	98,42	99,47	98,94	99,30	96,83	98,06	98,77
H5Con3	95,25	98,94	97,54	98,94	98,77	98,24	96,48	97,01	97,71
H5Con5	94,72	99,24	97,54	98,94	98,77	98,24	96,48	97,01	97,71

Bảng 3. Tóm tắt về cách sử dụng axit amin của mỗi trình tự trong số các trình tự axit amin liên ứng của H5Con1, H5Con3 và H5Con5 ở các vị trí kháng nguyên đã được dự đoán của protein HA H5.

	61	87	99	102	110	136	140	149	156	157	170	172	178	190	191	200	226	243	268	279	298
2.3.2.1	N	I	A	A	N	D	D	A	N	S	D	A	K	V	L	E	V	D	Y	T	I
2.3.4	D	I	A	A	N	S	D	S	T	P	N	T	R	I	L	A	V	D	Y	A	I
7	D	I	A	A	D	S	N	S	K	P	N	T	R	V	L	A	V	E	Y	A	M
H5Con1	D	I	A	A	N	S	D	S	K	S	N	A	R	V	L	A	V	D	Y	A	M
H5Con3	D	I	A	A	N	S	D	S	N	P	N	T	R	V	L	E	V	D	Y	A	I
H5Con5	D	I	A	A	N	S	D	S	T	P	N	T	R	V	L	A	V	D	Y	A	I

Có thể thấy từ Bảng 2 và 3 rằng H5Con1, H5Con3 và H5Con5 khác nhau về trình tự axit amin so với các trình tự từ mỗi nhánh thông dụng, và cũng có một số thay đổi axit amin trong các vị trí kháng nguyên giữa ba nhánh thông dụng khác nhau.

Ví dụ 2: Tối ưu hóa trình tự axit nucleic của H5Con1, H5Con3, H5Con5 và H5Con5Mut, cấu trúc của hệ thống biểu hiện baculovirut tái tổ hợp và sự biểu hiện của H5Con1, H5Con3, H5Con5 và H5Con5Mut trong tế bào côn trùng

Tối ưu hóa trình tự axit nucleic của H5Con1, H5Con3, H5Con5 và H5Con5Mut

Để tối ưu hóa để biểu hiện tốt hơn, mỗi trình tự axit amin của H5Con1, H5Con3 và H5Con5 như được xác định trong Ví dụ 1 đã được suy luận ngược lại thành trình tự axit nucleic tương ứng bằng phần mềm Vector NTI và được tối ưu hóa để biểu hiện trong tế bào côn trùng của hệ thống biểu hiện Baculovirut (Allele Biotechnology, CAT ABP-BVP-10002). Trình tự axit nucleic đã được tối ưu hóa của H5Con1, H5Con3 và H5Con5 được tổng hợp bằng GenScript (GenScript, NJ, USA). Trình tự axit nucleic đã được tối ưu hóa của H5Con1, H5Con3 và H5Con5 được thể hiện lần lượt bằng trình tự nêu trong SEQ ID NO: 7-9. Trình tự axit nucleic đã được tối ưu hóa của H5Con5Mut được tạo ra bằng cách sử dụng kit để gây đột biến hướng vị trí (Kit gây đột biến hướng vị trí QuickChange, Cat #200518, Agilent) trên cơ sở trình tự axit nucleic đã được tối ưu hóa của H5Con5. Trình tự axit nucleic đã được tối ưu hóa của H5ConMut được thể hiện bằng SEQ ID NO: 10.

Cấu trúc của hệ thống biểu hiện baculovirut tái tổ hợp, và sự biểu hiện của H5Con1, H5Con3, H5Con5 và H5Con5Mut trong tế bào côn trùng

Mỗi trình tự axit nucleic đã được tối ưu hóa của H5Con1, H5Con3, H5Con5 và H5Con5Mut như được điều chế trên đây được cài xen vào véc-tơ dịch chuyển hệ thống

biểu hiện Baculovirut pVL1393 đã được bao gồm trong kit chuyển nhiễm và AND Baculovirut Sapphire™ (Allele Biotechnology, CAT ABP-BVD-10002), để tạo ra plasmit dịch chuyển, được định danh lần lượt là pVL1393-H5Con1, pVL1393-H5Con3, pVL1393-H5Con5, và pVL1393-H5Con5Mut. Fig. 4 thể hiện ví dụ cấu trúc của plasmit dịch chuyển pVL1393-H5Con5Mut.

Sau đó, mỗi pVL1393-H5Con1, pVL1393-H5Con3, pVL1393-H5Con5, và pVL1393-H5Con5Mut được đồng chuyển nhiễm với kiểu đại đã được tuyến tính hóa ADN Baculovirut Sapphire™ (ADN Baculovirut Sapphire™ và Kit chuyển nhiễm; Allele Biotechnology, CAT ABP-BVD-10002) vào các tế bào côn trùng sf9 (Invitrogen, Cat # B825-01, Lot #1030672), để thu được baculovirut tái tổ hợp đã được phục hồi. Baculovirut tái tổ hợp chứa trình tự axit nucleic đã được tối ưu hóa của H5Con1, H5Con3, H5Con5 và H5Con5Mut được định danh lần lượt là rBacH5Con1, rBacH5Con3, rBacH5Con5 và rBacH5Con5Mut và thu được các tế bào sf9 đã chuyển nhiễm chỉ chứa baculovirut tái tổ hợp.

Các tế bào sf9 đã chuyển nhiễm như được điều chế trên đây được nuôi cấy trong tủ ấm 27°C trong bốn ngày, và phần dịch nổi trên bề mặt của môi trường nuôi cấy tế bào được thu hoạch. Để thu được được virut tái tổ hợp tinh khiết, phần dịch nổi trên bề mặt đã thu hoạch sau đó được đưa vào tinh chế màng bám. Ba vòng tinh chế màng bám được thực hiện, và các màng virut chứa lần lượt rBacH5Con1, rBacH5Con3, rBacH5Con5 và rBacH5Con5Mut được nhặt ra sau bốn vòng tinh chế màng bám, để thu được rBacH5Con1, rBacH5Con3, rBacH5Con5 và rBacH5Con5Mut đã được tinh chế.

Mỗi rBacH5Con1, rBacH5Con3, rBacH5Con5 và rBacH5Con5Mut đã được tinh chế nêu trên được nhân giống tiếp trong huyền phù đã nuôi cấy tế bào SF+ của dòng tế bào côn trùng (môi trường không chứa huyết thanh cho tế bào côn trùng Ex-CELL® 420, Sigma-Aldrich, Cat. 14420C) trong bình lắc. Tóm lại, tế bào SF+ (Protein Sciences Corporation, Meriden, CT) được gieo mầm vào bình lắc ở mật độ 10^6 tế bào/ml, và mỗi rBacH5Con1, rBacH5Con3, rBacH5Con5 và rBacH5Con5Mut đã tinh chế nêu trên được cấy vào tế bào SF+ (Protein Sciences, Inc., Meriden, CT) với

MOI=0,01 đến MOI=1. Các tế bào SF+ đã cấy được nuôi cấy ở môi trường EX-CELL 420 ở 27°C, với tốc độ lắc 80-120 vòng/phút trong 3-7 ngày, và huyền phù môi trường nuôi cấy tế bào chứa lần lượt H5Con1, H5Con3, H5Con5 và H5Con5Mut đã được biểu hiện được thu hoạch sau đó để dùng trong bước tiếp theo. Huyền phù môi trường nuôi cấy tế bào đã được thu hoạch chứa số lượng tế bào trong khoảng $0,5-1,5 \times 10^6$ tế bào/ml.

Ví dụ 3: Xác định HAU của huyền phù môi trường nuôi cấy tế bào

HAU của huyền phù môi trường nuôi cấy tế bào chứa lần lượt H5Con1, H5Con3, H5Con5 và H5Con5Mut được thử nghiệm bằng thử nghiệm Haemsự ngưng kết (See *OIE Terrestrial Manual 2015*, Chapter 2.3.1 & 2.3.2, Avian Influenza (lây nhiễm virus gây bệnh cúm gia cầm)) với phương pháp pha loãng theo chuỗi hai lần. Tóm lại, 10 ml RBC (từ Southern Regent Plant, Zhejiang Province) được ly tâm ở 500 g trong 20 phút, và 1 thể tích RBC 4% đã ly tâm được bổ sung vào 3 thể tích PBS để tạo ra RBC 1%. 25 μ l PBS được phân phối vào giếng 1 đến giếng 11 trong đĩa 96 giếng. 25 μ l của mỗi huyền phù môi trường nuôi cấy tế bào được bổ sung vào giếng 1 đến giếng 11, và sau đó được pha loãng theo chuỗi từ 1: 2 đến 1: 2048 lần. 25 μ l RBC 1% được bổ sung vào tất cả các giếng và được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong khoảng 40 phút.

Các giếng âm tính xuất hiện dưới dạng các dấu chấm ở trung tâm của các giếng, và kết quả dương tính tạo thành màu đỏ đồng nhất trên toàn bộ giếng. Điểm cuối của độ pha loãng tương ứng với độ pha loãng lớn nhất của mẫu dẫn đến sự ngưng kết hoàn toàn của RBC. Kết quả cho thấy rằng HAU của huyền phù môi trường nuôi cấy tế bào của H5Con1, H5Con3, H5Con5 và H5Con5Mut là lớn hơn 71,1 HAU/25ul (tương ứng với 256 HAU/90 ul hoặc 256 HAU/liều).

Ví dụ 4: Điều chế chế phẩm sinh miễn dịch

Huyền phù môi trường nuôi cấy tế bào đã được thu hoạch với HAU lớn hơn 256/liều được đưa tiếp vào xử lý bằng etylenimin nhị phân (BEI) bằng cách bổ sung 10 mM dung dịch BEI ở 37°C trong 72 giờ, để làm bất hoạt sự lây nhiễm Baculovirus.

Sau đó, 10 mM dung dịch natri thiosulfat ở 4°C được bổ sung để làm trung hòa phần cặn BEI.

Sau khi làm bất hoạt, HAU của huyền phù môi trường nuôi cấy tế bào được đánh giá lại, và huyền phù môi trường nuôi cấy tế bào đã được làm bất hoạt với HAU lớn hơn 256/liều được sử dụng làm thành phần kháng nguyên hoạt tính được sử dụng cho quy trình nhũ tương hóa tiếp theo với chất bổ trợ.

Chế phẩm sinh miễn dịch chứa H5Con1, H5Con3, H5Con5 và H5Con5Mut được điều chế thành nhũ tương nước trong dầu. Tóm lại, nhũ tương nước trong dầu là hệ thống hai pha bao gồm pha dầu liên tục và pha nước phân tán, nhờ đó pha nước được phân tán dưới dạng các giọt nhỏ trong pha dầu. Pha dầu được sử dụng để điều chế chế phẩm sinh miễn dịch là chất bổ trợ có sẵn trên thị trường MONTANIDETM ISA 71R VG (do Seppic Inc sản xuất, Cat no: 365187), trong khi pha nước chứa mỗi huyền phù môi trường nuôi cấy tế bào đã được làm bất hoạt chứa H5Con1, H5Con3, H5Con5 và H5Con5Mut. Đối với mỗi liều (0,3 ml) chế phẩm sinh miễn dịch, khoảng 3 phần của pha nước (90 ul) được bổ sung đến khoảng 7 phần của pha dầu (210 ul) và phân tán dưới tốc độ cắt thấp (khoảng 11.000 vòng/phút trong 1 phút) ở nhiệt độ trong phòng, và sau đó ở tốc độ cắt cao 16.000 vòng/phút trong 2 phút trong bể nước đá. Thiết bị phân tán Micra (Máy phân tán, Cat No: Micra D-9, đầu phân tán, Cat No: DS-14/P) được sử dụng để tạo ra nhũ tương nước trong dầu. Đối với mỗi chế phẩm sinh miễn dịch chứa H5Con1, H5Con3, H5Con5 và H5Con5Mut, lượng H5Con1, H5Con3, H5Con5 và H5Con5Mut là ít nhất 256 HAU/liều.

Ví dụ 5: Thử nghiệm tính phản ứng chéo và chọn lọc đối với H5Con1, H5Con3, H5Con5 và H5Con5Mut

Trứng có phôi của gà SPF được mua từ SPAFAS Jinan. Sau khi ấp, gà SPF được chọn ngẫu nhiên và giữ trong các thiết bị cách ly được chỉ định. Trong thử nghiệm tính phản ứng chéo của H5Con1, H5Con3, H5Con5 và H5Con5Mut, Re-4 đến Re-8 và 03H5 (MutK+) được sử dụng để đánh giá các thử nghiệm tính phản ứng của H5Con1, H5Con3, H5Con5 và H5Con5Mut.

Re-4 đến Re-8 là vắc-xin đã được làm bất hoạt của toàn bộ AIV (phân nhóm H5) chống lại lần lượt các nhánh 7.2, 2.3.4, 2.3.2.1, 7.2 và 2.3.4.4, và chúng là sản phẩm thương mại từ Harbin Weike Biotechnology Development Co., Ltd. 03H5 (MutK+) là Baculovirut biểu hiện protein HA từ chủng A/duck/China/E319-2/03, ngoài các thay đổi sau của axit amin: S120N, D150N, S223N và K328 bổ sung (Xem WO2013024113A1). 03H5 (MutK+) được pha chế thành chế phẩm sinh miễn dịch bằng cách sử dụng phương pháp giống như H5Con1, H5Con3, H5Con5 và H5Con5Mut.

Mười con gà không có nguồn bệnh đặc biệt (SPF) ở 10 ngày tuổi được chủng ngừa một liều (0,3ml) lần lượt Re-4 đến Re-8 nêu trên và chế phẩm sinh miễn dịch qua đường dùng tiêm dưới da. Gà đã được chủng ngừa liên tục được giữ trong các ngăn cách ly. Mẫu huyết thanh gà riêng lẻ được thu thập trước khi chủng ngừa, hai tuần sau khi chủng ngừa và ba tuần sau khi chủng ngừa. Hơn nữa, các mẫu huyết thanh được chuẩn bị từ kho vốn gồm 10 con gà trong cùng một nhóm chủng ngừa được thử nghiệm để xác định phản ứng HI chéo của H5Con1, H5Con3, H5Con5 và H5Con5Mut bằng cách sử dụng thử nghiệm ức chế ngưng kết hồng cầu (HI) (Xem *OIE Terrestrial Manual 2015*, Chapter 2.3.4, Avian Influenza (lây nhiễm virut gây bệnh cúm gia cầm). Trong thử nghiệm HI, tính phản ứng chéo của H5Con1, H5Con3, H5Con5 và H5Con5Mut với 6 nhánh khác nhau (rBac03H5 là nhánh 2.3.2, Re4 là nhánh 7.2, Re5 là nhánh 2.3.4, Re6 là nhánh 2.3.2.1, Re7 là nhánh 7.2, và Re8 là nhánh 2.3.4.4.) của kháng nguyên được đánh giá.

Điểm số tính phản ứng HI chéo của Re-4 đến Re-8, 03H5 (MutK+), H5Con1, H5Con3, H5Con5 và H5Con5Mut được thể hiện trong Bảng 4. Trong Bảng 4, “+” là số kháng nguyên khác loại có nguồn gốc từ các nhánh khác nhau mà huyết thanh đã được thử nghiệm có thể phản ứng chéo với. Huyết thanh đã ghi điểm với “++++” đã chứng minh tính phản ứng chéo với 4 nhánh khác nhau, huyết thanh đã ghi điểm với “+++” đã chứng minh tính phản ứng chéo với 3 nhánh khác nhau, huyết thanh đã ghi điểm với “++” đã chứng minh tính phản ứng chéo với 2 nhánh khác nhau, và huyết thanh miễn dịch đã ghi điểm với “+” đã chứng minh tính phản ứng chéo chỉ với 1

nhánh. Điểm số từ “+” đến “++++” chỉ ra tính phản ứng chéo rộng hơn. Kháng nguyên tạo ra điểm số “++++” được chọn cho các thử nghiệm tiếp theo.

Bảng 4. Điểm số của tính phản ứng chéo

Huyết thanh được tạo ra từ:	Tính phản ứng HI chéo
03H5 (MutK+)	++++
H5Con1	+++
H5Con3	++++
H5Con5	n/a
H5Con5Mut	++++
Re-4 (nhánh 7.2)	++
Re-5 (nhánh 2.3.4)	++++
Re-6 (nhánh 2.3.2.1)	++
Re-7 (nhánh mới 7.2)	+
Re-8 (nhánh 2.3.4.4)	+

n/a = không áp dụng

Trên cơ sở kết quả về tính phản ứng chéo, có thể xác định được rằng H5Con5Mut có tính phản ứng chéo rộng hơn.

Ví dụ 6: Thử nghiệm kích thích virus và hiệu lực bảo vệ

Hiệu lực bảo vệ của 03H5MutK+ (nhánh 2.3.2), H5Con3 và H5Con5Mut được thử nghiệm tiếp trong ví dụ này. Trong thử nghiệm hiệu lực bảo vệ, Re6+7+8, 03H5MutK+ (nhánh 2.3.2), H5Con3 và H5Con5Mut được đánh giá. Re6+7+8 là vắc-xin hóa trị ba chống lại nhánh 2.3.2.1, nhánh 7.2 và nhánh 2.3.4.4 (hỗn hợp của Re6+ Re7+ Re8), và được mua từ Harbin Weike Biotechnology Development Co., Ltd. Re6+7+8 được sử dụng làm vắc-xin đối chứng dương tính đối với hiệu lực bảo vệ chống lại mỗi nhánh của virus kích thích. Kho dự trữ gồm ba virus cúm gia cầm có khả năng gây bệnh cao (HPAI) H5Nx khác nhau được tạo ra và sử dụng cho các thử nghiệm kích thích, 1) Chủng 383 (nhánh 2.3.2.1), 2) Chủng 14079 (nhánh 2.3.4.4), và 3) Chủng 13147 (nhánh 7.2). Gà SPF được chủng ngừa qua đường dùng dưới da ở 21 ngày tuổi với một liều (0,3 ml) oRe6+7+8, và chế phẩm sinh miễn dịch bao gồm lần lượt 03H5MutK+ (nhánh 2.3.2), H5Con3 và H5Con5Mut, mỗi loại với HAU tương

đương là ít nhất 256/liều. Gà đã được chủng ngừa được giữ trong cơ sở ABSL3 (Mức độ an toàn sinh học động vật 3).

Ba tuần (21 ngày) sau khi chủng ngừa, gà được kích thích bằng thuốc nhỏ mũi với một trong số ba virus kích thích H5Nx trong mỗi thử nghiệm. Liều lượng kích thích cho mỗi con gà là $6\text{Log}_{10}\text{EID}_{50}$ ($\text{EID}_{50} = 50\%$ liều lây nhiễm phôi, có nghĩa là lượng vi rút lây nhiễm gây sự lây nhiễm ở 50% số trứng đã được cấy vào phôi). Gà được theo dõi trong hai tuần sau kích thích, và tỷ lệ tử vong và bệnh tật của gà được ghi lại hàng ngày. Các miếng gác bằng bông của khí quản và lỗ huyết từ mỗi con gà được thu thập vào 3, 5 và 7 ngày sau khi kích thích. Mức phát tán của virus được thử nghiệm với các mẫu miếng gác bằng bông qua phôi gà dựa trên sự phân lập virus.

Đánh giá về hiệu lực bảo vệ chống lại mỗi virus kích thích dựa trên các tiêu chí sau: 1) liệu gà được chủng ngừa 100% có sống sót trong hai tuần theo dõi hay không (tỷ lệ tử vong 0%).

Các thử nghiệm động vật chủng ngừa/kích thích được thực hiện, và Bảng 5 thể hiện hiệu lực bảo vệ của Re6+7+8, 03H5MutK+ (nhánh 2.3.2), H5Con3 và H5Con5Mut.

Bảng 5. % mức bảo vệ chống lại từng kích thích virus

Nhóm chủng ngừa	Sự bảo vệ chống lại từng kích thích virus của các nhánh khác nhau		
	Nhánh 2.3.4.4	Nhánh 2.3.2.1	Nhánh 7.2
	% mức sống sót	% mức sống sót	% mức sống sót
Re6+7+8 (các nhánh 2.3.2.1, 7.2 và 2.3.4.4)	100%	100%	100%
03H5MutK+ (nhánh 2.3.2)	60%	N/A	N/A
H5Con5Mut	100%	100%	100%

n/a = không áp dụng

Đã chứng minh được rằng gà đã được chủng ngừa bằng chế phẩm sinh miễn dịch bao gồm H5Con5Mut có sự bảo vệ 100% khi được kích thích với virus HPAI với nhánh 2.3.4.4, nhánh 2.3.2.1 và nhánh 7.2. Tức là, so với các vắc-xin thông thường

như hỗn hợp của Re6+Re7+Re8, chế phẩm sinh miễn dịch bao gồm chính H5Con5Mut đã tạo ra sự bảo vệ vượt trội và rộng hơn chống lại ba nhánh AIV khác nhau ở cùng thời điểm.

Ví dụ 7: Thử nghiệm hiệu lực bảo vệ đối với các phân nhóm HPAI H5 khác nhau

Hiệu lực bảo vệ của H5Con5Mut đối với các phân nhóm HPAI H5 khác nhau được thử nghiệm tiếp trong ví dụ này.

Các nhóm 1a - 5a được đặt làm nhóm chủng ngừa mà H5Con5Mut được dùng, và các nhóm 1b - 5b được đặt làm nhóm đối chứng mà chỉ có kích thích HPAI được thực hiện. Mỗi nhóm chứa 12 con gà SPF 10 ngày tuổi. Vào ngày thử nghiệm (D0), gà trong các nhóm 1a - 5a được chủng ngừa qua đường dùng dưới da với một liều (0,3 ml) chế phẩm sinh miễn dịch bao gồm H5Con5Mut. Sau 21 ngày sau khi chủng ngừa (dpi), gà trong tất cả các nhóm được kích thích trong mũi với các phân nhóm HPAI H5 khác nhau, và liều lượng kích thích là $6\text{Log}_{10}\text{EID}_{50}/200\text{ul/gà}$. Trong quá trình 14 ngày sau khi kích thích, tỷ lệ mắc bệnh và tỷ lệ tử vong của gà trong mỗi nhóm được tính toán hàng ngày.

Các triệu chứng lâm sàng của HAPI bao gồm không đủ tinh thần, lông xù xì, giảm đáng kể cảm giác thèm ăn, ho, tiết dịch từ mũi và mắt, sung mắt, tím tái, tiêu chảy, các triệu chứng thần kinh. Về bề ngoài của ít nhất các triệu chứng lâm sàng này được sử dụng để tính toán tỷ lệ mắc bệnh. Tỷ lệ tử vong được tính bằng cách đếm số gà chết. % mức bảo vệ được tính toán bằng cách chia số gà đã được bảo vệ với tổng số gà được thử nghiệm.

Các phân nhóm HPAI H5 được sử dụng để kích thích như sau:

Tên:	Mô tả
SDZC	A/chicken/Shangdong/SDZC/2018 (H5N1) Nhánh 2.3.2.1(d)
DK383	A/Duck/Guangdong/383/2008 (H5N1) Nhánh 2.3.2.1
14079	A/Goose/Guangdong/079/2013 (H5N1) Nhánh 2.3.4.4
13147	A/Duck/Shandong/147/2013 (H5N2) Nhánh 7.2
17595	A/chicken/Guangdong/17595/2017(H5N6) Nhánh 2.3.4.4(d)

Các chủng kích thích thu được từ South China Agriculture University, Wushan Road, Tianhe District, Guangzhou, Guangdong Province, China, và là các thể phân lập đại diện của nhánh H5N1 (Các nhánh 2.3.3.1(d) và 2.3.4.4), H5N2 (Nhánh 7.2) và H5N6 (2.3.4.4(d)), được mô tả trên đây.

Hiệu lực bảo vệ đã quan sát được của H5Con5Mut chống lại các phân nhóm AIV H5 khác nhau được tóm tắt trong Bảng 6.

Bảng 6. % mức bảo vệ chống lại các phân nhóm HPAI H5 khác nhau

Nhóm	Chủng ngừa	Kích thích			Quan sát lâm sàng		
	Chủng ngừa	Chủng	Ngày	Liều dùng	Tỷ lệ mắc bệnh	Tỷ lệ tử vong	% mức bảo vệ
1a	H5Con5Mut	SDZC	21 dpi	$6\text{Log}_{10}\text{EID}_{50}/200\text{ul/gà}$	0/12	0/12	100%
1b	Không	SDZC			12/12	12/12	0
2a	H5Con5Mut	DK383			0/12	0/12	100%
2b	Không	DK383			12/12	12/12	0
3a	H5Con5Mut	14079			0/12	0/12	100%
3b	Không	14079			12/12	12/12	0
4a	H5Con5Mut	13147			0/12	0/12	100%
4b	Không	13147			12/12	12/12	0
5a	H5Con5Mut	17595			0/12	0/12	100%
5b	Không	17595			12/12	12/12	0

Bảng 6 cho thấy rằng trong mỗi nhóm đối chứng, mức kích thích trên 21 dpi là hợp lệ bởi vì tỷ lệ tử vong là 100% quan sát được trong 14 tuần sau kích thích, và H5Con5Mut đã chứng minh sự bảo vệ 100% khi gà được kích thích với H5N1, H5N2 và H5N6. Dữ liệu đã chứng minh được rằng H5Con5Mut đã tạo ra hiệu quả bảo vệ vượt trội và rộng hơn chống lại các phân nhóm HPAI H5 khác nhau.

Ví dụ 8: Thử nghiệm khởi phát bảo vệ của H5Con5Mut

Sự khởi phát bảo vệ H5Con5Mut đối với kích thích HPAI được thử nghiệm tiếp trong ví dụ này.

Các nhóm 1a và 2a được đặt làm nhóm chủng ngừa mà H5Con5Mut được dùng, và các nhóm 1b và 2b được đặt làm nhóm đối chứng chỉ có kích thích HPAI (chủng 14079) được thực hiện. Mỗi nhóm chứa 12 con gà SPF 10 ngày tuổi, và các thí nghiệm được lặp lại hai lần. Vào ngày thử nghiệm (D0), gà trong các nhóm 1a và 2a được chủng ngừa qua đường dùng dưới da với một liều (0,3 ml) chế phẩm sinh miễn dịch bao gồm H5Con5Mut. Sau 7 ngày sau chủng ngừa (dpi), gà trong các nhóm 1a và 1b được kích thích trong mũi bằng chủng 14079. Sau 14 ngày sau chủng ngừa (dpi), gà trong các nhóm 2a và 2b được kích thích trong mũi bằng chủng 14079. Liều lượng kích thích là $6\text{Log}_{10}\text{EID}_{50}/200\text{ul/gà}$. Trong 14 ngày sau khi kích thích, tỷ lệ mắc bệnh và tỷ lệ tử vong của gà trong mỗi nhóm được tính toán hàng ngày. Sự khởi phát bảo vệ quan sát được của H5Con5Mut được tóm tắt trong Bảng 7.

Bảng 7. Sự khởi phát bảo vệ của H5Con5Mut đối với kích thích HPAI

	Chủng ngừa	Kích thích			Quan sát lâm sàng		
Nhóm	Chủng ngừa	Chủng	Ngày	Liều dùng	Tỷ lệ mắc bệnh	Tỷ lệ tử vong	% mức bảo vệ
1a	H5Con5Mut	14079	7dpi	$6\text{Log}_{10}\text{EID}_{50}/200\text{ul/gà}$	6/12	6/12	50%
1b	Không		7dpi		12/12	12/12	0
2a	H5Con5Mut		14dpi		0/12	0/12	100%
2b	Không		14dpi		12/12	12/12	0

Bảng 7 đã chứng minh được rằng H5Con5Mut tạo ra sự bảo vệ sớm nhất là 7dpi, với sự bảo vệ 100% ở 14 dpi. Dữ liệu đã chứng minh được rằng H5Con5Mut tạo ra sự bảo vệ nhanh và sớm đối với kích thích HPAI.

Ví dụ 9: Thử nghiệm thời gian bảo vệ của H5Con5Mut

Thời gian bảo vệ của H5Con5Mut đối với kích thích HPAI được thử nghiệm tiếp trong ví dụ này.

Các nhóm 1-3 được đặt làm nhóm chủng ngừa mà H5Con5Mut được dùng, và nhóm 4 được đặt làm nhóm đối chứng chỉ có kích thích HPAI (chủng 14079) được thực hiện. Mỗi nhóm chứa 12 con gà SPF 10 ngày tuổi, và các thí nghiệm đã được thực

hiện hai lần. Vào ngày thử nghiệm (D0), gà trong các nhóm 1-3 được chủng ngừa qua đường dùng dưới da với một liều (0,3 ml) chế phẩm sinh miễn dịch bao gồm H5Con5Mut. Sau 28dpi, 35dpi và 42dpi, gà trong các nhóm 1-3 lần lượt được kích thích trong mũi bằng chủng 14079. Trong nhóm đối chứng, gà được kích thích trong mũi bằng chủng 14079 sau 28 dpi. Liều lượng kích thích là $6\text{Log}_{10}\text{EID}_{50}/200\text{ul/gà}$. Trong 14 ngày sau khi kích thích, tỷ lệ mắc bệnh và tỷ lệ tử vong của gà trong mỗi nhóm được tính toán hàng ngày. Thời gian bảo vệ quan sát được của H5Con5Mut được tóm tắt trong Bảng 8.

Bảng 8. Thời gian bảo vệ của H5Con5Mut đối với kích thích HPAI

	Chủng ngừa	Kích thích			Quan sát lâm sàng		
Nhóm	Chủng ngừa	Chủng	Ngày	Liều dùng	Tỷ lệ mắc bệnh	Tỷ lệ tử vong	% mức bảo vệ
1	H5Con5Mut	14079	28dpi	$6\text{Log}_{10}\text{EID}_{50}/200\text{ul/gà}$	0/12	0/12	100%
2	H5Con5Mut		35dpi		0/12	0/12	100%
3	H5Con5Mut		42dpi		0/12	0/12	100%
4	Không		28dpi		12/12	12/12	0

Bảng 8 đã cho thấy rằng H5Con5Mut tạo ra sự bảo vệ 100% kéo dài đối với ít nhất 42dpi. Dữ liệu đã chứng minh được rằng H5Con5Mut tạo ra sự bảo vệ kéo dài và hiệu quả đối với kích thích HPAI.

Ví dụ 10: Thử nghiệm bảo vệ đối với gà với các ngày tuổi khác nhau

Sự bảo vệ H5Con5Mut đối với gà với các ngày tuổi khác nhau đối với kích thích HPAI được thử nghiệm tiếp trong ví dụ này.

Các nhóm 1-2 được đặt làm nhóm chủng ngừa mà H5Con5Mut được dùng, và nhóm 3 được đặt làm nhóm đối chứng chỉ sự kích thích HPAI (chủng 14079) được thực hiện. Mỗi nhóm chứa 12 con gà SPF, và các thí nghiệm đã được thực hiện hai lần. Trong nhóm 1, gà 1 ngày tuổi được chủng ngừa qua đường dùng dưới da với một liều (0,3 ml) chế phẩm sinh miễn dịch bao gồm H5Con5Mut. Trong nhóm 2, gà 10 ngày tuổi được chủng ngừa qua đường dùng dưới da với một liều (0,3 ml) chế phẩm sinh

miễn dịch bao gồm H5Con5Mut. Sau 21dpi, gà trong các nhóm 1-3 lần lượt được kích thích trong mũi bằng chủng 14079. Liều lượng kích thích là $6\text{Log}_{10}\text{EID}_{50}/200\text{ul/gà}$. Trong 14 ngày sau khi kích thích, tỷ lệ mắc bệnh và tỷ lệ tử vong của gà trong mỗi nhóm được tính toán hàng ngày. Sự bảo vệ quan sát được của H5Con5Mut đối với gà với các ngày tuổi khác nhau được tóm tắt trong Bảng 9.

Bảng 9. Sự bảo vệ của H5Con5Mut đối với gà với các ngày tuổi khác nhau

	Chủng ngừa		Kích thích			Quan sát lâm sàng		
Nhóm	Chủng ngừa	Độ tuổi	Chủng	Ngày	Liều dùng	Tỷ lệ mắc bệnh	Tỷ lệ tử vong	% mức bảo vệ
1	H5Con5Mut	1d	14079	21 dpi	6Log10EID ₅₀ /200ul/gà	0/12	0/12	100%
2	H5Con5Mut	10d				0/12	0/12	100%
3	Không					12/12	12/12	0

Bảng 9 đã cho thấy rằng H5Con5Mut tạo ra sự bảo vệ 100% đối với gà 1 ngày tuổi đối với kích thích HPAI. Dữ liệu đã chứng minh được rằng H5Con5Mut tạo ra sự bảo vệ vượt trội đối với gà ngay cả từ khi mới nở.

Ví dụ 11: Thử nghiệm bảo vệ của các đường dùng khác nhau

Sự bảo vệ của H5Con5Mut đối với gà qua các đường dùng khác nhau được thử nghiệm tiếp trong ví dụ này.

Các nhóm 1-2 được đặt làm nhóm chủng ngừa mà H5Con5Mut được dùng, và nhóm 3 được đặt làm nhóm đối chứng mà chỉ sự kích thích HPAI (chủng 14079) được thực hiện. Mỗi nhóm chứa 12 con gà SPF 10 ngày tuổi, và các thí nghiệm đã được thực hiện hai lần. Vào ngày thử nghiệm (D0), gà trong các nhóm 1-2 được chủng ngừa qua đường dùng dưới da với một liều (0,3 ml) chế phẩm sinh miễn dịch bao gồm H5Con5Mut qua đường dùng dưới da (S.C.) hoặc trong cơ (I.M.). Sau 21dpi, gà trong các nhóm 1-3 lần lượt được kích thích trong mũi bằng chủng 14079. Liều lượng kích thích là $6\text{Log}_{10}\text{EID}_{50}/200\text{ul/gà}$. Trong 14 ngày sau khi kích thích, tỷ lệ mắc bệnh và tỷ lệ tử vong của gà trong mỗi nhóm được tính toán hàng ngày. Sự bảo vệ quan sát được

của H5Con5Mut đối với gà qua các đường dùng khác nhau được tóm tắt trong Bảng 10.

Bảng 10. Sự bảo vệ của H5Con5Mut đối với gà qua các đường dùng khác nhau

	Chủng ngừa			Kích thích			Quan sát lâm sàng		
Nhóm	Chủng ngừa	Độ tuổi	Đường dùng	Chủng	Ngày	Liều dùng	Tỷ lệ mắc bệnh	Tỷ lệ tử vong	% mức bảo vệ
1	H5Con5Mut	10d	S.C.	14079	21 dpi	6Log ₁₀ EID ₅₀ /200ul/gà	0/12	0/12	100%
2	H5Con5Mut	10d	I.M.				0/12	0/12	100%
3	Không						12/12	12/12	0

Bảng 10 đã cho thấy rằng H5Con5Mut tạo ra sự bảo vệ vượt trội đối với gà qua cả hai đường dùng S.C. và I.M., và hiệu lực bảo vệ của H5Con5Mut không bị giới hạn ở đường dùng nhất định. Cách dùng linh hoạt cho phép H5Con5Mut thích hợp cho gà ở các trạng thái sinh trưởng khác nhau như gà mới nở có ít cơ

Tất cả các chế phẩm và phương pháp được bộc lộ và yêu cầu bảo hộ ở đây có thể được tạo ra và thực hiện mà không cần có thử nghiệm quá mức theo sáng chế. Mặc dù các thành phần và phương pháp theo sáng chế đã được mô tả theo các phương án được lấy làm ví dụ, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hiển nhiên hiểu rằng các biến thể có thể được áp dụng cho các chế phẩm và phương pháp và trong các bước hoặc theo trình tự của các bước của phương pháp được mô tả ở đây mà không tách rời khỏi khái niệm, tinh thần và phạm vi của sáng chế. Cụ thể hơn, rõ ràng là các tác nhân nhất định có liên quan cả về mặt hóa học và sinh lý học có thể được thay thế cho các tác nhân được mô tả ở đây trong khi vẫn đạt được kết quả giống hệt hoặc tương tự. Tất cả các thay thế và cải biến tương tự như vậy là hiển nhiên đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này được coi là nằm trong khái niệm, tinh thần và phạm vi của sáng chế như được xác định trong phần Yêu cầu bảo hộ sau.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm sinh miễn dịch bao gồm protein hemagglutinin thuộc phân nhóm H5 của virus gây bệnh cúm gia cầm, trong đó protein hemagglutinin bao gồm:
 - (a) trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO: 6; hoặc
 - (b) trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO: 5.
2. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm 1, trong đó protein hemagglutinin được chứa trong môi trường nuôi cấy tế bào, và môi trường nuôi cấy tế bào được điều chế bằng cách nuôi cấy tế bào chứa véc-tơ biểu hiện, trong đó véc-tơ biểu hiện bao gồm phân tử axit nucleic mã hóa protein hemagglutinin như được xác định ở điểm 1.
3. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm 2, trong đó phân tử axit nucleic có trình tự như được nêu trong SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11.
4. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 3, trong đó véc-tơ biểu hiện là baculovirus, và tế bào là tế bào côn trùng.
5. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 4, trong đó môi trường nuôi cấy tế bào được đưa vào bước làm bất hoạt.
6. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 5, trong đó chế phẩm sinh miễn dịch bao gồm một phần hoặc toàn bộ môi trường nuôi cấy tế bào.
7. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó chế phẩm sinh miễn dịch còn bao gồm chất bổ trợ.
8. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm 7, trong đó chất bổ trợ là nhũ tương nước trong dầu.

Kho vốn tất cả các trình tự (444)	Trình tự liên ứng hiệu giá 1	Trình tự liên ứng hiệu giá 2 (cuối cùng)
Trình tự nhánh 0 (36)	→ Trình tự liên ứng nhánh 0	H5Con1
Trình tự nhánh 2.2 (31)	→ Trình tự liên ứng nhánh 2.2	
Trình tự nhánh 2.3.2 (8)	→ Trình tự liên ứng nhánh 2.3.2	
Trình tự nhánh 2.3.2.1 (49)	→ Trình tự liên ứng nhánh 2.3.2.1	
Trình tự nhánh 2.3.3 (2)	→ Trình tự liên ứng nhánh 2.3.3	
Trình tự nhánh 2.3.4 (214)	→ Trình tự liên ứng nhánh 2.3.4	
Trình tự nhánh 2.4 (18)	→ Trình tự liên ứng nhánh 2.4	
Trình tự nhánh 2.5 (6)	→ Trình tự liên ứng nhánh 2.5	
Trình tự nhánh 3 (9)	→ Trình tự liên ứng nhánh 3	
Trình tự nhánh 4 (5)	→ Trình tự liên ứng nhánh 4	
Trình tự nhánh 5 (8)	→ Trình tự liên ứng nhánh 5	
Trình tự nhánh 6 (3)	→ Trình tự liên ứng nhánh 6	
Trình tự nhánh 7 (34)	→ Trình tự liên ứng nhánh 7	
Trình tự nhánh 9 (21)	→ Trình tự liên ứng nhánh 9	

Fig.1.

Kho vốn các trình tự (297)	Trình tự liên ứng cuối cùng
Trình tự nhánh 2.3.2.1 (49)	H5Con3
Trình tự nhánh 2.3.4 (214)	
Trình tự nhánh 7 (34)	

Fig. 2.

Kho vốn các trình tự (196) Từ năm 2005-2012	Trình tự liên ứng cuối cùng
Trình tự nhánh 2.2 (31)	H5Con5
Trình tự nhánh 2.3.2 (2)	
Trình tự nhánh 2.3.2.1 (47)	
Trình tự nhánh 2.3.4 (80)	
Trình tự nhánh 7 (34)	
Trình tự giống nhánh 1_2_8 (2)	

Fig.3.

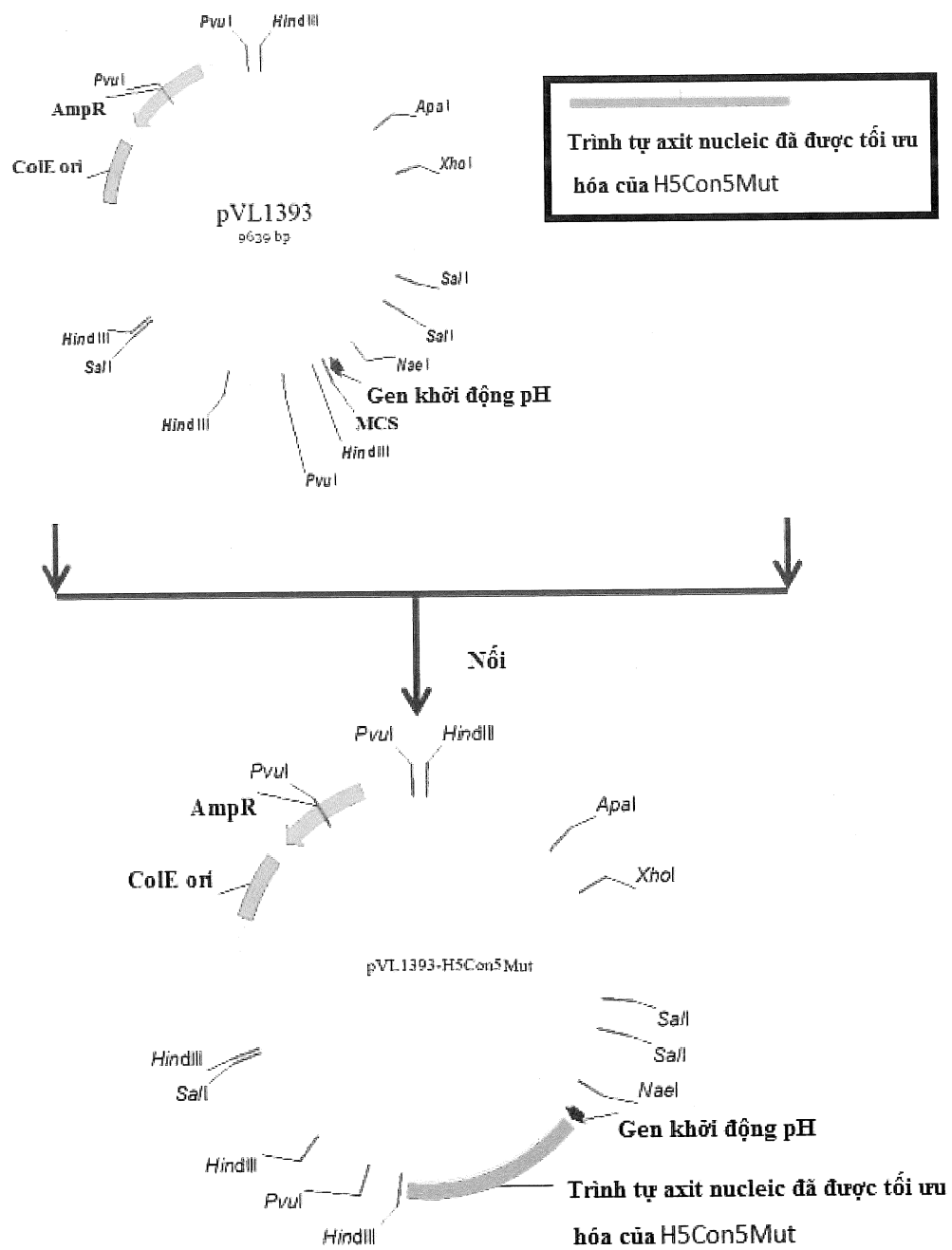


Fig 4

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Boehringer Ingelheim Vetmedica GMBH
Boehringer Ingelheim (China) Investment Co., Ltd.

<120> Chế phẩm sinh miễn dịch chống lại phân nhóm H5 của virus gây bệnh cúm gia cầm

<130> P19-0002-WO-2

<160> 11

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1
<211> 551
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự axit amin của protein HA của chủng
duck/China/E319-2/03 nhưng thiếu hụt peptit tín hiệu của đầu tận
cùng amino.

<400> 1

Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Glu Gln Val
1 5 10 15

Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile
20 25 30

Leu Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys
35 40 45

Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn
50 55 60

Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val
65 70 75 80

Glu Lys Ala Asn Pro Ala Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asn Phe Asn
85 90 95

Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu
100 105 110

Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys Ser Ser Trp Ser Asp His Glu Ala Ser
115 120 125

Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Gln Gly Ser Ser Ser Phe Phe
130 135 140

Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Asp Ala Tyr Pro Thr Ile
 145 150 155 160

Lys Arg Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Gln Glu Asp Leu Leu Val Leu Trp
 165 170 175

Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Arg Leu Tyr Gln
 180 185 190

Asn Pro Thr Thr Tyr Ile Ser Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg
 195 200 205

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

Arg Met Asp Phe Phe Trp Thr Ile Leu Lys Pro Asn Asp Ala Ile Asn
 225 230 235 240

Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile
 245 250 255

Val Lys Lys Gly Asp Ser Ala Ile Met Lys Ser Glu Val Glu Tyr Gly
 260 265 270

Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Met Gly Ala Ile Asn Ser Ser
 275 280 285

Met Pro Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys
 290 295 300

Tyr Val Lys Ser Asn Lys Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Ser
 305 310 315 320

Pro Gln Arg Glu Arg Arg Arg Lys Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala
 325 330 335

Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly
 340 345 350

Tyr His His Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys Glu
 355 360 365

Ser Thr Gln Lys Ala Ile Asp Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser Ile
 370 375 380

Ile Asp Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe Asn

3

```

35              40              45

Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn
50              55              60

Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val
65              70              75              80

Glu Lys Ala Asn Pro Ala Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asn Phe Asn
85              90              95

Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu
100             105             110

Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys Ser Ser Trp Ser Asp His Glu Ala Ser
115             120             125

Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Gln Gly Lys Ser Ser Phe Phe
130             135             140

Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Ser Ala Tyr Pro Thr Ile
145             150             155             160

Lys Arg Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Gln Glu Asp Leu Leu Val Leu Trp
165             170             175

Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Lys Leu Tyr Gln
180             185             190

Asn Pro Thr Thr Tyr Ile Ser Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg
195             200             205

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

Arg Met Glu Phe Phe Trp Thr Ile Leu Lys Pro Asn Asp Ala Ile Asn
225             230             235             240

Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile
245             250             255

Val Lys Lys Gly Asp Ser Ala Ile Met Lys Ser Glu Leu Glu Tyr Gly
260             265             270

Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Met Gly Ala Ile Asn Ser Ser
275             280             285

```

Met Pro Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys
 290 295 300

Tyr Val Lys Ser Asn Arg Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Ser
 305 310 315 320

Pro Gln Arg Glu Arg Arg Arg Lys Lys Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile
 325 330 335

Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr
 340 345 350

Gly Tyr His His Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys
 355 360 365

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

Ile Ile Asp Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe
 385 390 395 400

Asn Asn Leu Glu Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp
 405 410 415

Gly Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met
 420 425 430

Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu
 435 440 445

Tyr Asp Lys Val Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly
 450 455 460

Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu
 465 470 475 480

Ser Val Arg Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala
 485 490 495

Arg Leu Lys Arg Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly
 500 505 510

Thr Tyr Gln Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala
 515 520 525

Leu Ala Ile Met Val Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met Cys Ser Asn Gly

6

	180		185		190										
Gly	Ile	His	His	Pro	Asn	Asp	Glu	Ala	Glu	Gln	Thr	Lys	Leu	Tyr	Gln
	195						200					205			
Asn	Pro	Thr	Thr	Tyr	Ile	Ser	Val	Gly	Thr	Ser	Thr	Leu	Asn	Gln	Arg
	210					215					220				
Leu	Val	Pro	Lys	Ile	Ala	Thr	Arg	Ser	Lys	Val	Asn	Gly	Gln	Ser	Gly
225					230					235					240
Arg	Met	Asp	Phe	Phe	Trp	Thr	Ile	Leu	Lys	Pro	Asn	Asp	Ala	Ile	Asn
				245					250					255	
Phe	Glu	Ser	Asn	Gly	Asn	Phe	Ile	Ala	Pro	Glu	Tyr	Ala	Tyr	Lys	Ile
			260					265					270		
Val	Lys	Lys	Gly	Asp	Ser	Ala	Ile	Met	Lys	Ser	Glu	Val	Glu	Tyr	Gly
	275						280					285			
Asn	Cys	Asn	Thr	Lys	Cys	Gln	Thr	Pro	Ile	Gly	Ala	Ile	Asn	Ser	Ser
	290					295					300				
Met	Pro	Phe	His	Asn	Ile	His	Pro	Leu	Thr	Ile	Gly	Glu	Cys	Pro	Lys
305					310					315					320
Tyr	Val	Lys	Ser	Asn	Lys	Leu	Val	Leu	Ala	Thr	Gly	Leu	Arg	Asn	Ser
				325					330					335	
Pro	Gln	Arg	Glu	Arg	Arg	Arg	Lys	Lys	Arg	Gly	Leu	Phe	Gly	Ala	Ile
			340					345					350		
Ala	Gly	Phe	Ile	Glu	Gly	Gly	Trp	Gln	Gly	Met	Val	Asp	Gly	Trp	Tyr
		355					360					365			
Gly	Tyr	His	His	Ser	Asn	Glu	Gln	Gly	Ser	Gly	Tyr	Ala	Ala	Asp	Lys
	370					375					380				
Glu	Ser	Thr	Gln	Lys	Ala	Ile	Asp	Gly	Val	Thr	Asn	Lys	Val	Asn	Ser
385					390					395					400
Ile	Ile	Asp	Lys	Met	Asn	Thr	Gln	Phe	Glu	Ala	Val	Gly	Arg	Glu	Phe
				405					410					415	
Asn	Asn	Leu	Glu	Arg	Arg	Ile	Glu	Asn	Leu	Asn	Lys	Lys	Met	Glu	Asp
		420						425					430		

Gly Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met
435 440 445

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

Tyr Asp Lys Val Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly
465 470 475 480

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

Ser Val Arg Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala
500 505 510

Arg Leu Lys Arg Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly
515 520 525

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

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

Ser Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile
565

<210> 4
<211> 567
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự axit amin của H5Con5

<400> 4

Met Glu Lys Ile Val Leu Leu Leu Ala Ile Val Ser Leu Val Lys Ser
1 5 10 15

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

Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile
35 40 45

Leu Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys
50 55 60

Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn
 65 70 75 80

Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val
 85 90 95

Glu Lys Ala Asn Pro Ala Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asn Phe Asn
 100 105 110

Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu
 115 120 125

Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys Ser Ser Trp Ser Asp His Glu Ala Ser
 130 135 140

Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Gln Gly Asn Pro Ser Phe Phe
 145 150 155 160

Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Asn Thr Tyr Pro Thr Ile
 165 170 175

Lys Arg Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Gln Glu Asp Leu Leu Val Leu Trp
 180 185 190

Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Arg Leu Tyr Gln
 195 200 205

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

Leu Val Pro Lys Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly
 225 230 235 240

Arg Met Asp Phe Phe Trp Thr Ile Leu Lys Pro Asn Asp Ala Ile Asn
 245 250 255

Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile
 260 265 270

Val Lys Lys Gly Asp Ser Ala Ile Met Lys Ser Glu Val Glu Tyr Gly
 275 280 285

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

Met Pro Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys

```

305                      310                      315                      320

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

Pro Gln Arg Glu Arg Arg Arg Lys Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala
                340                      345                      350

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

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

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

Ile Asp Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe Asn
                405                      410                      415

Asn Leu Glu Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp Gly
                420                      425                      430

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

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

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

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

Val Arg Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala Arg
                500                      505                      510

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

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

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

```

Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile
565

<210> 5
<211> 568
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự axit amin của Con5Mut

<400> 5

Met Glu Lys Ile Val Leu Leu Leu Ala Ile Val Ser Leu Val Lys Ser
1 5 10 15

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

Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile
35 40 45

Leu Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys
50 55 60

Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn
65 70 75 80

Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val
85 90 95

Glu Lys Ala Asn Pro Ala Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asn Phe Asn
100 105 110

Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu
115 120 125

Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys Asn Ser Trp Ser Asp His Glu Ala Ser
130 135 140

Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Gln Gly Thr Pro Ser Phe Phe
145 150 155 160

Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Asn Thr Tyr Pro Thr Ile
165 170 175

Lys Arg Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Gln Glu Asp Leu Leu Val Leu Trp
180 185 190

Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Lys Leu Tyr Gln
 195 200 205
 Asn Pro Thr Thr Tyr Ile Ser Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg
 210 215 220
 Leu Val Pro Lys Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Asn Gly
 225 230 235 240
 Arg Met Asp Phe Phe Trp Thr Ile Leu Lys Pro Asn Asp Ala Ile Asn
 245 250 255
 Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile
 260 265 270
 Val Lys Lys Gly Asp Ser Ala Ile Met Lys Ser Glu Val Glu Tyr Gly
 275 280 285
 Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Ile Gly Ala Ile Asn Ser Ser
 290 295 300
 Met Pro Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys
 305 310 315 320
 Tyr Val Lys Ser Asn Lys Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Ser
 325 330 335
 Pro Gln Arg Glu Arg Arg Arg Arg Lys Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile
 340 345 350
 Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr
 355 360 365
 Gly Tyr His His Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys
 370 375 380
 Glu Ser Thr Gln Lys Ala Ile Asp Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser
 385 390 395 400
 Ile Ile Asp Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe
 405 410 415
 Asn Asn Leu Glu Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp
 420 425 430
 Gly Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met

435 440 445
 Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu
 450 455 460
 Tyr Asp Lys Val Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly
 465 470 475 480
 Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu
 485 490 495
 Ser Val Arg Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala
 500 505 510
 Arg Leu Lys Arg Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly
 515 520 525
 Thr Tyr Gln Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala
 530 535 540
 Leu Ala Ile Met Val Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met Cys Ser Asn Gly
 545 550 555 560
 Ser Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile
 565
 <210> 6
 <211> 241
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Trình tự axit amin từ vị trí 60 đến 300 của H5Con5Mut
 <400> 6
 Leu Asp Gly Val Lys Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val Ala Gly
 1 5 10 15
 Trp Leu Leu Gly Asn Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile Asn Val Pro Glu
 20 25 30
 Trp Ser Tyr Ile Val Glu Lys Ala Asn Pro Ala Asn Asp Leu Cys Tyr
 35 40 45
 Pro Gly Asn Phe Asn Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg
 50 55 60
 Ile Asn His Phe Glu Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys Asn Ser Trp Ser

Ala

```
<400>      7
atggaaaaaa tcgtgctgct cttggctatt gtcagtttgg ttaagtcgga ccagatctgc      60
attggatacc acgccaaaca ctctaccgaa caagtcgaca ctatcatgga gaagaacgtt      120
acagtgcacg acgctcagga tatcctggag aagaccata acggaaaact gtgtgacctc      180
```

gatggtgtga agcctttgat cctgctgtac tgctctgtgg ctggttggct gctgggaaac 240
 cctatgtgtg atgagttcat caacgtcccc gaatggtcctt acattgttga gaaggctaac 300
 ccagccaacg acctctgcta cccgggtaac ttcaacgatt acgaggaatt gaagcacttg 360
 ctgagtagga tcaaccatctt cgaaaagatc cagatcatcc caaagtccag ctggtccgac 420
 cacgaggctt cttcaggagt gagttcggcc tgtccgtacc agggcaagtc cagcttcttc 480
 cgtaacgtgg tctggctgat taagaaaaac aacgcctacc caacaatcaa gaggtcatac 540
 aacaacacga accaggaaga cctcttggtg ctgtggggta tccaccatcc aaacgatgct 600
 gccgagcaga ctgctctcta ccaaaacccg accacttaca tctccgtcgg caccagcact 660
 ttgaaccaga gactggttcc gaagatcgca acacgtcca aagtgaacgg tcaaagcggc 720
 aggatggact tcttctggac gatcctgaag cctaacgatg ctattaactt cgaatccaac 780
 ggaaacttca tcgcacccga gtacgcgtac aagattgtca agaaaggtga ctctgcaatc 840
 atgaaatcag agctggaata cggttaactgc aacacaaagt gtcaaacgcc catgggcgcg 900
 atcaactctt caatgccttt ccacaacatc catccctca caattggcga gtgccctaag 960
 tacgttaaaa gtaacagact cgtgttggct accggattgc gtaactcgcc ccagagggaa 1020
 cgccgtagga agaaacgcgg actgttcggt gctatcgccg gtttcattga ggggtggctgg 1080
 caaggcatgg tggacggctg gtacggatac caccatagta acgaacaggg atcgggttac 1140
 gcagcggaca aggagtctac caaaaagct atcgatggtg tgactaaca ggtcaactca 1200
 atcattgaca aaatgaacac tcagttcgag gccgtcggca gagaattcaa caacctcgag 1260
 agacgcatcg aaaacttgaa caagaaaatg gaagacggat tcctggatgt ctggacctac 1320
 aacgctgagc tgctcgttct gatggagaac gaacgcactc tcgacttcca cgattccaac 1380
 gtgaagaacc tctacgacaa agtcagactg caactccgag ataacgctaa ggaattgggc 1440
 aacggatgct tcgagttcta ccataagtgc gacaacgagt gtatggaatc cgtccgcaac 1500
 ggcacatacg attaccaca gtacagcgag gaagctcgtc tcaagaggga ggaaatttct 1560
 ggcgttaaat tggagtcaat cggaacatac caaatcctgt ccatttacag cacggttgca 1620
 agttcgttgg cactggcgat catggtggcg ggcctcagct tgtggatgtg ctctaacgga 1680
 tcactgcagt gccgcatctg tatttaa 1707

<210> 8

<211> 1707

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit nucleic đã được tối ưu hóa của H5Con3

<400> 8

```

atggaaaaga tcgtgctgct cttggcaatt gtctccttgg ttaagagcga ccagatctgc      60
attggatacc acgcgaacaa cagcacagaa caagtcgaca cgatcatgga gaagaacggt      120
acagtgacgc acgcacagga tatcctggag aaaacccata acggaaagct gtgtgacctc      180
gatggtgtga agcctttgat cctgcgcgac tgctctgtcg ctggttggct gctcggcaac      240
ccaatgtgtg atgagttcat caacgtcccg gaatggtcac acattgttga gaaggcaaac      300
cctgcgaacg acctctgcta ccccggtaac ttcaacgatt acgaggaatt gaagcacttg      360
ctgtctcgta tcaaccatth cgaaaagatc cagatcatcc caaagtccag ctggagtgc      420
cacgaggcat cgctgggagt gtcttcagcg tgccttacc aaggtaaccc cagtttcttc      480
aggaacgtgg tctggctcat taagaaaaac aacacatacc cgacgatcaa gaaatcctac      540
aacaacacta accaggaaga cctcttggtg ctgtggggta tccaccatcc taacgatgag      600
gctgaacaga caaagctcta ccaaaacccc accacttaca tctctgtcgg cacctcaact      660
ttgaaccaga gactggttcc caaaatcgct acacgcagta aggtgaacgg tcaatcgggc      720
cgtatggact tcttctggac gatcctgaag ccaaacgatg ccattaactt cgaatccaac      780
ggaaacttca tcgctccgga gtacgcctac aaaattgtca agaaaggtga ctccgctatc      840
atgaagagcg aggttgaata cggtaactgc aacaccaaat gtcaaaactcc aatcggcgcc      900
attaacagtt cgatgccatt ccacaacatc catccgctga caattggcga gtgccctaag      960
tacgttaaata ctaacaagct cgtgttggct accggattgc gtaactcacc ccagagggaa      1020
cgccgtagga agaaacgcgg actgttcggt gcaatcgcg gtttcattga ggggtggctgg      1080
caaggcatgg tggacggctg gtacggatgc caccattcta acgaacaggg atcagggttac      1140
gctgccgaca aagagtccac ccaaaaggca atcgatggtg tgactaaca agtcaacagc      1200
atcattgaca agatgaacac ccagttcgag gcggtcggca gagaattcaa caacctcgag      1260
agacgcatcg aaaacttgaa caagaaaatg gaagacggat tcctggatgt ctggacctac      1320
aacgctgagc tgctcgttct gatggagaac gaacgcactc tcgacttcca cgattcaaac      1380
gtgaaaaacc tctacgacaa ggtcagactg caactccgcg ataacgcaa ggaattgggc      1440
aacggatgct tcgagttcta ccataagtgc gacaacgagt gtatggaaag tgtgcgtaac      1500
ggcacttacg attaccccca gtactcggag gaagcccgtc tcaaaaggga ggaaatttcc      1560
ggcgtcaagt tggagagcat cggaacatac caaatcctgt ctatttactc aacggttgct      1620
tccagcttgg ctctggccat catggtggcc ggcctctcct tgtggatgtg cagtaacgga      1680
tcgctgcagt gcaggatctg tatttaa      1707

```

<210> 9
<211> 1707
<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit nucleic đã được tối ưu hóa của H5Con5

<400> 9

```

atggaaaaga tcgtgctgct cttggctatt gtctctcttg ttaaatcaga ccagatctgc      60
attggatacc acgccaacaa ctccacagaa caagtcgaca cgatcatgga gaagaacgtt      120
acagtgacgc acgtcagga tatcctcgag aaaaccata acggaaagct gtgtgacctc      180
gatggtgtga agcctttgat cctgagggac tgcagtgtcg ccggttggct gctcggcaac      240
ccaatgtgtg atgagttcat caacgtcccg gaatggtcct acattgttga gaaggctaac      300
cctgccaacg acctctgcta ccccggtaac ttcaacgatt acgaggaatt gaagcacttg      360
ctgtctagaa tcaaccatth cgaaaagatc cagatcatcc caaagtccag ctggtcagac      420
cacgaggctt cttcaggagt gagttcggcc tgtccttacc aaggtactcc cagcttcttc      480
aggaacgtgg tctggctgat taagaaaaac aacacatacc cgacgatcaa gagatcttac      540
aacaacacta accaggaaga cctcttgggtg ctgtggggta tccaccatcc taacgatgct      600
gccgagcaga caaagctcta ccaaaacccc accacttaca tcagtgtcgg cacctcgact      660
ttgaaccagc gcctgggtcc caaaatogca acacgtagta aggtgaacgg tcaatcgggc      720
aggatggact tcttctggac gatcctcaag ccaaacgatg ctattaactt cgaaagcaac      780
ggaaacttca tcgcaccgga gtacgcgtac aaaattgtca agaaaggtga ctccgcaatc      840
atgaagagcg aggttgaata cgttaactgc aacaccaaat gtcaaactcc aatcggcgcg      900
attaactcca gcatgccatt ccacaacatc catccgctga caattggcga gtgccctaag      960
tacgttaaata ctaacaagct cgtgttggcc accggattga ggaactcacc ccagagagaa     1020
cgccgtagga gaaagcgcg actgttcggt gctatcgccg gtttcattga gggtaggtgg     1080
caaggcatgg tggacggctg gtacggatac caccattcta acgaacagg atcagggttac     1140
gcagcggaca aagagtccac ccaaaaggct atcgatggtg tgactaaca agtcaacagc     1200
atcattgaca agatgaacac ccagttcgag gccgtcggcc gcgaattcaa caacctcgag     1260
cgccgtatcg aaaacttgaa caagaaaatg gaagacggat tcctggatgt ctggacctac     1320
aacgctgagc tgctcgttct gatggagaac gaacgtactc tcgacttcca cgattcaaac     1380
gtgaaaaacc tctacgacaa ggtccgcctg caactccgtg ataacgctaa ggaattgggc     1440
aacggatgct tcgagttcta ccataagtgc gacaacgagt gtatggaaag tgtgcgcaac     1500
ggcacttacg attaccccca gtactcggag gaagctaggt tgaaaagaga ggaaatttcc     1560
ggcgtcaagt tggagagcat cggaacatac caaatcctga gtatttactc gacggttgca     1620
tcttcattgg cactggcgat catggtggcg ggccctcctt tgtggatgtg ctccaacgga     1680

```

agcctgcagt gccgtatctg tatttaa

1707

<210> 10

<211> 1704

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit nucleic đã được tối ưu hóa của H5ConMut

<400> 10

atggaaaaga tcgtgctgct cttggctatt gtctctctgg ttaaatacaga ccagatctgc	60
attggatacc acgccaacaa ctccacagaa caagtcgaca cgatcatgga gaagaacgtt	120
acagtgcgc acgctcagga tatcctcgag aaaaccata acggaagct gtgtgacctc	180
gatgggtgtga agcctttgat cctgaggagc tgcagtgtcg ccggttggct gctcggaac	240
ccaatgtgtg atgagttcat caacgtcccga gaatgtcct acattgttga gaaggctaac	300
cctgccaacg acctctgcta ccccggaac ttcaacgatt acgaggaatt gaagcacttg	360
ctgtctagaa tcaaccattt cgaaaagatc cagatcatcc caaagaatag ctggctcagac	420
cacgaggctt cttcaggagt gagttcggcc tgtccttacc aaggactcc cagcttcttc	480
aggaacgtgg tctggctgat taagaaaaac aacacatacc cgacgatcaa gagatcttac	540
aacaacacta accaggaaga cctcttggtg ctgtggggta tccaccatcc taacgatgct	600
gccgagcaga caaagctcta caaaacccc accacttaca tcagtgtcgg caoctcgact	660
ttgaaccagc gcctggttcc caaaatcgca acacgtagta aggtgaacgg tcaaatggc	720
aggatggact tcttctggac gatcctcaag ccaaacgatg ctattaactt cgaaagcaac	780
ggaaacttca tcgcaccgga gtacgcgtac aaaattgtca agaaaggta ctccgcaatc	840
atgaagagcg aggttgaata cggtaactgc aacaccaa atgtcaaactcc aatcggcgcg	900
attaactcca gcatgccatt ccacaacatc catccgctga caattggcga gtgccctaag	960
tacgttaa at ctaacaagct cgtgttggcc accggattga ggaactcacc ccagagagaa	1020
cgccgtagga gaaagcgcg actgttcggt gctatcgccg gtttcattga ggggtgctgg	1080
caaggcatgg tggacggctg gtacggatac caccattcta acgaacagg atcagggttac	1140
gcagcggaca aagagtccac caaaaggct atcgatggtg tgactaaca agtcaacagc	1200
atcattgaca agatgaacac ccagttcgag gccgtcggcc gcgaattcaa caacctcgag	1260
cgccgtatcg aaaacttgaa caagaaaatg gaagacggat tcttgatgt ctggacctac	1320
aacgtgagc tgctcgttct gatggagaac gaacgtactc tcgacttcca cgattcaaac	1380
gtgaaaaacc tctacgacaa ggtccgcctg caactccgtg ataacgctaa ggaattgggc	1440
aacggatgct tcgagttcta ccataagtgc gacaacgagt gtatggaaag tgtgcgcaac	1500

ggcacttacg attacccccca gtactcggag gaagctaggt tgaaaagaga ggaaatttcc 1560
 ggcgtcaagt tggagagcat cggaacatac caaatcctga gtatttactc gacggttgca 1620
 tcttcattgg cactggcgat catggtggcg ggcctctcct tgtggatgtg ctccaacgga 1680
 agcctgcagt gccgtatctg tatt 1704

<210> 11
 <211> 723
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự axit nucleic đã được tối ưu hóa mã hóa trình tự axit amin
 từ vị trí 60 đến 300 của H5Con5Mut

<400> 11
 ctcgatggtg tgaagccttt gatcctgagg gactgcagtg tcgccggttg gctgctcggc 60
 aaccaatgt gtgatgagtt catcaacgtc ccggaatggt cctacattgt tgagaaggct 120
 aacctgccca acgacctctg ctaccccggt aacttcaacg attacgagga attgaagcac 180
 ttgtgttcta gaatcaacca ttctgaaaag atccagatca tcccaaagaa tagctggtca 240
 gaccacgagg cttcttcagg agtgagtctg gcctgtcctt accaaggtag tcccagcttc 300
 ttcaggaacg tggctctggct gattaagaaa aacaacacat acccgacgat caagagatct 360
 tacaacaaca ctaaccagga agacctcttg gtgctgtggg gtatccacca tctaacgat 420
 gctgccgagc agacaaagct ctacccaaaac ccaccactt acatcagtgt cggcacctcg 480
 actttgaacc agcgcttggt tcccaaaaatc gcaacacgta gtaagggtgaa cgggtcaaaat 540
 ggcaggatgg acttcttctg gacgatcctc aagccaaacg atgctattaa cttcgaaagc 600
 aacggaaaact tcatcgcacc ggagtacgag tacaaaattg tcaagaaagg tgactccgca 660
 atcatgaaga gcgaggttga atacggtaac tgcaacacca aatgtcaaac tccaatcggc 720
 gcg 723