



(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



1-0052278

(51)^{2020.01} **A61K 39/193**; C12N 7/01; C12N 15/86; (13) **B**
A61K 39/39; A61P 31/14

-
- | | |
|--|--------------------------------|
| (21) 1-2020-03184 | (22) 03/12/2018 |
| (86) PCT/EP2018/083297 03/12/2018 | (87) WO 2019/110481 13/06/2019 |
| (30) 62/594,342 04/12/2017 US; 62/607,101 18/12/2017 US | |
| (45) 27/10/2025 451 | (43) 25/09/2020 390A |
| (73) INTERVET INTERNATIONAL B.V. (NL)
Wim de Körverstraat 35, 5831 AN Boxtmeer, the Netherlands | |
| (72) MOGLER, Mark, A (US); STRAIT, Erin (US); SEGERS, Ruud, Philip, Antoon, Maria (NL). | |
| (74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.) | |
-

(54) VAXIN VÀ KIT BAO GỒM HẠT REPLICON VÀ TÁ CHẤT DẦU

(21) 1-2020-03184

(57) Sáng chế đề cập đến vaccin chủng ngừa tác nhân gây bệnh ở động vật sử dụng hạt replicon ARN của alphavirus và tá chất dầu. Sáng chế đề cập đến vaccin, và kit gồm các phần bao gồm hạt replicon và tá chất dầu. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp và ứng dụng điều chế vaccin và các thành phần của kit.

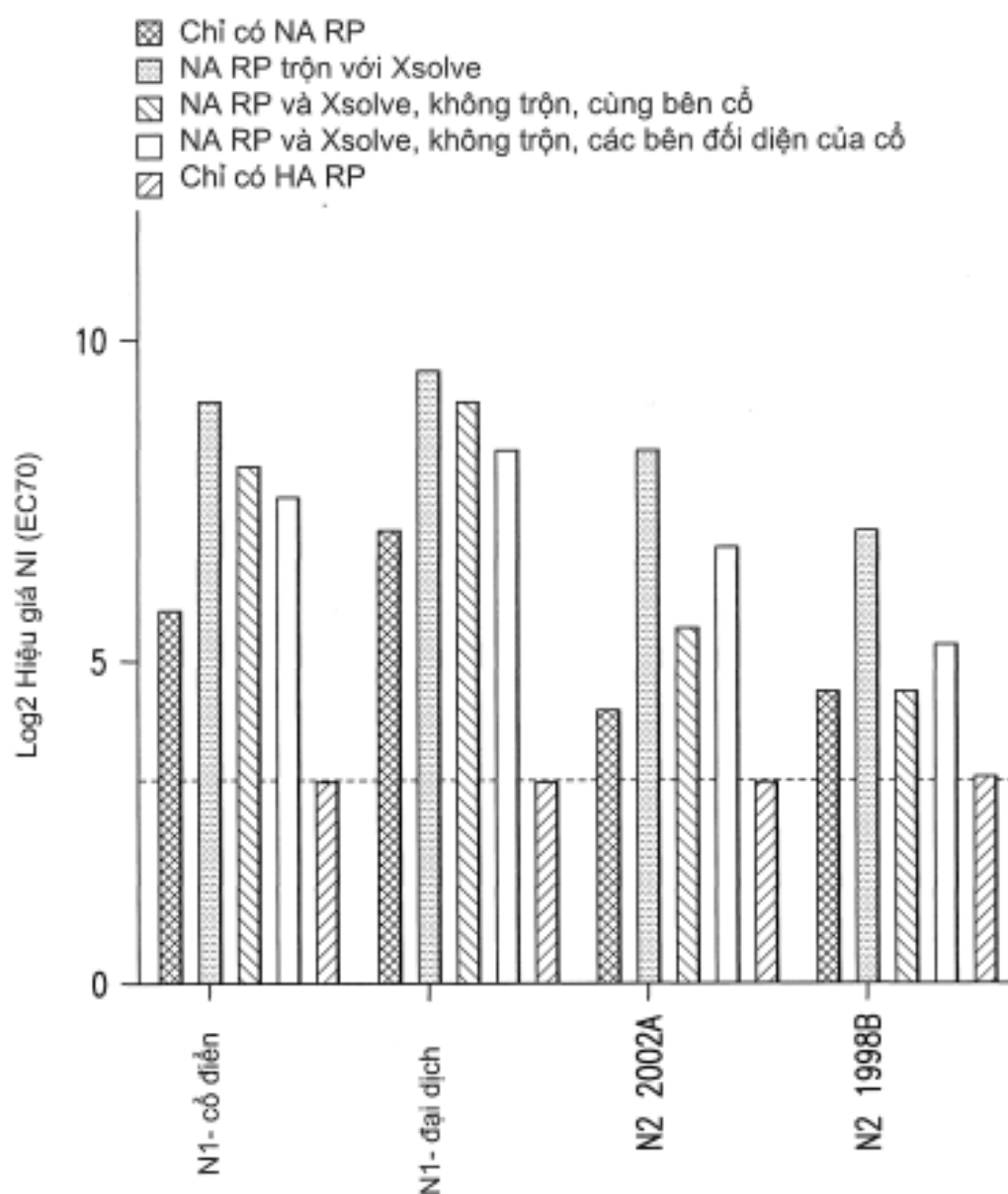


FIG.6

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến vaccin chủng ngừa tác nhân gây bệnh ở động vật sử dụng hạt replicon ARN của alphavirus và tá chất dầu. Sáng chế đề cập đến vaccin, và kit gồm các phần bao gồm hạt replicon và tá chất dầu. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp và ứng dụng điều chế vaccin và các thành phần của kit.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Nhiều chiến lược trên cơ sở vector đã được sử dụng qua nhiều năm đối với các vaccin nhằm ngăn ngừa tác nhân gây bệnh ở động vật. Một chiến lược vector như vậy bao gồm sử dụng hạt replicon ARN có nguồn gốc alphavirus (RP) [Vander Veen, et al. Anim Health Res Rev. 13(1): 1-9 (2012) doi: 10.1017/S1466252312000011; Kamrud et al., J Gen Virol. 91(Pt 7): 1723-1727 (2010)] mà đã được phát triển từ một vài alphavirus khác nhau, bao gồm Virus gây bệnh viêm não ngựa Venezuela (VEE) [Pushko et al., Virology 239: 389-401 (1997)], virus Sindbis [Bredenbeek et al., Journal của Virology 67: 6439-6446 (1993)], và virus Semliki Forest [Liljestrom and Garoff, Biotechnology (NY) 9: 1356- 361 (1991)]. Các kháng nguyên gây bệnh được mã hóa được biểu hiện bởi hạt replicon, sau khi nó gây nhiễm vào tế bào đích của người hoặc động vật. Kết quả là tạo ra các kháng thể bảo vệ chống lại kháng nguyên được biểu hiện. RP có profin an toàn và hiệu quả hấp dẫn khi so với một số chế phẩm vaccin thông thường [Vander Veen, et al., Anim Health Res Rev. 13(1): 1-9 (2012)]. Nền tảng RP là cơ sở cho một vài vaccin được USDA cấp phép, bao gồm: vaccin tiêu chảy cấp trên lợn, hạt ARN (Mã sản phẩm 19U5.P1), vaccin cúm lợn, ARN (Mã sản phẩm 19A5.D0), vaccin cúm chim, ARN (Mã sản phẩm 19O5.D0), và sản phẩm kê đơn, hạt ARN (Mã sản phẩm 9PP0.00).

Hạt replicon ARN có nguồn gốc alphavirus thiếu các gen mã hóa protein cấu trúc của alphavirus, nhưng duy trì các yếu tố sao chép cần cho việc tự khuếch đại ARN tế bào chất, và việc biểu hiện của các axit nucleic khác loại cài vào, được điều khiển bởi gen khởi đầu tiểu hệ gen hoạt tính cao 26S của alphavirus. Do đó, RP là hạt gây nhiễm vòng đơn, khuyết sao chép do vắng mặt các gen mã hóa protein cấu trúc. [Lundstrom, Vaccin 6: 2392-2415 (2014)]. Các protein cấu trúc cần cho việc đóng gói và tạo hạt replicon do đó phải được cung cấp *in trans* trong tế bào chủ thích hợp, để tạo ra RP [xem Vajdy et al., Immunol. và Cell Biol. 82: 617-627 (2004)]. Các protein cấu trúc thường

được cung cấp bởi quá trình đồng chuyển nhiễm tạm thời replicon ARN và một hoặc nhiều ARN ‘hỗ trợ’ mã hóa các protein cấu trúc. Theo cách khác, RP có thể được tạo ra từ các dòng tế bào đóng gói biểu hiện các protein cấu trúc của virus, về mặt cấu tạo hoặc tạm thời, từ một hoặc nhiều cassette biểu hiện ADN. Theo cách này, việc tạo ra hạt replicon bảo tồn tính khuyết sao chép của các vectơ này, do các protein cấu trúc không được bao gồm bên trong hệ gen RP thu được [Polo *et al.* *Dev. Biol.*, 104: 181–185 (2000)]. Các hạt replicon ARN của alphavirus khuyết sao chép này, khi được sử dụng để gây miễn dịch cho người hoặc động vật đích, tạo ra các đáp ứng miễn dịch bảo vệ *in vivo*. Các vectơ alphavirus trên cơ sở VEE, ví dụ, tạo ra các đáp ứng miễn dịch màng nhầy và toàn thân mạnh sau khi gây miễn dịch toàn thân cho chuột nhắt và các động vật lớn hơn [Davis *et al.*, *IUBMB Life* 53: 209-211 (2002)].

Tá chất là các hợp chất đã biết có khả năng tạo ra kích thích không đặc hiệu đối với hệ miễn dịch của người hoặc động vật đích. Sử dụng chuẩn đối với các tá chất là trong các vacxin trên cơ sở các kháng nguyên bất hoạt hoặc có cấu trúc dưới phân tử. Hiện có nhiều loại và chế phẩm tá chất, ví dụ: muối nhôm như Nhôm-hydroxit, hoặc Nhôm-phosphat, liposom, glucan, alginat, các thành phần vi khuẩn như thành phần thành tế bào, dầu khoáng hoặc dầu phi khoáng, tá chất tổng hợp như: polyme khối phi ion, polyamin như dextran sulphat, Carbopol™, pyran, và Saponin, như: Quil A™, hoặc Q-vac™. Saponin và các thành phần vacxin có thể được kết hợp trong ISCOM™.

Hơn thế nữa, peptit như muramyl dipeptit, dimethylglyxin, tuftsin, thường được sử dụng làm tá chất. Tương tự, các sản phẩm kết hợp như chế phẩm ISA™ (Seppic, France).

Sổ tay về tá chất và các ứng dụng và tác dụng của chúng là: “Vacxin adjuvants” (Methods in molecular medicine, vol. 42, D. O’Hagan ed., 2000, Humana press, NJ, ISBN: 0896037355).

Việc trích dẫn tài liệu tham khảo bất kỳ trong bản mô tả này cần được hiểu là việc đưa vào mà tài liệu tham khảo như vậy là khả dụng làm “tình trạng kỹ thuật” cho sáng chế.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất vacxin bao gồm hạt replicon ARN của alphavirus mã hóa kháng nguyên có nguồn gốc từ tác nhân gây bệnh ở động vật, trong đó vacxin còn bao gồm tá chất dầu.

Theo một phương án về vacxin theo sáng chế, tá chất dầu bao gồm ít nhất một dầu được chọn từ dầu khoáng và dầu phi khoáng.

Theo một phương án về vacxin theo sáng chế, tá chất dầu bao gồm dầu khoáng; tốt hơn nếu dầu khoáng là dầu parafin lỏng.

Theo một phương án về vacxin theo sáng chế, tá chất dầu bao gồm dầu phi khoáng; tốt hơn nếu dầu phi khoáng được chọn từ dầu tổng hợp, dầu bán tổng hợp, dầu động vật, và dầu thực vật. Tốt hơn nữa nếu dầu phi khoáng được chọn từ squalan, squalen, tocopherol và dầu thực vật. Theo một phương án tocopherol là alpha-tocopherol; tốt hơn nữa nếu alpha-tocopherol được chọn từ vitamin E và vitamin E-axetat. Theo một phương án dầu thực vật là oleat, tốt hơn nữa là etyl-oleat.

Tốt hơn nữa nếu dầu phi khoáng là squalan.

Theo phương án ưu tiên về vacxin theo sáng chế, tá chất dầu bao gồm nhiều hơn một dầu.

Theo một phương án về tá chất dầu bao gồm nhiều hơn một dầu, tá chất bao gồm dầu khoáng và một hoặc nhiều dầu phi khoáng. Tốt hơn nữa nếu tá chất dầu bao gồm dầu parafin lỏng như dầu khoáng, và một hoặc nhiều dầu phi khoáng được chọn từ squalan, squalen, vitamin E, vitamin E-axetat, oleat, và etyl-oleat. Tốt hơn nữa nếu tá chất dầu bao gồm dầu parafin lỏng và vitamin E-axetat. Tốt nhất nếu tá chất dầu là XSolve™.

Theo phương án khác về tá chất dầu bao gồm nhiều hơn một dầu, tá chất bao gồm nhiều hơn một dầu phi khoáng. Tốt hơn nếu tá chất dầu bao gồm nhiều hơn một dầu phi khoáng được chọn từ squalan, squalen, vitamin E, vitamin E-axetat, oleat, và etyl-oleat. Tốt hơn nữa nếu tá chất dầu bao gồm squalan và vitamin E-axetat. Tốt nhất nếu tá chất dầu là SVEA™.

Theo một phương án về vacxin theo sáng chế, lượng dầu khoáng trong tá chất dầu là 1 - 70% v/v (thể tích/thể tích) tá chất dầu. Tốt hơn nếu tá chất dầu bao gồm lượng dầu khoáng là 5 - 60% v/v tá chất dầu.

Theo một phương án về vacxin theo sáng chế, tổng lượng dầu phi khoáng là 0,1 - 30% w/v (trọng lượng/thể tích) tá chất dầu. Tốt hơn nếu tá chất dầu bao gồm tổng lượng dầu phi khoáng là 0,5 - 25% v/v tá chất dầu.

Theo một phương án, khi dầu phi khoáng bao gồm squalan, tá chất dầu bao gồm squalan ở 0,5 - 30% w/v tá chất dầu; tốt hơn nữa nếu tá chất dầu bao gồm squalan ở 1 - 25% w/v, ở 2 - 15% w/v, hoặc thậm chí bao gồm squalan ở 3 - 10% w/v tá chất dầu.

Theo cách khác hoặc ngoài ra, theo một phương án khi dầu phi khoáng bao gồm vitamin E axetat, tá chất dầu bao gồm vitamin E-axetat ở 0,1 - 30% w/v tá chất dầu; tốt hơn nữa nếu tá chất dầu bao gồm vitamin E-axetat ở 0,5 - 20% w/v, ở 1 - 16% w/v, hoặc thậm chí bao gồm vitamin E-axetat ở 2 - 10% w/v tá chất dầu.

Theo một phương án về vacxin theo sáng chế, tá chất dầu được điều chế dưới dạng nhũ tương gồm pha dầu và pha nước. Tốt hơn nếu tá chất dầu được điều chế dưới dạng nhũ tương dầu trong nước (O/W).

Theo một phương án, pha nước bao gồm nước có chất lượng được dụng.

Theo một phương án nhũ tương của tá chất dầu được điều chế dưới dạng vi nhũ tương, trong đó các giọt của pha bên trong là nhỏ hơn 1 micromet. Tốt hơn nếu vi nhũ tương là nhũ tương O/W, tốt hơn nữa nếu vi nhũ tương O/W được điều chế sử dụng phương pháp làm đồng nhất năng lượng cao, thậm chí tốt hơn nữa nếu được điều chế bằng phương pháp vi lỏng hóa.

Theo một phương án về vacxin theo sáng chế, nhũ tương của tá chất dầu bao gồm chất nhũ hóa, tốt hơn nếu chất nhũ hóa bao gồm Polysorbate, tốt hơn nữa nếu chất nhũ hóa bao gồm Polysorbate 80.

Theo một phương án, vacxin theo sáng chế bao gồm nhũ tương của tá chất dầu, tốt hơn nếu vacxin bao gồm tá chất dầu được điều chế dưới dạng nhũ tương O/W.

Theo một phương án về vacxin theo sáng chế, vacxin được điều chế dưới dạng nhũ tương dầu trong nước (O/W).

Theo một phương án về vacxin theo sáng chế, hạt replicon ARN của alphavirus là hạt replicon ARN của alphavirus gây bệnh viêm não ngựa Venezuela (VEE). Theo phương án cụ thể, hạt replicon ARN của alphavirus VEE là hạt replicon ARN của alphavirus VEE TC-83. Theo các phương án khác, hạt replicon ARN của alphavirus là hạt replicon ARN của alphavirus Sindbis. Theo các phương án khác nữa, hạt replicon ARN của alphavirus là hạt replicon ARN của alphavirus Semliki Forest.

Theo một phương án về vacxin theo sáng chế, đối với kháng nguyên được mã

hóa có nguồn gốc từ tác nhân gây bệnh ở động vật, tác nhân gây bệnh ở động vật được chọn từ virus, vi khuẩn, ký sinh trùng, động vật nguyên sinh, nấm, rận, và prion. Tốt hơn nữa nếu kháng nguyên được mã hóa có nguồn gốc từ tác nhân gây bệnh ở động vật là kháng nguyên có nguồn gốc từ virus hoặc vi khuẩn. Tốt nhất nếu kháng nguyên là từ virus.

Theo một phương án về vaccin theo sáng chế, RP mã hóa kháng nguyên có nguồn gốc từ tác nhân gây bệnh ở động vật, nhờ đó động vật là động vật thích hợp cho khoa học thú y. Tốt hơn nếu động vật được chọn từ cá, chim và động vật có vú. Tốt hơn nữa nếu động vật là động vật hoang dã, vật nuôi, hoặc động vật cưng. Vật nuôi là cá, chim, lợn, hoặc động vật nhai lại; tốt hơn nếu lợn là loài lợn; tốt hơn nếu chim là gà, gà tây, vịt, ngỗng, chim cút, hoặc đà điểu; tốt hơn nếu động vật nhai lại là bò, cừu, dê, trâu, lạc đà hoặc hươu; tốt hơn nếu cá là cá vây xương, tốt hơn nữa nếu cá hồi hoặc cá vây sừng nước ngọt (tức là, thành viên của họ Cichlidae). Cá hồi tốt hơn nếu được chọn từ cá hồi Atlantic, cá hồi đầu thép, cá hồi chinook, cá hồi coho, cá hồi gù, cá hồi chó, và cá hồi đỏ, cá hồi cầu vòng, cá hồi suối, cá hồi hồ, và cá hồi nâu, và cá hồi chấm hồng. Cá vây sừng nước ngọt tốt hơn nếu là cá rô phi. Động vật cưng tốt hơn nếu được chọn từ mèo, chó và ngựa. Tốt hơn nữa nếu động vật là cá rô phi, gà, hoặc lợn.

Theo một phương án về vaccin theo sáng chế, trình tự nucleotit của gen mã hóa kháng nguyên có nguồn gốc từ tác nhân gây bệnh ở động vật theo sáng chế được tối ưu hóa để biểu hiện trong tế bào của loài động vật đích dùng vaccin. Theo một phương án, tối ưu hóa trình tự nucleotit là tối ưu hóa codon. Theo một phương án, tối ưu hóa trình tự nucleotit là tối ưu hóa cấu trúc bậc hai của sản phẩm phiên mã ARN.

Theo phương án ưu tiên, việc tối ưu hóa trình tự nucleotit của gen mã hóa kháng nguyên có nguồn gốc từ tác nhân gây bệnh ở động vật theo sáng chế liên quan đến cả khả năng mã và cấu trúc bậc hai của sản phẩm phiên mã ARN. Tốt hơn nếu việc tối ưu hóa trình tự nucleotit được thực hiện theo các quy trình được mô tả trong một hoặc nhiều US 7,561,972, US 7,561,973, US 7,805,252, và US 8,126,653.

Theo phương án đặc biệt ưu tiên về vaccin theo sáng chế, tá chất dầu bao gồm dầu khoáng và dầu phi khoáng, vaccin được điều chế dưới dạng nhũ tương O/W, hạt replicon ARN của alphavirus là hạt replicon ARN của alphavirus VEE, kháng nguyên của tác nhân gây bệnh ở động vật là kháng nguyên của virus, và virus là tác nhân gây

bệnh ở lợn.

Theo phương án ưu tiên về vaccin theo sáng chế, kháng nguyên được mã hóa có nguồn gốc từ tác nhân gây bệnh ở động vật là protein hemagglutinin (HA) hoặc neuraminidaza (NA) của virus cúm, hoặc mảnh kháng nguyên của protein HA hoặc NA như vậy. Protein HA và/hoặc NA tốt hơn nếu có nguồn gốc từ virus cúm typ A, tốt hơn nữa nếu có nguồn gốc từ virus cúm lợn A hoặc từ PEDV.

Sáng chế cũng đề xuất vaccin đa giá bao gồm hạt replicon ARN của alphavirus theo sáng chế, trong đó vaccin bao gồm nhiều hơn một RP mã hóa kháng nguyên, hoặc vaccin bao gồm một hoặc nhiều RP mỗi hạt này mã hóa một hoặc nhiều hơn một kháng nguyên theo sáng chế.

Vaccin theo sáng chế bao gồm lượng hữu hiệu miễn dịch của hạt replicon ARN của alphavirus theo sáng chế. Theo một phương án vaccin bao gồm từ khoảng 1×10^3 đến khoảng 1×10^{11} RP. Theo các phương án cụ thể hơn, vaccin bao gồm từ khoảng 1×10^4 đến khoảng 1×10^{10} RP. Theo các phương án thậm chí cụ thể hơn, vaccin bao gồm từ khoảng 1×10^5 đến khoảng 1×10^9 RP.

Vaccin theo sáng chế bao gồm lượng hữu hiệu miễn dịch của tá chất dầu theo sáng chế. Theo một phương án, vaccin bao gồm tá chất dầu với lượng nằm trong khoảng 10% - 90% v/v vaccin. Tốt hơn nữa nếu vaccin bao gồm tá chất dầu với lượng nằm trong khoảng 20% - 80% v/v, 30 - 70% v/v, hoặc thậm chí 40 - 60% v/v vaccin. Tốt nhất nếu vaccin bao gồm tá chất dầu với lượng khoảng 50% v/v vaccin.

Theo các phương án cụ thể, vaccin theo sáng chế được dùng với liều thể tích trên mỗi động vật là 0,05 mL đến 5 mL. Theo các phương án cụ thể hơn, liều dùng trên mỗi động vật là 0,1 mL đến 2 mL. Theo các phương án cụ thể hơn nữa, liều dùng là 0,2 mL đến 1,5 mL. Theo các phương án thậm chí cụ thể hơn, liều dùng là 0,3 đến 1,0 mL. Theo các phương án cụ thể hơn nữa, liều dùng trên mỗi động vật là 0,4 mL đến 0,8 mL.

Theo một phương án về vaccin theo sáng chế, vaccin bao gồm tá chất khác. Tốt hơn nếu tá chất khác được chọn từ nhóm: thành phần thành tế bào vi khuẩn, cytokin (xytokin), và axit nucleic kích thích miễn dịch bao gồm CpG không được metyl hóa. Theo một phương án, axit nucleic kích thích miễn dịch là một hoặc nhiều được chọn từ WO 2012/089.800 (họ X4), WO 2012/160.183 (họ X43), và WO 2012/160.184 (họ X23).

Theo một phương án về vaccin theo sáng chế, vaccin bao gồm kháng nguyên khác của tác nhân gây bệnh ở động vật. Theo phương án ưu tiên, kháng nguyên khác được chọn từ nhóm: vi sinh vật giảm độc lực, vi sinh vật bất hoạt, và cấu trúc dưới phân tử của vi sinh vật.

Theo khía cạnh khác sáng chế đề xuất kit gồm các phần, kit bao gồm ít nhất hai vật chứa, nhờ đó ít nhất một vật chứa là bao gồm hạt replicon ARN của alphavirus mã hóa kháng nguyên có nguồn gốc từ tác nhân gây bệnh ở động vật, và ít nhất một vật chứa là bao gồm tá chất dầu. Ít nhất hai vật chứa với mỗi vật chứa bao gồm hạt replicon ARN của alphavirus, hoặc tá chất dầu, với các lượng hữu hiệu miễn dịch.

Theo các phương án ưu tiên về kit gồm các phần theo sáng chế, một hoặc nhiều hoặc tất cả: hạt replicon ARN của alphavirus, kháng nguyên được mã hóa, tác nhân gây bệnh ở động vật, và tá chất dầu, là như được xác định theo bất kỳ một hoặc nhiều phương án như được mô tả trong bản mô tả này.

Theo các phương án ưu tiên, ít nhất một vật chứa bao gồm RP là bao gồm RP dưới dạng thể đông khô.

Theo phương án khác, ít nhất một vật chứa bao gồm RP là bao gồm RP trong dung dịch nước; dung dịch nước tốt hơn nếu bao gồm dung dịch đậm; dung dịch nước là tốt hơn nếu được làm lạnh hoặc đông kết. Theo một phương án, dung dịch nước là dung dịch RP hoàn nguyên, được tạo ra từ việc trộn thể đông cô RP và chất pha loãng chứa nước thích hợp.

Theo phương án này trong đó ít nhất một vật chứa bao gồm RP dưới dạng thể đông khô, kit gồm các phần theo sáng chế có thể bao gồm vật chứa khác chứa chất pha loãng thích hợp cho việc hoàn nguyên RP đông khô. Theo phương án ưu tiên chất pha loãng là dung dịch nước, tốt hơn nếu bao gồm dung dịch đậm và/hoặc chất ổn định và nước có chất lượng được dụng.

Theo phương án ưu tiên, vật chứa bao gồm tá chất dầu là bao gồm tá chất dầu được điều chế dưới dạng nhũ tương gồm pha dầu và pha nước; tốt hơn nếu nhũ tương là nhũ tương dầu trong nước.

Theo một phương án về kit gồm các phần, kit bao gồm các hướng dẫn sử dụng kit và/hoặc các phần của nó. Theo các phương án ưu tiên, các hướng dẫn sử dụng được

bố trí trên hoặc với một hoặc nhiều phần của kit; hoặc được bố trí bằng cách chỉ dẫn đến các hướng dẫn ở dạng điện tử, như thông tin nhìn thấy được trên, hoặc có thể tải xuống từ trang web internet từ nhà sản xuất, hoặc nhà phân phối kit.

Theo một phương án kit gồm các phần là hộp bao gồm ít nhất hai vật chứa, và các hướng dẫn sử dụng được hiển thị trên vật mang thông tin (ví dụ, thẻ, hoặc tờ rời) bao gồm với hoặc bên trong hộp.

Theo một phương án về kit gồm các phần, kit cũng có thể là hàng bày bán các phần (liên quan đến giao dịch thương mại), ví dụ, trên trang web internet, để sử dụng trong phương pháp gây miễn dịch theo sáng chế.

Theo một phương án về kit gồm các phần, một hoặc nhiều vật chứa có thể bao gồm tá chất khác như được mô tả trong bản mô tả này; tương tự hoặc theo cách khác, một hoặc nhiều vật chứa có thể bao gồm kháng nguyên khác của tác nhân gây bệnh ở động vật như được mô tả trong bản mô tả này.

Replicon ARN của alphavirus mã hóa kháng nguyên có nguồn gốc từ tác nhân gây bệnh ở động vật, và tá chất dầu, cả hai là như được xác định trong bản mô tả này, có thể được dùng cho động vật đích. Việc dùng như vậy sẽ tạo ra sự bảo vệ miễn dịch hữu hiệu ở động vật nói trên đối với bệnh nhiễm trùng hoặc bệnh gây ra bởi tác nhân gây bệnh ở động vật. Việc dùng có thể được thực hiện, ví dụ, theo hướng dẫn của EMA - CVMP để sử dụng kết hợp các thuốc thú y miễn dịch.

Do đó, theo khía cạnh khác sáng chế đề xuất phương pháp gây miễn dịch động vật bao gồm cho động vật dùng lượng hữu hiệu miễn dịch của hạt replicon ARN của alphavirus mã hóa kháng nguyên có nguồn gốc từ tác nhân gây bệnh ở động vật, và của tá chất dầu.

Theo phương án ưu tiên về phương pháp gây miễn dịch cho động vật theo sáng chế, phương pháp bao gồm cho động vật dùng vaccin theo sáng chế.

Theo các phương án ưu tiên về phương pháp gây miễn dịch cho động vật theo sáng chế, một hoặc nhiều hoặc tất cả: hạt replicon ARN của alphavirus, kháng nguyên được mã hóa, tác nhân gây bệnh ở động vật, và tá chất dầu, là như được xác định theo bất kỳ một hoặc nhiều phương án như được mô tả trong bản mô tả này.

Theo các phương án ưu tiên về phương pháp gây miễn dịch cho động vật theo

sáng chế, kháng nguyên được mã hóa có nguồn gốc từ tác nhân gây bệnh ở động vật là kháng nguyên có nguồn gốc từ tác nhân gây bệnh từ cá, thành viên của họ Cichlidae, cá rô phi, động vật có vú, chim, và gà.

Theo một phương án về phương pháp gây miễn dịch cho động vật theo sáng chế, hạt replicon ARN của alphavirus và tá chất dầu được dùng trong hoặc trên cơ thể động vật đích một cách đồng thời hoặc cùng lúc.

Theo phương án ưu tiên về phương pháp gây miễn dịch cho động vật theo sáng chế, hạt replicon ARN của alphavirus và tá chất dầu được dùng trong hoặc trên cơ thể động vật đích một cách đồng thời, tức là, dưới dạng chế phẩm duy nhất.

Theo phương án ưu tiên, chế phẩm duy nhất là vaccin theo sáng chế.

Theo phương án ưu tiên, chế phẩm duy nhất được điều chế ngay trước khi cho động vật đích dùng bằng cách trộn chế phẩm bao gồm RP và chế phẩm bao gồm tá chất dầu, cả hai chế phẩm này là như được mô tả theo sáng chế; tốt hơn nữa nếu bằng cách trộn các thành phần của vật chứa của kit gồm các phần theo sáng chế; thậm chí tốt hơn nữa nếu bằng cách trộn dung dịch nước bao gồm RP và chế phẩm bao gồm nhũ tương O/W của tá chất dầu. Theo phương án thậm chí ưu tiên hơn khác, chế phẩm duy nhất được điều chế bằng cách hoàn nguyên thể đông cô RP với nhũ tương O/W của tá chất dầu, cả hai hợp phần này là như được xác định theo sáng chế. Hữu hiệu là, việc điều chế chế phẩm duy nhất tạo ra vaccin theo sáng chế.

Tốt hơn nữa “ngay trước khi cho động vật đích dùng” là trong vòng 24 giờ trước khi dùng cho động vật đích, tốt hơn nữa nếu trong vòng 16 giờ, trong vòng 12 giờ, trong vòng 8 giờ, trong vòng 4 giờ, hoặc thậm chí trong vòng 2 giờ trước khi dùng cho động vật đích, theo thứ tự ưu tiên này.

Theo phương án ưu tiên khác về phương pháp gây miễn dịch cho động vật theo sáng chế, hạt replicon ARN của alphavirus và tá chất dầu được dùng trong hoặc trên cơ thể động vật đích cùng lúc, tức là, dưới dạng bao gồm trong các chế phẩm riêng rẽ, mà được dùng cách nhau về vị trí và/hoặc về thời gian.

Theo phương án ưu tiên sử dụng cùng lúc bao gồm việc dùng trong hoặc trên cơ thể động vật đích, nhưng cách nhau về vị trí và/hoặc về thời gian, hạt replicon ARN của alphavirus và tá chất dầu dưới dạng bao gồm trong kit gồm các phần theo sáng chế.

Theo phương án ưu tiên về sử dụng cùng lúc sáng chế, các chế phẩm riêng rẽ được dùng đến các vị trí riêng rẽ trong hoặc trên cơ thể động vật đích, theo cùng đường dùng hoặc theo các đường dùng khác nhau, cách nhau trong thời lượng có hạn; tốt hơn nếu “thời lượng có hạn” là cách nhau trong vòng 2 tuần, tốt hơn nữa nếu cách nhau trong vòng 1 tuần, thậm chí tốt hơn nữa nếu cách nhau trong vòng 1 ngày, trong vòng 16 giờ, trong vòng 12 giờ, trong vòng 8 giờ, trong vòng 4 giờ, trong vòng 2 giờ, trong vòng 1 giờ, trong vòng 30 phút, hoặc thậm chí trong vòng 10 phút, theo thứ tự ưu tiên này. Tốt nhất nếu sử dụng cùng lúc là căn bản đồng thời.

Theo phương án ưu tiên về sử dụng cùng lúc sáng chế, các chế phẩm riêng rẽ được dùng cách nhau trong thời lượng có hạn, trong hoặc trên cơ thể động vật đích, theo cùng đường dùng hoặc theo các đường dùng khác nhau, tại các vị trí riêng rẽ. Theo sáng chế, cách vị trí dùng riêng rẽ được đặt cách nhau trên hoặc trong cơ thể động vật ít nhất 1 cm; tốt hơn nếu ít nhất 2 cm, ít nhất 5 cm, ít nhất 10 cm, hoặc thậm chí ít nhất 25 cm, theo thứ tự ưu tiên này.

Theo phương án ưu tiên về sử dụng cùng lúc sáng chế, các chế phẩm riêng rẽ được dùng cách nhau trong thời lượng có hạn, trong hoặc trên cơ thể động vật đích, theo cùng đường dùng hoặc theo các đường dùng khác nhau, căn bản tại cùng vị trí trong hoặc trên cơ thể động vật đích nhưng cách nhau thỏa đáng về thời gian để ngăn ngừa sự trộn lẫn các chế phẩm tại vị trí dùng. Theo sáng chế, cách nhau thỏa đáng về thời gian để ngăn ngừa sự trộn lẫn là không cách nhau trong vòng 2 giờ, tốt hơn nếu cách nhau trong vòng 6 giờ, cách nhau trong vòng 12 giờ, cách nhau trong vòng 1 ngày, cách nhau trong vòng 2 ngày, hoặc thậm chí cách nhau trong vòng một tuần, theo thứ tự ưu tiên này.

Theo một phương án về phương pháp gây miễn dịch cho động vật theo sáng chế, việc dùng trong hoặc trên cơ thể động vật đích, được thực hiện bằng cách dùng ngoài đường tiêu hóa. Theo phương án khác, việc dùng là qua đường màng nhầy. Theo phương án khác nữa, vacxin được dùng bằng phương pháp dùng tại chỗ.

Phương pháp dùng ưu tiên được chọn từ trong da, trong cơ, trong màng bụng, dưới da, nhúng và xịt. Phương pháp dùng trong da tốt hơn nếu bằng cách dùng không kim tiêm, tốt hơn nữa nếu bằng cách sử dụng thiết bị IDAL® (Intra-Dermal Application của Liquids).

Theo một phương án về việc dùng vaccin theo sáng chế, vaccin được dùng dưới dạng vaccin lần đầu và/hoặc dưới dạng vaccin tăng cường. Theo các phương án cụ thể, vaccin theo sáng chế được dùng dưới dạng chủng ngừa một lần (một lần dùng), mà không cần các lần dùng tăng cường tiếp theo. Theo một số phương án, trong trường hợp dùng cả vaccin lần đầu và vaccin tăng cường, vaccin lần đầu và vaccin tăng cường được dùng bằng đường giống nhau. Theo các phương án khác, trong trường hợp dùng cả vaccin lần đầu và vaccin tăng cường, việc dùng vaccin lần đầu được thực hiện bằng một đường và vaccin tăng cường bằng đường khác.

Theo một số phương án về việc dùng vaccin theo sáng chế, vaccin được dùng cho lợn và vaccin lần đầu và vaccin tăng cường đều được dùng bằng cách tiêm vào da. Theo phương án khác, vaccin lần đầu được dùng bằng cách tiêm vào da và vaccin tăng cường được dùng bằng đường khác.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất vaccin theo sáng chế, phương pháp bao gồm bước trộn hạt replicon ARN của alphavirus mã hóa kháng nguyên có nguồn gốc từ tác nhân gây bệnh ở động vật, và tá chất dầu. Cả hạt replicon ARN của alphavirus và tá chất dầu được trộn ở các lượng hữu hiệu miễn dịch.

Theo các phương án ưu tiên về phương pháp sản xuất vaccin theo sáng chế, một hoặc nhiều hoặc tất cả: vaccin, hạt replicon ARN của alphavirus, kháng nguyên được mã hóa, tác nhân gây bệnh ở động vật, và tá chất dầu, là như được xác định theo bất kỳ một hoặc nhiều phương án như được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một phương án về phương pháp sản xuất vaccin theo sáng chế hạt replicon ARN của alphavirus được bao gồm trong dung dịch nước.

Theo phương án ưu tiên về phương pháp sản xuất vaccin theo sáng chế, việc trộn được thực hiện sao cho hạt replicon ARN của alphavirus, theo thứ tự dung dịch nước bao gồm hạt replicon ARN của alphavirus, và tá chất dầu, được trộn theo tỷ lệ thể tích nằm trong khoảng từ 1:10 đến 10:1; tốt hơn nữa nếu theo tỷ lệ thể tích nằm trong khoảng từ 1:5 đến 5:1, nằm trong khoảng từ 1:4 đến 4:1, nằm trong khoảng từ 1:3 đến 3:1, hoặc thậm chí nằm trong khoảng từ 1:2 đến 2:1, theo thứ tự ưu tiên này. Tốt nhất nếu hạt replicon ARN của alphavirus, theo thứ tự dung dịch nước bao gồm hạt replicon ARN của alphavirus, và tá chất dầu được trộn theo tỷ lệ thể tích khoảng 1:1.

Theo một phương án phương pháp sản xuất vaccin theo sáng chế bao gồm việc

trộn các thành phần của vật chứa của kit gồm các phần theo sáng chế.

Theo một phương án về phương pháp sản xuất vaccin theo sáng chế, hạt replicon ARN của alphavirus, theo thứ tự dung dịch nước bao gồm hạt replicon, được trộn với tá chất dầu như được xác định theo sáng chế mà được bao gồm trong nhũ tương O/W khác bao gồm kháng nguyên của tác nhân gây bệnh. Tốt hơn nếu nhũ tương O/W khác là vaccin bao gồm tác nhân gây bệnh là virus và/hoặc vi khuẩn bất hoạt. Theo phương án ưu tiên khác, RP mã hóa kháng nguyên từ SIV hoặc từ PEDV được trộn với vaccin nhũ tương O/W bao gồm circovirus ở lợn (PCV) và/hoặc *Mycoplasma hyopneumoniae*, như Circumvent® PCVM.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hạt replicon ARN của alphavirus mã hóa kháng nguyên có nguồn gốc từ tác nhân gây bệnh ở động vật, để dùng trong việc bảo vệ động vật khỏi bị nhiễm trùng hoặc bệnh gây ra bởi tác nhân gây bệnh ở động vật, trong đó hạt replicon ARN của alphavirus được dùng trong hoặc trên cơ thể động vật đích có sử dụng đồng thời hoặc cùng lúc với tá chất dầu. Cả hạt replicon ARN của alphavirus và tá chất dầu được bao gồm để sử dụng trong việc bảo vệ động vật, ở các lượng hữu hiệu miễn dịch.

Theo các phương án ưu tiên về replicon ARN của alphavirus để dùng trong việc bảo vệ theo sáng chế, một hoặc nhiều hoặc tất cả: hạt replicon ARN của alphavirus, kháng nguyên được mã hóa, tác nhân gây bệnh ở động vật, và tá chất dầu, là như được xác định theo bất kỳ một hoặc nhiều phương án như được mô tả trong bản mô tả này.

Theo phương án ưu tiên về replicon ARN của alphavirus để dùng trong việc bảo vệ theo sáng chế, sử dụng bao gồm sử dụng vaccin theo sáng chế.

Theo một phương án về replicon ARN của alphavirus để dùng trong việc bảo vệ theo sáng chế, việc bảo vệ là hữu hiệu ở động vật đích có tuổi và loại khác nhau.

Theo một phương án, sử dụng là để bảo vệ động vật con. Tốt hơn nếu động vật con là lợn lên đến 3 tuần tuổi, hoặc gà lên đến 1 tuần tuổi, hoặc cá hồi lên đến 14 tháng tuổi.

Theo phương án khác, sử dụng là để bảo vệ động vật chưa trưởng thành. Tốt hơn nếu động vật chưa trưởng thành là lợn từ 3 tuần đến 8 tháng tuổi, hoặc gà từ 1 đến 22 tuần tuổi, hoặc là cá hồi từ 14 đến 24 tháng tuổi.

Theo phương án khác, sử dụng là để bảo vệ động vật trưởng thành. Tốt hơn nếu động vật trưởng thành là lợn trên 8 tháng tuổi, hoặc gà trên 22 tuần tuổi, hoặc là cá hồi trên 24 tháng tuổi.

Đối với cá rô phi, các giai đoạn ưu tiên để sử dụng để bảo vệ theo sáng chế thường được thể hiện không theo tuổi, mà bằng cách chỉ ra phạm vi toàn bộ thể trọng: chủng ngừa bằng xử lý bể nhúng tốt hơn nếu được thực hiện khi trọng lượng cá rô phi nằm trong khoảng từ 0,5 g đến 5 g. Chủng ngừa bằng cách tiêm ngoài đường tiêu hóa tốt hơn nếu được thực hiện khi trọng lượng cá rô phi nằm trong khoảng từ 10 g đến 100 g; tốt hơn nữa nếu khi trọng lượng cá rô phi nằm trong khoảng từ 20 g đến 25 g.

Theo một phương án về replicon ARN của alphavirus để dùng trong việc bảo vệ theo sáng chế, động vật đích có thể là dương tính huyết thanh hoặc âm tính huyết thanh, đối với kháng thể kháng tác nhân gây bệnh ở động vật, hoặc đối với tác nhân gây bệnh ở động vật, theo thứ tự đối với kháng nguyên từ tác nhân gây bệnh ở động vật.

Theo một phương án về replicon ARN của alphavirus để dùng trong việc bảo vệ theo sáng chế, động vật đích là động vật dương tính với MDA (kháng thể có nguồn gốc từ mẹ), nhờ đó MDA phản ứng với tác nhân gây bệnh ở động vật mà việc bảo vệ được dự tính chống lại. Tốt hơn nữa nếu động vật dương tính với MDA là chim, động vật nhai lại hoặc lợn. Tốt hơn nữa nếu động vật dương tính với MDA là lợn.

Theo một phương án về replicon ARN của alphavirus để dùng trong việc bảo vệ theo sáng chế, động vật đích là động vật mang thai. Tốt hơn nữa nếu động vật mang thai là động vật nhai lại hoặc lợn. Tốt hơn nữa nếu động vật mang thai là lợn.

Theo một phương án về replicon ARN của alphavirus để dùng trong việc bảo vệ theo sáng chế, việc bảo vệ là cho động vật sản xuất. Tốt hơn nếu động vật sản xuất là lợn được nuôi để vỗ béo, hoặc là gà giò hoặc gà đẻ trứng, hoặc là các động vật nhai lại được nuôi để sản xuất sữa hoặc thịt, hoặc là cá hồi, hoặc là cá rô phi.

Theo phương án khác việc bảo vệ là cho động vật dùng để tái đàn. Tốt hơn nếu động vật dùng để tái đàn là các dòng bố mẹ hoặc ông bà của động vật sản xuất.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất sử dụng hạt replicon ARN của alphavirus mã hóa kháng nguyên có nguồn gốc từ tác nhân gây bệnh ở động vật, để sản xuất vacxin để bảo vệ động vật khỏi bị nhiễm trùng hoặc bệnh gây ra bởi tác nhân gây bệnh ở động

vật, bao gồm sử dụng đồng thời hoặc sử dụng cùng lúc hạt replicon ARN của alphavirus nói trên với tá chất dầu. Cả hạt replicon ARN của alphavirus và tá chất dầu được sử dụng ở các lượng hữu hiệu miễn dịch.

Theo các phương án ưu tiên về sử dụng để sản xuất vacxin theo sáng chế, một hoặc nhiều hoặc tất cả: hạt replicon ARN của alphavirus, kháng nguyên được mã hóa, tác nhân gây bệnh ở động vật, và tá chất dầu, là như được xác định theo bất kỳ một hoặc nhiều phương án như được mô tả trong bản mô tả này.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất sử dụng hạt replicon ARN của alphavirus mã hóa kháng nguyên có nguồn gốc từ tác nhân gây bệnh ở động vật, để sản xuất thành phần của kit gồm các phần như được xác định theo sáng chế, nhờ đó kit là để bảo vệ động vật khỏi bị nhiễm trùng hoặc bệnh gây ra bởi tác nhân gây bệnh ở động vật, bằng cách sử dụng đồng thời hoặc sử dụng cùng lúc các thành phần của kit nói trên. Cả hạt replicon ARN của alphavirus và tá chất dầu được sử dụng ở các lượng hữu hiệu miễn dịch.

Theo các phương án ưu tiên về sử dụng để sản xuất thành phần của kit gồm các phần theo sáng chế, một hoặc nhiều hoặc tất cả: hạt replicon ARN của alphavirus, kháng nguyên được mã hóa, tác nhân gây bệnh ở động vật, tá chất dầu, và kit gồm các phần, là như được xác định theo bất kỳ một hoặc nhiều phương án như được mô tả trong bản mô tả này.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất sử dụng hạt replicon ARN của alphavirus mã hóa kháng nguyên có nguồn gốc từ tác nhân gây bệnh ở động vật, để bảo vệ động vật khỏi bị nhiễm trùng hoặc bệnh gây ra bởi tác nhân gây bệnh ở động vật, trong đó sử dụng bao gồm sử dụng đồng thời hoặc sử dụng cùng lúc hạt replicon ARN của alphavirus nói trên với tá chất dầu. Cả hạt replicon ARN của alphavirus và tá chất dầu được sử dụng ở các lượng hữu hiệu miễn dịch.

Theo các phương án ưu tiên về sử dụng để bảo vệ động vật theo sáng chế, một hoặc nhiều hoặc tất cả: hạt replicon ARN của alphavirus, kháng nguyên được mã hóa, tác nhân gây bệnh ở động vật, và tá chất dầu, là như được xác định theo bất kỳ một hoặc nhiều phương án như được mô tả trong bản mô tả này.

Các khía cạnh này và các khía cạnh khác theo sáng chế sẽ được hiểu rõ hơn bằng cách tham chiếu đến phần mô tả vắn tắt các hình vẽ và mô tả chi tiết sáng chế.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 và 2: Kết quả từ ví dụ 2:

Fig. 1A-1B: Tổn thương phổi

Fig. 1C-1D: Bài tiết (giải phóng) qua mũi

Fig. 1E-1F: Hiệu giá NI

Fig. 2A-2F: Kết quả hiệu giá HI (các hình vẽ được đánh số từ trái sang phải, từ trên xuống dưới)

Fig. 3: Các đáp ứng kháng thể trong huyết thanh với kháng nguyên lớp N1 ở lợn được chủng ngừa bằng NA-RP đa giá của ví dụ 3:

Được thể hiện là các đáp ứng kháng thể ức chế neuraminidaza (NI) trong huyết thanh đặc hiệu với chủng lớp N1 của các chế phẩm vacxin như được mô tả trong Ví dụ 3. Các mẫu huyết thanh được lấy trước khi chủng ngừa lần đầu (3 tuần tuổi), trước khi chủng ngừa lần hai (7 tuần tuổi), và trước khi thử thách (10 tuần tuổi).

Fig. 4: Hiệu quả của vacxin 4 thành phần NA-RP phòng ngừa bệnh nhiễm thử thách, như được thử nghiệm trong ví dụ 3, liên quan đến điểm số tổn thương phổi vĩ mô ở 5 ngày sau gây nhiễm virus H1N1:

Fig này thể hiện điểm số tổn thương phổi của lợn sau khi dùng các chế phẩm chủng ngừa được mô tả trong Ví dụ 3 và gây nhiễm thử thách bằng virus lớp H1-gama-N1.

Fig. 5 và 6: Kết quả hiệu giá NI từ ví dụ 8:

Fig. 5 thể hiện hiệu giá NI đối với kháng nguyên NA lớp N1 tại ba thời điểm được đo theo thời gian, bao gồm độ lệch chuẩn. Điều này tiêu biểu cho profin hiệu giá NI đo được đối với ba typ NA còn lại.

Fig. 6 thể hiện hiệu giá NI trung bình nhóm của 4 typ NA kết hợp, ở 7 ngày sau chủng ngừa lần hai.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất vacxin bao gồm lượng hữu hiệu miễn dịch của một hoặc nhiều hạt replicon ARN của alphavirus mã hóa một hoặc nhiều kháng nguyên của tác nhân gây bệnh ở động vật, và tá chất dầu. Hạt replicon ARN của alphavirus rất giống với virus

sống ở chỗ chúng có thể nhiễm vào tế bào chủ của người hoặc động vật đích và biểu hiện các gen mà chúng chứa. Điều này cũng được chứng minh bằng thực tế rằng RP thường được định lượng bằng cách chuẩn độ khả năng lây nhiễm trên tế bào. Do đó, các RP như vậy, trong chất mang được dụng, thường là thành phần duy nhất của vacxin hữu hiệu, giống với vacxin virut sống (giảm độc lực). Một vài vacxin trên cơ sở RP không tá chất đã được phát triển và thương mại hóa.

Tá chất chủ yếu chỉ được sử dụng kết hợp với các kháng nguyên vacxin chết hoặc cấu trúc dưới phân tử. Tương tự, tá chất dầu có thể khá nhạy cảm với các thành phần vacxin khác, do đó tá chất dầu thường không được kết hợp với vacxin sống. Ngoài ra, vacxin chứa RP ARN của alphavirut, nhất là vacxin trên cơ sở alphavirut VEE, được biết là đã tự tạo ra -tiếp đến là đáp ứng miễn dịch thu được- đáp ứng kháng virut mạnh từ hệ miễn dịch bẩm sinh đích. Theo đó ngăn ngừa hữu hiệu nhu cầu bất kỳ về việc kích thích miễn dịch bổ sung.

Tuy nhiên, ngạc nhiên phát hiện ra rằng tá chất dầu có thể tăng cường đáng kể hiệu quả sinh miễn dịch của hạt replicon ARN của alphavirut mã hóa kháng nguyên có nguồn gốc từ tác nhân gây bệnh ở động vật. Điều này ngược với tá chất trên cơ sở nhôm, như nhôm hydroxit. Hiệu quả tăng cường này có thể thu được cả khi RP và tá chất dầu được sử dụng khi kết hợp vào chế phẩm duy nhất (*tức là*, dùng đồng thời cùng nhau), hoặc khi chúng được dùng dưới dạng các chế phẩm riêng rẽ (*tức là*, sử dụng cùng lúc). Phạm vi tăng cường hiệu quả của tá chất dầu cũng không được mong đợi, do liều tác dụng tối thiểu của RP có thể được làm giảm đến vài bậc độ lớn, đối với chủng ngừa bằng RP và tá chất dầu, so với chủng ngừa mà không có tá chất (dầu). Sử dụng khác của tá chất dầu có thể làm tăng thời gian đáp ứng miễn dịch từ chủng ngừa RP. Tương tự, kết hợp của tá chất dầu và RP có khả năng tạo đáp ứng miễn dịch vượt trội khi thành phần RP đơn độc không hề gây miễn dịch.

Để hiểu sáng chế đầy đủ hơn, các định nghĩa sau được đưa ra.

“Vacxin” là chế phẩm đã biết rõ có tác dụng y học, bao gồm hoạt chất miễn dịch, và chất mang được dụng. Dung dịch nước và/hoặc tá chất dầu có thể đóng vai trò ‘chất mang’ đối với vacxin. ‘Hoạt chất miễn dịch’ đối với vacxin theo sáng chế là kháng nguyên được mã hóa có nguồn gốc từ tác nhân gây bệnh ở động vật, mà được phân phối và biểu hiện nhờ RP. Vacxin kích thích miễn dịch của động vật đích được chủng ngừa,

tạo ra đáp ứng miễn dịch bảo vệ. Đáp ứng có thể có nguồn gốc từ hệ miễn dịch bẩm sinh và/hoặc từ hệ miễn dịch thu được của động vật, và có thể là thuộc loại tế bào và/hoặc thể dịch.

Vaccin tạo ra “sự bảo vệ” “chống lại bệnh nhiễm trùng hoặc bệnh” bằng cách làm giảm mức độ nghiêm trọng của bệnh nhiễm hoặc bệnh nhiễm trùng tiếp theo ở động vật được chủng ngừa, ví dụ, bằng cách làm giảm số lượng tác nhân gây bệnh, hoặc rút ngắn thời gian tác nhân gây bệnh sao chép trong hoặc trên động vật, và làm giảm số lượng, cường độ, hoặc mức độ nghiêm trọng của tổn thương gây ra bởi bệnh nhiễm hoặc bệnh nhiễm trùng. Tương tự, hoặc kết quả là, vaccin là hữu hiệu trong việc làm giảm hoặc cải thiện các triệu chứng (lâm sàng) bệnh mà có thể là gây ra bởi bệnh nhiễm, bệnh nhiễm trùng hoặc sao chép như vậy, hoặc bởi đáp ứng của vật chủ đích với bệnh nhiễm, bệnh nhiễm trùng hoặc sao chép đó. Tài liệu tham khảo về các bệnh và dấu hiệu lâm sàng là: “The Merck veterinary manual” (10th ed., 2010, C.M. Kahn ed., ISBN: 091191093X). Vaccin như vậy thường được gọi là: vaccin ‘chống lại’ tác nhân gây bệnh cụ thể.

Thuật ngữ “bao gồm” (cũng như các biến thể như “bao hàm”, “gồm có”, và “gồm”) như được sử dụng trong bản mô tả này, chỉ tất cả các phần tử, và ở dạng kết hợp thích hợp bất kỳ có thể tưởng tượng được theo sáng chế, mà được bao quát bởi hoặc được bao gồm trong phần văn bản, đoạn, yêu cầu bảo hộ, v.v., trong đó thuật ngữ này được sử dụng, thậm chí nếu các phần tử hoặc dạng kết hợp như vậy không được chỉ rõ; và không chỉ ngoại lệ của bất kỳ các phần tử hoặc dạng kết hợp như vậy. Do đó, bất kỳ phần văn bản, đoạn, yêu cầu bảo hộ, v.v., có thể cũng đề cập đến một hoặc nhiều phương án trong đó thuật ngữ “bao gồm” (hoặc các biến thể của nó) được thay bằng các thuật ngữ như “bao gồm”, “gồm có”, hoặc “căn bản gồm”.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “replicon” chỉ hệ gen virut ARN cải biến thiếu một hoặc nhiều phần tử (ví dụ, trình tự mã hóa protein cấu trúc) mà nếu chúng có mặt, có thể cho phép nhân thành công virut gốc trong nuôi cấy tế bào hoặc trên cơ sở động vật. Trong trường hợp tế bào thích hợp, replicon sẽ tự khuếch đại và có thể tạo ra một hoặc nhiều loại ARN tiểu hệ gen.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “hạt replicon ARN của alphavirus”, viết tắt là “RP”, là replicon ARN có nguồn gốc alphavirus được đóng gói

trong các protein cấu trúc của virus, ví dụ, capsit và glycoprotein, mà cũng có nguồn gốc từ alphavirus, ví dụ, như được mô tả bởi Pushko và các đồng tác giả, [*Virology* 239(2): 389-401(1997)]. RP nhiễm vào tế bào đích thích hợp, và tiếp theo biểu hiện (các) gen khác loại cài vào, nhưng không thể nhân lên trong môi trường nuôi cấy tế bào hoặc động vật chủ (mà không có plasmit hỗ trợ hoặc thành phần tương tự), do replicon không mã hóa các thành phần cấu trúc của alphavirus (ví dụ, capsit và glycoprotein của virus).

Sử dụng các thuật ngữ số ít để thuận tiện cho việc mô tả là không được dự tính giới hạn ở đó. Do đó, ví dụ, đề cập đến “hạt replicon ARN của alphavirus” bao gồm đề cập đến nhiều hạt replicon ARN của alphavirus như vậy, trừ khi có quy định khác.

RP “mã hóa” kháng nguyên chỉ sự phiên mã và/hoặc dịch mã axit nucleic mà kháng nguyên protein được bao gồm trong RP, dẫn đến kháng nguyên protein này được biểu hiện. Thông thường, axit nucleic như vậy mã hóa protein là khung đọc mở (ORF), chỉ ra rằng không có codon kết thúc không mong muốn có mặt mà có thể kết thúc sớm sự dịch mã thành protein. Axit nucleic này có thể là gen đầy đủ mã hóa protein hoàn thiện, hoặc có thể là mảnh gen, mã hóa một phần của protein, ví dụ, chỉ mã hóa dạng trưởng thành hoặc dạng tiết của protein, tức là, không có ‘trình tự dẫn, ‘trình tự neo, hoặc ‘trình tự tín hiệu’. Trình tự nucleotit này có thể là có nguồn gốc tự nhiên hoặc tổng hợp.

Cấu trúc và thao tác trình tự axit nucleic khác loại biểu hiện kháng nguyên theo sáng chế có thể được thực hiện bằng các kỹ thuật sinh học phân tử đã biết rõ, bao gồm tách dòng, chuyển nhiễm, tái tổ hợp, chọn lọc, và khuếch đại. Các kỹ thuật, và các kỹ thuật khác được giải thích chi tiết trong sách giáo khoa chuẩn như Sambrook & Russell: “Molecular cloning: a laboratory manual” (2001, Cold Spring Harbour Laboratory Press; ISBN: 0879695773); Ausubel et al., in: Current Protocols in Molecular Biology (J. Wiley and Sons Inc., NY, 2003, ISBN: 047150338X); C. Dieffenbach & G. Dveksler: “PCR primers: a laboratory manual” (CSHL Press, ISBN 0879696540); và “PCR protocols”, bởi: J. Bartlett and D. Stirling (Humana press, ISBN: 0896036421).

Theo sáng chế, “protein” là chuỗi phân tử axit amin. Protein có thể là protein tự nhiên hoặc protein trưởng thành, pre-protein hoặc pro-protein, hoặc một phần của protein. Ví dụ: peptit, oligopeptit và polypeptit được bao gồm trong định nghĩa về protein.

“Kháng nguyên” theo sáng chế chỉ protein có thể -trong các trường hợp thích hợp- tạo ra đáp ứng miễn dịch bảo vệ ở động vật đích.

Các thuật ngữ “được tạo ra từ”, “có nguồn gốc từ” và “có nguồn gốc” được sử dụng thay thế cho nhau liên quan đến kháng nguyên protein nhất định và tác nhân gây bệnh hoặc chủng tác nhân gây bệnh đó mà mã hóa nó một cách tự nhiên. Như được sử dụng trong bản mô tả này, các thuật ngữ này chỉ ra rằng trình tự axit amin không được cải biến và/hoặc được cải biến của kháng nguyên protein nhất định được mã hóa bởi tác nhân gây bệnh đó hoặc chủng tác nhân gây bệnh đó. Trình tự mã hóa bên trong cấu trúc axit nucleic theo sáng chế đối với kháng nguyên protein có nguồn gốc từ tác nhân gây bệnh, có thể đã được thao tác di truyền để tạo cải biến, cắt đứt, và/hoặc kéo dài trình tự axit amin của kháng nguyên protein được biểu hiện so với trình tự mã hóa tương ứng của kháng nguyên protein đó trong tác nhân gây bệnh hoặc chủng tác nhân gây bệnh (bao gồm các chủng giảm độc lực tự nhiên) mà nó có nguồn gốc từ đó.

“Tác nhân gây bệnh ở động vật” chỉ thực thể sinh học bất kỳ có khả năng gây bệnh nhiễm và/hoặc bệnh ở động vật thú y, như ở động vật hoang dã, vật nuôi, hoặc động vật cưng.

Theo sáng chế, tác nhân gây bệnh ở động vật có thể hoặc không là tác nhân gây bệnh tự nhiên của động vật đích mà sẽ tiếp nhận vaccin theo sáng chế.

“Dầu” được sử dụng trong bản mô tả này theo nghĩa chung của nó và chỉ hóa chất không phân cực có hàm lượng hydro-cacbon tương đối cao mà thường là chất lỏng tương đối nhớt, có tỷ trọng thấp hơn nước, và là kỵ nước và ưa lipid. Dầu có thể có nguồn gốc khoáng, hoặc “khi khoáng” như có nguồn gốc tổng hợp, bán tổng hợp, động vật hoặc thực vật. Một số dầu có thể chuyển hóa.

Thuật ngữ “khoáng” chỉ ra rằng dầu tương ứng có nguồn gốc từ nguồn khoáng, thường từ dầu mỏ.

“Dầu bán tổng hợp” là dầu có nguồn gốc phi khoáng như dầu động vật hoặc dầu thực vật, nhưng được cải biến cấu trúc và/hoặc thành phần bằng quy trình hóa học hoặc vật lý.

Thuật ngữ “tá chất” được sử dụng trong bản mô tả này theo nghĩa chung của nó về thành phần có khả năng kích thích đáp ứng miễn dịch ở động vật đích một cách không

đặc hiệu.

“Dầu parafin lỏng”, là loại dầu khoáng, còn gọi là dầu trắng (khoáng), hoặc dầu parafin lỏng nhẹ, và có số CAS: 8042-47-5. Nó thường khả dụng, cũng ở dạng được dụng. Ví dụ là: Drakeol® 6VR (Penreco), Marcol® 52 (Exxon Mobile), và Klearol® (Sonneborn).

“Vitamin E-axetat” chỉ hóa chất có số CAS: 58-95-7. Một số tên khác là: tocopheryl axetat, hoặc alpha-tocopherol-axetat. Vitamin E-axetat là axetat-este của vitamin E (tocopherol), và có thể được tạo ra từ vật liệu thực vật như hạt, quả hạch, quả hoặc lá, hoặc từ thịt béo, nhưng có thể cũng được tạo ra bằng con đường tổng hợp. Do đó, được bao gồm trong định nghĩa về vitamin E-axetat là các dạng tự nhiên, tổng hợp hoặc bán tổng hợp, hoặc hỗn hợp của chúng. Vitamin E-axetat là có bán trên thị trường, ở độ tinh khiết khác nhau.

“Squalan” chỉ hóa chất có số CAS 111-01-3. Một số tên khác là: dầu gan cá mập đã hydro hóa, hexametyltetracosan, hoặc perhydrosqualen. Loại này không được nhầm với squalen (số CAS 111-02-4) là dầu C30 đa bất bão hòa và có thể chuyển hóa được dưới dạng hợp chất của con đường cholesterol.

Ban đầu, tiền chất đối với squalan được thu từ gan cá mập, nhưng do vấn đề môi trường, nó được chuyển sang các nguồn tự nhiên khác, như dầu ôliu, hoặc tổng hợp hóa học. Do đó, được bao gồm trong định nghĩa về squalan là các dạng tự nhiên, tổng hợp hoặc bán tổng hợp, hoặc hỗn hợp của chúng. Squalan là có bán trên thị trường ở độ tinh khiết khác nhau, ví dụ: từ nguồn thực vật, từ Worlee (Squalan, thực vật), hoặc Croda (Pripure Squalan); hoặc tổng hợp, ví dụ, từ Kuraray (Squalan-PE). Theo sáng chế, độ tinh khiết cao của squalan được ưu tiên: tốt hơn nếu trên 75%, tốt hơn nữa nếu trên 80, 90, hoặc thậm chí trên 95%, theo thứ tự ưu tiên.

“Nhũ tương” là hỗn hợp gồm ít nhất hai chất lỏng không trộn lẫn, nhờ đó chất lỏng này được phân tán trong chất lỏng kia. Thông thường, các giọt của pha phân tán rất nhỏ, trong giới hạn micromet hoặc nhỏ hơn. Theo sáng chế, nhũ tương bao gồm pha dầu và pha nước.

Quy trình và thiết bị điều chế nhũ tương ở quy mô bất kỳ là đã biết trong lĩnh vực này, và ví dụ được mô tả trong sổ tay như: “Remington: the science and practice of pharmacy” (2000, Lippincot, USA, ISBN: 683306472), và: “Veterinary vaccinology”

(P. Pastoret et al. ed., 1997, Elsevier, Amsterdam, ISBN 0444819681).

Khi tá chất dầu theo sáng chế là nhũ tương, nhũ tương có thể là nhũ tương nước trong dầu (W/O), trong đó dầu là pha ngoài liên tục. Theo cách khác, nhũ tương có thể là nhũ tương “dầu trong nước” (O/W), trong đó dầu là pha bên trong phân tán.

Bằng cách chọn loại và nồng độ thích hợp của chất nhũ hóa, các nhũ tương như vậy có thể được tạo ra và duy trì ổn định.

Chất nhũ hóa có vị trí liên pha nằm giữa nước và dầu và làm ổn định các giọt của pha phân tán bên trong. Nhiều chất nhũ hóa khác nhau là đã biết và thích hợp cho sử dụng được lý như trong vaccin. Các chất nhũ hóa ưu tiên cho tá chất dầu theo sáng chế là Polysorbate 80, còn gọi là polyoxyetylen sorbitan mono-oleat, và có bán trên thị trường dưới dạng Tween® 80. Tween 80 là được sử dụng trong tá chất dầu theo sáng chế với lượng 0,1 - 10% w/v tá chất dầu.

Do đó, theo sáng chế, tá chất dầu, khi ở dạng nhũ tương O/W, gồm pha nước bên ngoài và pha dầu phân tán bên trong. Điều này tạo điều kiện thuận lợi cho việc trộn tá chất dầu dạng nhũ tương O/W với RP mã hóa kháng nguyên có nguồn gốc từ tác nhân gây bệnh ở động vật theo sáng chế. Ví dụ bằng cách trộn chế phẩm nước bao gồm RP, với tá chất dầu dạng nhũ tương O/W. Lắc bằng tay đơn thuần khoảng 1 phút tiếp theo trộn hợp lý hai chế phẩm nước.

Theo cách khác, và đặc biệt có lợi, tá chất dầu dạng nhũ tương O/W có thể được sử dụng trực tiếp để hoàn nguyên RP từ dạng đông khô. Điều này có nghĩa RP có thể được cung cấp ở dạng ổn định cao dưới dạng thể đông khô, và vaccin theo sáng chế có thể được điều chế bằng cách trộn ngang tại thời điểm thuận tiện, trước khi dùng cho động vật đích.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “khoảng” được sử dụng thay thế cho thuật ngữ “xấp xỉ” và chỉ ra rằng giá trị là trong vòng năm mươi phần trăm giá trị được chỉ ra, tức là, chế phẩm chứa “xấp xỉ” 1×10^8 hạt replicon ARN của alphavirus trên millilit chứa từ 5×10^7 đến $1,5 \times 10^8$ hạt replicon ARN của alphavirus trên mililit.

Một ví dụ về tá chất dầu dạng nhũ tương O/W dùng cho vaccin theo sáng chế là: XSolve™. XSolve là tổ hợp gồm hai thành phần tá chất nhũ tương O/W: Diluvac Forte™ dựa trên vitamin E axetat (xem EP 382.271), và Microsol™ dựa trên dầu parafin

lông (xem WO 2009/144.088).

Trong các nhũ tương này, kích thước trung bình thể tích của giọt dầu khoáng và dầu phi khoáng có thể là khác nhau. Tốt hơn nếu giọt dầu khoáng có kích thước dưới micron (cận micron hay submicron).

Thuận tiện là, tá chất dầu nhũ tương được điều chế riêng rẽ so với RP theo sáng chế. Do đó, phương pháp và thiết bị nhũ hóa tá chất dầu có thể được sử dụng mà không tương thích với duy trì chất lượng của RP, đã có mặt trong tá chất dầu. Một ví dụ là phương pháp nhũ hóa với lực cắt cao được sử dụng để thu nhũ tương dưới micron bằng cách làm đồng nhất cao áp, như với bộ xử lý Microfluidiser (Microfluidics, MA, USA).

Ví dụ khác về tá chất dầu dạng nhũ tương O/W dùng cho vacxin theo sáng chế là: SVEA™, mà bao gồm squalan và vitamin E-axetat, và được mô tả trong: WO 2018/115.435.

Theo sáng chế, tên của vi sinh vật hoặc tác nhân gây bệnh, như ví dụ, virus gây bệnh viêm não ngựa Venezuela (VEE) và virus cúm chim, v.v., chỉ phân loại tương ứng của chúng như hiện thời. Tuy nhiên, tên có thể thay đổi theo thời gian khi phát hiện mới có thể dẫn đến tái phân loại thành nhóm mới hoặc khác. Tuy nhiên, do điều này không làm thay đổi chính vi sinh vật đó, hoặc nguồn kháng nguyên của nó, mà chỉ là tên khoa học hoặc phân loại, các vi sinh vật được tái phân loại như vậy vẫn nằm trong phạm vi của sáng chế.

Đề cập đến họ phân loại bao gồm vi sinh vật bất kỳ là loài, phân typ, thứ, typ sinh học, typ huyết thanh hoặc kiểu gen trong họ đó.

Theo sáng chế “lợn” chỉ động vật thuộc họ Suidae, và tốt hơn nếu là động vật thuộc giống Sus, ví dụ: lợn hoang hoặc lợn nuôi, lợn lòi đực hoang, lợn hươu, hoặc lợn lòi. Lợn này cũng bao gồm lợn được chỉ ra bằng tên tùy ý theo giới tính, tuổi, kích thước của chúng, như: lợn nái, lợn lòi đực, lợn thiên, lợn cái con, lợn cai sữa, hoặc lợn con.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “chim” chỉ chim liên quan đến nông nghiệp, như: gà, gà tây, vịt, ngỗng, gà gô, công, chim cú, bồ câu, gà lôi, gà Nhật, hoặc đà điểu. Tốt hơn nếu chim là gà, gà tây, vịt, hoặc ngỗng. Tốt hơn nữa nếu chim là gà hoặc gà tây. Tốt nhất nếu chim là gà.

Chim có thể thuộc loại bất kỳ như chim đẻ trứng, chim giống, gà giò, giống lai,

hoặc dòng bố mẹ thuộc bất kỳ giống như vậy. Loại chim ưu tiên là gà giò.

Như được sử dụng trong bản mô tả này thuật ngữ “cá rô phi” có thể bao gồm gần như hàng trăm cá vây xương từ họ Cichlidae. Cá rô phi chủ yếu là cá nước ngọt sống ở suối nông, ao, sông và hồ và ít thấy sống trong nước mặn.

“Kit gồm các phần” theo sáng chế là thông thường kết hợp đóng gói vật chứa với các chế phẩm cụ thể với lượng định trước, mà kit có thể bao gồm hoặc chỉ các hướng dẫn thực hiện điều chế và chủng ngừa theo sáng chế.

Động vật đích đối với vaccin, phương pháp gây miễn dịch, và hợp chất và sử dụng để bảo vệ động vật theo sáng chế, là các động vật cần chủng ngừa chống lại bệnh nhiễm hoặc bệnh gây ra bởi tác nhân gây bệnh cụ thể mà kháng nguyên được mã hóa có nguồn gốc từ đó. Tuổi, thể trọng, giới tính, tình trạng miễn dịch, và các thông số khác của động vật đích cần chủng ngừa/bảo vệ/gây miễn dịch là không quan trọng, mặc dù rõ ràng là hợp lý nếu chủng ngừa cho các động vật đích khỏe mạnh, không nhiễm bệnh, và chủng ngừa càng sớm càng tốt.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “cụm phát sinh loài” là nhóm virus cúm neuraminidaza được nhóm với nhau (trên cùng nhánh) trong cây phát sinh loài hoặc cây tiến hóa mà xuất phát từ tổ tiên giống nhau (cùng loài). Đối với neuraminidaza (NA) của IAV-S tìm thấy ở Mỹ, có hai cụm phát sinh loài chính của N1, là N1 cổ điển và N1 đại dịch, và hai cụm phát sinh loài chính của N2, là N2-1998 và N2-2002. Cụm phát sinh loài N1 cổ điển chứa các NA nhóm với nhau với NA từ virus cúm lợn H1N1 cổ điển. Cụm phát sinh loài N1 đại dịch chứa các NA nhóm với nhau với NA đến từ virus cúm H1N1 đại dịch. Cụm phát sinh loài N2-1998 chứa các NA nhóm với nhau với NA từ virus cúm người H3N2 lây sang lợn năm 1998, trong khi cụm phát sinh loài N2-2002 chứa các NA nhóm với nhau với NA từ virus cúm người H3N2 lây sang lợn năm 2002. [xem, Anderson *et al.*, *Influenza and other Respiratory Viruses* 7 (Suppl. 4): 42-51 (2013)].

Thuật ngữ “phi IAV-S”, được sử dụng để bổ nghĩa cho các thuật ngữ như tác nhân gây bệnh, và/hoặc kháng nguyên (hoặc chất gây miễn dịch) để chỉ ra rằng tác nhân gây bệnh, và/hoặc kháng nguyên (hoặc chất gây miễn dịch) tương ứng là tác nhân gây bệnh IAV-S hoặc kháng nguyên (hoặc chất gây miễn dịch) IAV-S và kháng nguyên (hoặc chất gây miễn dịch) protein phi IAV-S không có nguồn gốc từ IAV-S.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, vaccin đa giá là vaccin bao gồm hai hoặc nhiều hơn kháng nguyên khác nhau, nhờ đó khác biệt có thể ở bất kỳ trong số các cấp độ sinh học như về giống, loài, typ huyết thanh, v.v.. Theo phương án cụ thể về loại này, vaccin đa giá kích thích hệ miễn dịch của động vật đích chống lại hai hoặc nhiều hơn tác nhân gây bệnh khác nhau ở động vật, hoặc chống lại các biến thể khác biệt miễn dịch của cùng tác nhân gây bệnh.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “được dụng” được sử dụng làm tính từ trong đó danh từ mà nó bổ nghĩa là thích hợp để sử dụng trong được phẩm. Khi nó được sử dụng, ví dụ, để mô tả tá được trong vaccin, nó xác định tá được này là tương thích với các thành phần khác của vaccin và không gây bất lợi cho động vật nhận dự tính, *ví dụ*, lợn.

“Dùng” vaccin, theo thứ tự các thành phần của kit theo sáng chế cho động vật đích có thể được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp và đường khả thi bất kỳ. Thông thường, dùng dùng tối ưu được xác định theo loại vaccin/hộp chất được sử dụng, và đặc điểm của động vật đích và bệnh mà nó được dự tính chống lại. Tùy theo cách bào chế vaccin/hộp chất, các kỹ thuật dùng khác nhau có thể được áp dụng. Ví dụ, vaccin/hộp chất dưới dạng nhũ tương O/W theo sáng chế có thể được dùng qua đường trong ruột hoặc qua đường màng nhầy, tức là, bằng cách nhỏ vào mắt, nhỏ vào mũi, qua đường miệng, qua đường ruột, nhỏ vào miệng-mũi, xịt. Khả năng khác là bằng phương pháp dùng hàng loạt, như thông qua nước uống, phun thô, phun mù, qua thức ăn, v.v..

“Dùng ngoài đường tiêu hóa” bao gồm dưới da tiêm, tiêm dưới màng nhầy, tiêm trong tĩnh mạch, tiêm trong cơ, tiêm trong da, và truyền.

“Dùng qua đường màng nhầy” bao gồm dùng qua đường mắt, qua đường mũi, qua đường miệng, qua đường mắt-mũi, qua đường trong khí quản, qua đường ruột, qua đường hậu môn, và qua đường âm đạo.

“Dùng tại chỗ” bao gồm dùng qua đường da và xuyên da.

Phương pháp, định thời, và thể tích dùng vaccin, theo thứ tự thành phần của kit theo sáng chế, tốt hơn là được kết hợp vào các chế độ chủng ngừa hiện có của các phép chủng ngừa khác mà động vật đích có thể cần đến, nhằm làm giảm stress cho động vật đích và làm giảm chi phí nhân công. Chính các phép gây miễn dịch khác này có thể được dùng bằng phương pháp dùng kết hợp, theo cách tương thích với sử dụng đã đăng

ký của chúng.

Như được sử dụng trong bản mô tả này thuật ngữ “mảnh kháng nguyên” liên quan đến protein cụ thể (ví dụ, kháng nguyên protein) là mảnh của protein mà có tính kháng nguyên, tức là, có khả năng tương tác đặc hiệu với phân tử nhận biết kháng nguyên của hệ miễn dịch, như globulin miễn dịch (kháng thể) hoặc thụ thể kháng nguyên của tế bào T. Ví dụ, mảnh kháng nguyên của neuraminidaza (NA) của IAV-S là mảnh của protein NA mà có tính kháng nguyên. Tốt hơn nếu mảnh kháng nguyên theo sáng chế là trội miễn dịch đối với kháng thể và/hoặc nhận biết thụ thể tế bào T. Theo các phương án cụ thể, mảnh kháng nguyên liên quan đến kháng nguyên protein nhất định là mảnh của protein đó mà vẫn giữ được ít nhất 25% tính kháng nguyên của protein có chiều dài đầy đủ. Theo các phương án ưu tiên, mảnh kháng nguyên vẫn giữ được ít nhất 50% tính kháng nguyên của protein có chiều dài đầy đủ. Theo các phương án ưu tiên khác, mảnh kháng nguyên vẫn giữ được ít nhất 75% tính kháng nguyên của protein có chiều dài đầy đủ. Mảnh kháng nguyên có thể chỉ nhỏ 12 axit amin hoặc ở thái cực khác, là các mảnh lớn mà chỉ thiếu một axit amin so với protein có chiều dài đầy đủ. Theo các phương án cụ thể mảnh kháng nguyên bao gồm 25 đến 150 gốc axit amin. Theo các phương án khác, mảnh kháng nguyên bao gồm 50 đến 250 gốc axit amin.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, một trình tự axit amin là 100% “giống hệt” hoặc có 100% “giống hệt” với trình tự axit amin thứ hai khi gốc axit amin của cả hai trình tự này là giống hệt nhau. Do đó, trình tự axit amin là 50% “giống hệt” với trình tự axit amin thứ hai khi 50% gốc axit amin của hai trình tự axit amin này là giống hệt nhau. So sánh trình tự được thực hiện trên khối gốc axit amin liền kề chứa trong protein nhất định, ví dụ, protein, hoặc một phần của polypeptit cần so sánh. Theo phương án cụ thể, các đoạn mất hoặc cài được chọn mà nếu không làm biến đổi tính tương ứng giữa hai trình tự axit amin sẽ được tính đến.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, phần trăm giống hệt trình tự nucleotit và axit amin có thể được xác định sử dụng thuật toán C, MacVector (MacVector, Inc. Cary, NC 27519), Vector NTI (Informax, Inc. MD), Oxford Molecular Group PLC (1996) và Clustal W với các thông số mặc định sắp hàng, và các thông số mặc định cho mức giống hệt. Các chương trình có bán trên thị trường này cũng có thể được sử dụng để xác định mức tương tự bằng cách sử dụng các thông số mặc định giống nhau hoặc tương tự. Theo cách khác, phép tìm kiếm Advanced Blast trong các điều kiện lọc mặc định có thể được

sử dụng, *ví dụ*, sử dụng chương trình Pileup của gói GCG Package v. 7 (Genetics Computer Nhóm, Madison, Wisconsin), sử dụng các thông số mặc định.

Khi hạt replicon ARN của alphavirus được bảo quản riêng rẽ, nhưng dự tính là được trộn với các thành phần vacxin khác trước khi dùng, hạt replicon ARN của alphavirus có thể được bảo quản trong dung dịch ổn định chứa nước giống như dung dịch của các thành phần khác, *ví dụ*, dung dịch đệm, hoặc dung dịch có nồng độ sucroza cao.

Vacxin theo sáng chế có thể dễ dàng được dùng bằng “phương pháp gây miễn dịch cho động vật” chuẩn bất kỳ. Chuyên gia trong lĩnh vực này sẽ nhận thấy rằng đường dùng được chọn có xét đến các đặc điểm của động vật đích và vacxin cần dùng. Tốt hơn nếu chế phẩm vacxin được bào chế thích hợp cho từng loại động vật đích và đường dùng.

Theo sáng chế, “cấu trúc dưới phân tử của vi sinh vật” có thể là phân tử sinh học hoặc tổng hợp như phân tử protein, hydrat cacbon, lipopolysacarit, lipid, hoặc axit nucleic.

Chuyên gia trong lĩnh vực này cũng có thể tiếp tục tối ưu hóa vacxin, kit, phương pháp, hoặc sử dụng theo sáng chế. Nói chung, việc này bao gồm tinh chỉnh hiệu quả của phép chủng ngừa/gây miễn dịch để tiếp tục cải thiện sự bảo vệ miễn dịch mà nó tạo ra. Việc này có thể được thực hiện bằng cách điều chỉnh liều, thể tích, tá chất hoặc hàm lượng kháng nguyên của chất được dùng, hoặc bằng cách dùng thông qua đường, phương pháp hoặc chế độ khác nhau. Tất cả các cách thức này đều nằm trong phạm vi của sáng chế.

Cũng cần lưu ý rằng sáng chế không bị giới hạn ở các cấu hình, các bước xử lý và các vật liệu cụ thể được bộc lộ trong bản mô tả này do các cấu hình, các bước xử lý và các vật liệu như vậy có thể thay đổi ở mức độ nhất định. Cũng cần lưu ý rằng sáng thuật ngữ được sử dụng trong bản mô tả này được sử dụng chỉ nhằm mô tả các phương án cụ thể và không dự tính là làm giới hạn, do phạm vi của sáng chế sẽ chỉ được giới hạn bởi yêu cầu bảo hộ kèm theo và các trường hợp tương đương.

Bảng trình tự

SEQ ID NO:	Mô tả (5' -> 3')	Loại
1	ggcgcgccgcacc	axit nucleic

2	ttaattaa	axit nucleic
---	----------	--------------

Các ví dụ không giới hạn sau chỉ nhằm làm rõ hơn sáng chế mà không được coi là làm giới hạn phạm vi của sáng chế theo cách bất kỳ.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Tá chất đầu cải thiện cường độ và khoảng thời gian của đáp ứng kháng thể ở lợn với hạt replicon ARN của alphavirus mã hóa hemagglutinin của virus cúm lợn

Vật liệu và phương pháp

Các vector replicon của VEE được thiết kế để biểu hiện gen ngưng kết tổ hồng cầu (hemagglutinin: HA) được cấu trúc như đã mô tả trước đó [xem US 9,441,247 B2; nội dung của nó được đưa vào trong bản mô tả này theo cách viện dẫn], với các cải biến sau: đoạn cài gen HA được tối ưu hóa trình tự (ATUM, CA, USA). Vector replicon có nguồn gốc từ TC-83 “pVEK” [được bộc lộ và được mô tả trong US 9,441,247 B2] được cắt bằng các enzym giới hạn *AscI* và *PacI*. Plasmid ADN chứa trình tự khung đọc mở đã tối ưu hóa codon của các gen N1 hoặc N2 với trình tự kể đầu 5’ (5’-GGCGCGCCGCACC-3’) [SEQ ID NO: 1] và trình tự kể đầu 3’ (5’-TTAATTAA-3’) [SEQ ID NO: 2], được cắt theo cách tương tự bằng các enzym giới hạn *AscI* và *PacI*. Tiếp theo, cassette gen tổng hợp được gắn vào vector pVEK đã cắt, và các dòng thu được được gọi là “pVHV-N1-đại dịch”, “pVHV-N1-cổ điển”, pVHV-N2-2002”, và “pVHV-N2-1998”. Danh pháp vector “pVHV” được chọn để chỉ vector replicon có nguồn gốc từ pVEK chứa cassette chuyển gen được tách dòng thông qua các vị trí *AscI* và *PacI* trong vị trí đa tách dòng của pVEK.

Việc sản xuất hạt replicon ARN của TC-83 được thực hiện theo phương pháp đã mô tả trước đó [US 9,441,247 B2 và U.S. 8,460,913 B2; nội dung của chúng được đưa vào trong bản mô tả này theo cách viện dẫn]. Nói vắn tắt: ADN vector replicon pVHV và plasmid ADN hỗ trợ được tạo mạch thẳng bằng enzym giới hạn *NotI* trước khi phiên mã *in vitro* sử dụng ARN polymeraza của T7 MegaScript™ và chất tương tự mũ (Promega, Madison, WI). Quan trọng là, ARN hỗ trợ được sử dụng trong phương pháp sản xuất này thiếu trình tự khởi đầu phân hệ gen của VEE, như đã mô tả trước đó [Kamrud *et al.*, *J Gen Virol.* 91(Pt 7): 1723-1727 (2010)]. Các ARN đã tinh chế về các thành phần replicon và thành phần hỗ trợ được kết hợp và được trộn với huyền phù tế

bào Vero, được biến nạp điện trong các cuvet 4 mm, và được đưa trở lại môi trường nuôi cấy tế bào OptiPro™ SFM (Thermo Fisher, Waltham, MA). Sau khi ủ qua đêm, hạt replicon ARN của alphavirus được tinh chế, được pha chế trong nước muối đệm phosphat với 5% w/v sucroza và 1% v/v huyết thanh lợn, được khử trùng bằng cách cho qua bộ lọc màng 0,22 micron, và được phân thành các phần mẫu để bảo quản. Hiệu giá của RP chức năng được xác định bằng thử nghiệm gây nhiễm-miễn dịch huỳnh quang trên đơn lớp tế bào Vero. Các mẻ RP được nhận dạng theo kháng nguyên được mã hóa bởi replicon đã bao gói.

Mười lợn con âm tính kháng thể với virus cúm lợn được phân ngẫu nhiên thành các nhóm với mỗi nhóm gồm năm con. Vacxin RP biểu hiện kháng nguyên ngưng kết tổ hồng cầu của chủng cúm lợn H3N2 được điều chế ở hiệu giá 5×10^5 RP/liều. Ngay trước khi chủng ngừa, vacxin của nhóm chỉ có RP được pha loãng theo tỷ lệ 1:1 (v/v) với chất pha loãng PBS vô trùng, trong khi vacxin của nhóm RP+ tá chất được pha loãng theo tỷ lệ 1:1 (v/v) với tá chất XSolve. Tiếp theo, lợn được chủng ngừa qua đường trong cơ bằng 2,0 mL chất thích hợp. Quy trình chủng ngừa được thực hiện vào các ngày nghiên cứu 0 và 21, mỗi lần với chế phẩm vacxin mới. Huyết thanh được lấy trong quá trình thử nghiệm được thử nghiệm về hoạt tính ức chế ngưng kết hồng cầu (HI) sử dụng kháng nguyên của virus cúm lợn H3N2. Các kết quả được thông báo là độ pha loãng cao nhất có hoạt tính ức chế; các hiệu giá nhỏ hơn 1:10 được thông báo là 1:9; các hiệu giá >640 được thông báo là 1:641. Hiệu giá trung bình nhân được thể hiện trong bảng 1.

Bảng 1: Hiệu giá ức chế ngưng kết hồng cầu (HI) trung bình nhân

Ngày nghiên cứu	0	21	28	35	56	70	84
RP	9,0	9,0	25,8	22,5	12,9	9,4	9,4
RP + Tá chất	9,0	9,2	242,7	211,1	91,9	52,8	52,8

Ở liều tương đối thấp 5×10^5 RP, vacxin không tá chất cho hiệu giá HI cường độ thấp, nhanh và tạm thời. Để so sánh, vacxin có tá chất cho các hiệu giá HI cao sau khi chủng ngừa tăng cường, và các hiệu giá HI này vẫn cao cho đến khi kết thúc thử nghiệm 84 ngày.

Phát hiện này lần đầu tiên chỉ rõ rằng XSolve có thể có tác dụng đáng kể như vậy đối với việc gây miễn dịch cho lợn bằng RP ở các liều rất thấp (5×10^5 RP). Các nghiên cứu đã biết sử dụng RP vacxin không tá chất, đã phải sử dụng các lượng thành phần RP/liều cao hơn nhiều, ví dụ: 1×10^9 đối với FMD RP, và 5×10^7 đối với SIV RP).

Ví dụ 2

Tá chất dầu cải thiện cường độ và khoảng thời gian của đáp ứng kháng thể ở lợn với hạt replicon ARN đa giá của alphavirus mã hóa các kháng nguyên của virus cúm lợn

Các nhóm lợn con cai sữa từ đàn âm tính với cúm lợn được phân ngẫu nhiên thành các nhóm điều trị như được chỉ ra trong bảng 2. Vaccine đa giá chứa hạt replicon ARN của alphavirus để phòng cúm lợn được phối trộn bằng cách sử dụng tám kháng nguyên dạng hạt ARN riêng rẽ biểu hiện HA hoặc NA từ các chủng cúm lợn khác nhau, mỗi kháng nguyên được phối trộn đến xấp xỉ 1×10^7 RP/liều. Hai kháng nguyên H3, một H1, một N1, và một N2 được bao gồm, và thử nghiệm huyết thanh học theo cặp (HI hoặc NI) được sử dụng để đánh giá đáp ứng kháng nguyên với mỗi kháng nguyên. Nghiên cứu được thực hiện dưới dạng thiết kế đúp, với một nửa số động vật được thử thách bằng virus H1N1, và nửa còn lại được thử thách bằng virus H1N2.

Bảng 2: Quy trình thực nghiệm của ví dụ 2

Nhóm	Số lợn	Vaccine	Chủng thử thách
1	16	Chỉ có RP đa giá	H1N1
2	16	RP đa giá + tá chất dầu	
3	16	Giả dược	
4	16	Chỉ có RP đa giá	H1N2
5	16	RP đa giá + tá chất dầu	
6	16	Giả dược	

Sử dụng tá chất dầu XSolve được phát hiện là làm gia tăng đáng kể cường độ của đáp ứng huyết thanh với cả tám thành phần vaccine. Mặc dù tất cả các chế phẩm vaccine đều bảo vệ chống lại tổn thương phổi (Fig. 1A-1B), tuy nhiên việc thêm XSolve cải thiện hiệu quả của vaccine khi được đo bằng mức bài tiết qua mũi của virus cúm H1N1 và H1N2 (Fig. 1C-1D). Fig. 1 - 1F thể hiện điểm số hiệu giá NI tương ứng.

Tác dụng của tá chất đối với hiệu giá HI được thể hiện trên Fig. 2A-2F.

Nghiên cứu này chứng minh rằng RP của SIV đa giá không tá chất tạo ra các kháng thể đối với tất cả các thành phần, nhưng việc thêm tá chất dầu tăng cường đáng kể đáp ứng miễn dịch của tất cả các thành phần. Sự giảm bài tiết qua mũi và sự tụ tập sót hơn của các điểm số phổi, thể hiện các ưu điểm lâm sàng quan trọng, ví dụ, liên quan đến việc hạn chế lây lan của bệnh nhiễm trong đàn hoặc quần thể.

Ví dụ 3

Hiệu quả của vaccin NA-RP bốn thành phần có tá chất chống lại bệnh nhiễm H1N1 ở lợn cai sữa, có các kháng thể N1 ở thời điểm chủng ngừa lần đầu

Nghiên cứu thử thách chủng ngừa được thực hiện để xác định hiệu quả và tính sinh miễn dịch của hai mức liều của vaccin NA-RP bốn thành phần có tá chất. Vaccin có tá chất bao gồm bốn cấu trúc RP, mỗi cấu trúc mã hóa riêng rẽ một gen NA khác nhau của thể phân lập IAV-S đương thời tại Mỹ. Nói chung, các gen NA này thể hiện hai cụm phát sinh loài N1 (N1-cổ điển và N1-đại dịch) và hai cụm N2 (N2-1998 và N2-2002) (xem Bảng 3). Vaccin có tá chất được dùng bằng hai mũi chủng ngừa trong cơ (IM) ở 1 mL/liều, ở lợn cai sữa có kháng thể dương tính với kháng nguyên N1-cổ điển ở thời điểm chủng ngừa lần đầu của chúng. Hiệu quả của vaccin NA-RP bốn thành phần có tá chất được thử nghiệm chống lại bệnh nhiễm thử thách bằng N1 khác loại (virus H1N1).

Vật liệu và phương pháp

Tạo cấu trúc kháng nguyên NA-RP:

Hạt replicon ARN của alphavirus (RP) khuyết sao chép được mã hóa bởi gen neuraminidaza (NA), và được điều chế căn bản như được mô tả trong Ví dụ 1 trên đây.

Bảng 3: Các gen N1 và N2 được mã hóa trong các cấu trúc NA-RP của ví dụ 3

Cụm phát sinh loài NA	Chủng cho gen	Số đăng ký tại ngân hàng gen
N1-cổ điển	A/porcine/Iowa/A01410307/2014 (H1N1)	KJ605083
N1-đại dịch	A/porcine/Minnesota/A01483170/2014 (H1N1)	KP036969
N2-1998	A/porcine/Michigan/A02077465/2015 (H1N2)	KR982634
N2-2002	A/porcine/Illinois/A01475495/2014 (H1N2)	KJ941362

n=10 con trên mỗi nhóm

Virus

Các virus thử thách được thu từ Phòng thí nghiệm Dịch vụ Thú y Quốc gia thuộc Bộ Nông nghiệp Hoa Kỳ (USDA). A/porcine/Illinois/A01554351/2015 (H1N1) mang gen HA của cụm H1-gama và gen NA của cụm N1-cổ điển. Các virus này được nhân lên trong môi trường nuôi cấy tế bào MDCK. Các tế bào nhập dòng được gây nhiễm trong xấp xỉ 48 giờ, cho đến khi tác dụng gây bệnh cho tế bào là rõ ràng ở hơn 70% đơn

lớp tế bào. Khi thu hoạch, dịch nổi được loại khỏi bình và được làm trong bằng cách ly tâm trước khi bảo quản đông kết virus này.

Động vật

Các lợn con cai sữa được chọn từ đàn khỏe mạnh ở mức cao trên cơ sở sàng lọc huyết thanh học để xác nhận các kháng thể HI hoặc NI (ức chế neuraminidaza) tồn tại trước đối với chủng vaccine và chủng thử thách. Động vật gồm cả đực và cái, và xấp xỉ ba tuần tuổi ở thời điểm chủng ngừa lần đầu.

Chủng ngừa và thử thách

Các nhóm điều trị được nêu trong bảng 4. Vaccine NA-RP bốn thành phần được pha chế ở 10^6 bản sao mỗi RP/liều, dựa trên thử nghiệm hiệu nghiệm trên cơ sở miễn dịch huỳnh quang để định lượng các RP chức năng. Các kháng nguyên NA-RP được pha chế trong chất ổn định gồm có 1% huyết thanh lợn và 5% sucroza. Vaccine giả được chứa chất ổn định này nhưng không có kháng nguyên. Vaccine được trộn với tá chất dầu XSolve (1:1 v/v, liều 1 mL), ngay trước khi dùng qua đường IM cho các lợn ở 3 và 7 tuần tuổi. Các mức liều được chuẩn độ ngược bằng thử nghiệm IFA đối với chất vaccine còn lại sau chủng ngừa. Các mẫu huyết thanh được lấy vào ngày chủng ngừa lần đầu, ngày chủng ngừa thứ hai, và ngày gây nhiễm thử thách.

Ở một ngày trước khi chủng ngừa lần đầu, tất cả các con đều được cân, và các con trong các nhóm có kháng thể dương tính với N1-cổ điển được tiêm dưới da bằng liều 2 mL/kg huyết thanh tăng miễn dịch N1-cổ điển (hiệu giá kháng thể kháng NI là 1:2560 đối với kháng nguyên N1-cổ điển).

Bảng 4: Các nhóm điều trị với chủng thử thách H1N1 như trong ví dụ 3

Nhóm	Trạng thái kháng thể N1-Cổ điển	Vaccine (+ XSolve)	RP trên liều 1 mL
1	Dương tính	NA-RP bốn thành phần	10^6
2	Âm tính	NA-RP bốn thành phần	10^6
3	Dương tính	Giả dược	---
4	Âm tính	Giả dược	---

(n = 10 con trên mỗi nhóm)

Gây nhiễm thử thách được dùng cho lợn ở 3 tuần sau chủng ngừa lần hai. Chất

thử thách H1N1 (H1-*gamma*-N1-cổ điển) được điều chế đến liều đích $10^{6,5}$ TCID₅₀/con (thể tích 6 mL). Chất thử thách được dùng qua đường trong khí quản. Các liều virus thử thách được xác nhận bằng cách chuẩn độ ngược chất thử thách còn lại. Dịch quẹt mũi được lấy từ tất cả các con ở -1, 1, 3, và 5 ngày sau thử thách.

Mổ khám xác được thực hiện ở 5 ngày sau thử thách. Lợn được chết bình yên bằng barbiturat quá liều ở 5 DPC dưới sự giám sát của bác sỹ thú y có giấy phép. Phổi được lấy và được quan sát để ghi nhận diện tích bề mặt của mỗi thùy bị ảnh hưởng bởi tổn thương vĩ mô, dẫn đến phần trăm điểm số tổn thương phổi toàn diện. Nước rửa phế quản-phế nang và dịch quẹt mũi được lấy từ tất cả các con để đo hiệu giá virus. Các lát cắt phổi được lấy để phân tích mô bệnh học của tổn thương vi mô.

Phân tích đáp ứng miễn dịch:

Các kháng thể đặc hiệu với IAV-S trong các mẫu huyết thanh lợn được xác định bằng thử nghiệm NI. Huyết thanh được bất hoạt nhiệt trong 30-60 phút ở 56 °C. Thử nghiệm NI được thực hiện với cải tiến nhỏ đối với phương pháp của Sandbulte & Eichelberger (*Phương pháp Mol Biol* 1161: 337-45, 2014). Nói vắn tắt, các dung dịch pha loãng huyết thanh theo bậc 2 lần được trộn với kháng nguyên protein đã biểu hiện với các thể tích bằng nhau trên đĩa 96 lỗ đã phủ fetuin và được ủ qua đêm ở 37° C. Thể liên hợp ngưng kết tổ lạc-peroxidaza cải ngựa được thêm trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng để liên kết các phân tử fetuin đã tách axit sialic. Tín hiệu được thu bằng cơ chất tạo màu TMB, và kết quả được đọc ở 650 nm. Mật độ quang (OD) trung bình của đối chứng âm tính, mà thiếu kháng nguyên NA, được trừ đi từ tất cả các lỗ. Tiếp theo, giá trị OD của mẫu thử nghiệm được chuẩn hóa trên thang 0-100%, trong đó OD trung bình của các lỗ đối chứng dương tính (chứa kháng nguyên NA, nhưng không có huyết thanh) được xác định là 100%. Hiệu giá kháng thể NI được xác định là độ pha loãng cao nhất của mẫu mà ức chế $\geq 50\%$ hoạt tính neuraminidaza.

Kiểm tra bệnh học của phổi

Tổn thương vĩ mô quan sát ở phía ngoài của tất cả các thùy phổi (các khối có kết màu tía đến màu mận chín có ranh giới rõ ràng) được ghi lại trên bản đồ lưới phía trước và phía sau phổi. Điểm số toàn diện (phần trăm tổn thương phổi) đối với mỗi con được tính theo số lượng lưới bị ảnh hưởng bởi tổn thương.

Giải phóng virus

Dịch quệt mũi và dịch BAL được pha loãng theo bậc 10 lần với môi trường gây nhiễm [Dulbecco's minimum essential medium (DMEM) có bổ sung 0,3% albumin huyết thanh bò, thành phần V; 2 mM L-Glutamin; 25 µg/mL Gentamycin; 2 µg/mL trypsin IX], và 100 µL mỗi dung dịch pha loãng được thêm vào loạt bốn lỗ chứa tế bào MDCK nhập dòng trong đĩa 96 lỗ. Đĩa được ủ ở 37° C với 5% CO₂ và quan sát sau 72 giờ về sự có mặt của virus gây nhiễm bằng thử nghiệm ngưng kết hồng cầu của dịch nổi từ mỗi lỗ. Hiệu giá IAV-S được tính bằng phương pháp của Spearman-Kärber và được biểu diễn dưới dạng Log10 TCID₅₀ trên mL.

Kết quả

Các đáp ứng miễn dịch của lợn được chủng ngừa bằng NA-RP đa giá được thể hiện trên Fig. 3. Đáng chú ý là:

- Lợn được truyền thụ động huyết thanh tăng miễn dịch N1-cổ điển ở một ngày trước khi nhận chủng ngừa lần đầu của chúng có hiệu giá kháng thể N1-cổ điển là 40-80 ở thời điểm chủng ngừa.
- Sau hai liều chủng ngừa vaccin 4 thành phần NA-RP có tá chất Xsolve, cả lợn âm tính huyết thanh và lợn dương tính huyết thanh với kháng thể N1 đều có sự gia tăng đáng kể hiệu giá kháng thể N1-cổ điển. Điều này chỉ ra rằng vaccin RP có tá chất dầu là hữu hiệu thậm chí ở động vật đích dương tính với kháng thể chống lại kháng nguyên được mã hóa bởi RP.
- Hiệu giá NI của lợn ở nhóm được chủng ngừa bằng N1-cổ điển âm tính/giả được là vẫn âm tính huyết thanh.

Hiệu quả của vaccin 4 thành phần NA-RP phòng ngừa bệnh nhiễm thử thách, liên quan đến tổn thương phổi được thể hiện trên Fig. 4. Đáng chú ý là vaccin 4 thành phần NA-RP có hiệu quả cao trong việc làm giảm tổn thương phổi cả khi chủng ngừa cho lợn có và không có kháng thể N1-cổ điển ở thời điểm chủng ngừa lần đầu của chúng. Trong cả hai nhóm, phần trăm tổn thương phổi đều giảm đáng kể so với cả hai nhóm được chủng ngừa bằng giả được.

Ví dụ 4

Tá chất dầu cải thiện cường độ của đáp ứng kháng thể ở lợn với hạt replicon ARN của alphavirus mã hóa kháng nguyên virus dịch tả lợn, so với tá chất nhôm hoặc nước

Chín lợn con, xấp xỉ ba tuần tuổi, được phân ngẫu nhiên thành các nhóm với mỗi nhóm gồm 3 con. Vaccin chứa hạt replicon ARN của alphavirus biểu hiện glycoprotein gai của virus dịch tả lợn (PEDV) được điều chế và được làm đông khô trong các lọ 20 liều. Vào ngày nghiên cứu 0, lợn được chủng ngừa qua đường trong cơ bằng 1,0 ml vaccin chứa hạt replicon ARN của alphavirus đã tái hydrat hóa với nước, tá chất nhôm hydroxit, hoặc tá chất XSolve. Vào ngày nghiên cứu 21, quy trình này được lặp lại với các lọ vaccin mới. Hiệu giá cuối của hạt replicon ARN của alphavirus trên liều sau khi tái hydrat hóa được xác định bằng thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang, và xấp xỉ 7×10^6 RP/liều đối với tất cả các nhóm. Huyết thanh được lấy trong quá trình thử nghiệm được thử nghiệm về kháng thể trung hòa PEDV, xem bảng 5.

Bảng 5: Tác dụng của các tá chất khác nhau đến sự phát triển của kháng thể trung hòa

Tá chất	Lợn #	Hiệu giá của Ab trung hòa PEDV				
		Trước lấy máu	20 DPV	6 DPV2	13 DPV2	20 DPV2
Không tá chất	154	<20	<20	20	40	20
	157	20	<20	<20	20	<20
	158	<20	<20	<20	<20	<20
XSolve	151	<20	<20	160	320	160
	155	<20	<20	40	80	20
	159	<20	<20	160	160	160
Alhydrogel	152	<20	<20	<20	<20	20
	153	20	<20	<20	<20	40
	156	<20	20	<20	<20	40

Các con được điều trị bằng vaccin không tá chất có lượng kháng thể trung hòa thấp hoặc không phát hiện được sau hai liều vaccin. Tất cả các con được điều trị bằng vaccin có tá chất nhôm hydroxit phát triển kháng thể trung hòa ngay trên giới hạn phát hiện. Ngược lại, vaccin có tá chất XSolve tạo ra kháng thể trung hòa cao hơn sau hai liều vaccin, và cả ba con đều đạt hiệu giá kháng thể tối thiểu cao hơn so với hiệu giá đỉnh quan sát được trong các nhóm thử nghiệm còn lại. Do đó, việc sử dụng nhôm-hydroxit làm tá chất là không hữu hiệu, và tá chất dầu là căn bản tốt hơn.

Ví dụ 5

Tá chất dầu cải thiện hiệu quả chủng ngừa ở gà của hạt replicon ARN của alphavirus mã hóa kháng nguyên cúm

Gà một ngày tuổi được phân ngẫu nhiên thành các nhóm mười con. Vaccin chứa

hạt replicon ARN của alphavirus biểu hiện kháng nguyên ngưng kết hồng cầu của chủng cúm lợn H3N2 được điều chế ở hiệu giá 1×10^8 RP/liều. Ngay trước khi chủng ngừa, vaccin dùng cho nhóm chỉ tiếp nhận RP, được pha loãng theo tỷ lệ 1:1 (v/v) với chất pha loãng PBS vô trùng, trong khi vaccin dùng cho nhóm hạt replicon ARN của alphavirus cộng tá chất được pha loãng theo tỷ lệ 1:1 (v/v) với tá chất XSolve. Huyết thanh từ gà được thử nghiệm về hiệu giá ức chế ngưng kết hồng cầu (hemagglutination inhibition: HI) vào các ngày nghiên cứu 0, 7, và 14 sau chủng ngừa.

Bảng 6: Tác dụng của tá chất dầu đến hiệu giá HI

Vaccin	Số con	Hiệu giá HI trung bình nhân		
		Ngày 0	Ngày 7	Ngày 14
Chỉ có RP	10	25	25	18
RP+tá chất dầu	10	25	35	55
Giả được	10	25	27	14

Việc thêm tá chất XSolve vào vaccin chứa hạt replicon ARN của alphavirus làm tăng rõ rệt hiệu giá HI của gà sau liều chủng ngừa duy nhất, ngược lại so với vaccin không tá chất và giả được.

Ví dụ 6

Tá chất dầu cải thiện hiệu quả ở gà của vaccin chứa hạt replicon ARN của alphavirus biểu hiện kháng nguyên IBDV

Thử nghiệm thử thách chủng ngừa này thử tác dụng của tá chất dầu đến hiệu quả chủng ngừa của RP biểu hiện kháng nguyên polypeptide VP2-4-3 từ virus gây bệnh Gumboro (IBDV) thuộc chủng Faragher 52/70. Các con thử nghiệm là gà SPF (không chứa tác nhân gây bệnh đặc hiệu) âm tính với kháng thể kháng IBDV. Kích thước nhóm là 5 hoặc 10 con. Chủng ngừa được thực hiện qua đường dưới da ở ngày tuổi (ngày nở); một nhóm (n=5) là nhóm đối chứng được chủng ngừa bằng nước muối đệm phosphate (PBS). Một nhóm chủng ngừa tiếp nhận vaccin RP trong dung dịch đệm chứa nước, Nhóm vaccin khác tiếp nhận vaccin RP trộn theo tỷ lệ 1:1 với tá chất XSolve. Ở 28 ngày sau chủng ngừa, tất cả các nhóm đều được gây nhiễm thử thách bằng chủng IBDV độc CS89, qua đường nhỏ mắt. Hiệu quả chủng ngừa được kiểm tra bằng mổ khám xác được thực hiện 10 ngày sau thử thách, tính điểm mô tử cho tổng tổn thương, và bằng mô bệnh học, theo theo các tiêu chuẩn đã biết rõ đối với bệnh nhiễm IBDV.

Bảng 7: Tác dụng của tá chất dầu đến hiệu quả chủng bằng RP chống lại thử thách IBDV nghiêm trọng

Nhóm	Vaxxin	Số con	% Bảo vệ	
			Trên cơ sở tổng tổn thương túi	Trên cơ sở tổn thương vi mô
1	RP- Polyprotein IBDV	10	0%	0%
2	RP- Polyprotein IBDV + XSolve	10	100%	100%
3	Giả dược	5	0%	0%

Rõ ràng, việc thêm tá chất dầu vào vaxxin RP có tác dụng tích cực đáng kể đến hiệu quả chủng ngừa đối với bệnh nhiễm trùng thử thách nghiêm trọng: cải thiện đáp ứng miễn dịch của gà từ không đến bảo vệ hoàn toàn.

Ví dụ 7

Tá chất dầu cũng cải thiện hiệu quả của vaxxin chứa hạt replicon ARN của alphavirus ở cá

Vaxxin chứa hạt replicon ARN của alphavirus biểu hiện protein capsit chính của virus gây bệnh ở cá tráp đỏ (red sea bream iridovirus: RSIV) được điều chế bằng các phương pháp chuẩn như được mô tả trong bản mô tả này. Cá rô phi được chủng ngừa qua đường trong cơ bằng 0,05 ml vaxxin, và tiếp theo được thử thách ở các lần khác nhau sau chủng ngừa. Ba mươi con trên mỗi nhóm điều trị và trên mỗi lần thử thách được sử dụng trong nghiên cứu này. Vaxxin chứa hạt replicon ARN của alphavirus được trộn theo tỷ lệ 1:1 (v/v) với PBS, hoặc với SVEA, tá chất kép phi khoáng, ngay trước khi chủng ngừa. Hiệu giá của RP trên mỗi nhóm điều trị là 1×10^7 RP/liều. Cá đối chứng được chủng ngừa bằng vaxxin giả dược.

Bảng 8A: Tác dụng của tá chất dầu đến phần trăm sống sót của cá rô phi

Nhóm điều trị vaxxin	Tỷ lệ phần trăm sống sót ở 14 ngày sau thử thách			
	Thử thách liều thấp ở 3 tuần	Thử thách liều cao ở 3 tuần	Thử thách liều thấp ở 6 tuần	Thử thách liều cao ở 6 tuần
RP-Irido không tá chất	77%	47%	83%	47%
RP-Irido với tá chất dầu	90%	43%	83%	70%
Đối chứng không chủng ngừa	43%	27%	67%	37%

Bảng 8B: Tác dụng của tá chất dầu đến phần trăm sống sót tương đối của cá rô phi

Nhóm điều trị vaccin	Phần trăm sống sót tương đối so với đối chứng			
	Thử thách liều thấp ở 3 tuần	Thử thách liều cao ở 3 tuần	Thử thách liều thấp ở 6 tuần	Thử thách liều cao ở 6 tuần
RP-Irido không tá chất	58,8	27,3	50,0	15,8
RP-Irido với tá chất dầu	82,4	22,7	50,0	52,6
Đối chứng không chủng ngừa	n/a	n/a	n/a	n/a

Trong cả thử thách “liều thấp ở 3 tuần” và thử thách “liều cao ở 6 tuần”, tá chất dầu đều cải thiện mạnh sự sống sót tương đối của cá được chủng ngừa bằng RP. Hai điều trị thử thách còn lại cho các kết quả tương đương. Do đó, vaccin RP ARN của alphavirus với tá chất có hiệu quả cao hơn đáng kể so với vaccin RP không tá chất, và mang lại hiệu quả chủng ngừa thậm chí chỉ với chủng ngừa một liều duy nhất.

Ví dụ 8

Hiệu quả của việc sử dụng đồng thời và cùng lúc RP và tá chất dầu

Thí nghiệm được thực hiện ở lợn, sử dụng vaccin NA của virus cúm lợn 4 thành phần chứa hạt replicon ARN của alphavirus, như được mô tả trong Ví dụ 3. Ví dụ này đóng vai trò minh họa hiệu quả của các kiểu sử dụng khác nhau đối với các thành phần vaccin: RP và tá chất dầu.

Vật liệu và phương pháp

Lợn được chủng ngừa ở xấp xỉ 4 và 7 tuần tuổi. Vaccin NA 4 thành phần là hỗn hợp gồm các cấu trúc RP N1 gen đúp, và N2 gen đúp, như được mô tả trong Ví dụ 3, mỗi cấu trúc được dùng ở xấp xỉ 2×10^6 RP/liều. Tất cả các nhóm đều chứa 4 con. Thiết kế quy trình thử nghiệm được thể hiện trong bảng 9. Nhóm 2 tiếp nhận các RP NA trộn với tá chất XSolve, một cách đồng thời.

Các nhóm 3 và 4 được thử tác dụng của việc sử dụng cùng lúc RP và tá chất dầu: các lần dùng cách nhau trong vòng khoảng 10 phút, và ở cùng bên cổ (cách nhau > 5 cm), hoặc ở các bên đối diện của cổ.

Một nhóm đối chứng, nhóm 5, được bao gồm sử dụng RP mã hóa kháng nguyên cúm lợn HA H1. RP này được dùng ở khoảng 1×10^7 RP/liều.

Huyết thanh được lấy ở ngày chủng ngừa lần một, ngày chủng ngừa lần hai, và ở

7 ngày sau chủng ngừa lần hai. Các huyết thanh này được kiểm tra bằng các thử nghiệm NI tương đồng riêng rẽ đối với mỗi một trong 4 typ NA.

Hiệu giá NI đo được được thể hiện trên Fig. 5 và 6, nhờ đó Fig. 5 thể hiện hiệu giá NI đối với kháng nguyên NA lớp N1 tại ba thời điểm được đo theo thời gian, bao gồm độ lệch chuẩn. Fig. 6 thể hiện hiệu giá NI trung bình nhóm của 4 typ NA kết hợp, ở 7 ngày sau chủng ngừa lần hai.

Bảng 9: Quy trình thí nghiệm của ví dụ 8

Nhóm	RP	Tá chất	Dùng
1	4 thành phần NA của SIV	Không	Tiêm IM, liều 1 ml
2		Xsolve	Trộn và tiêm IM, liều 1 ml
3			Tiêm RP và tá chất dầu riêng rẽ: mỗi loại 0,5 ml, tiêm IM, cùng bên cổ
4			Tiêm RP và tá chất riêng rẽ: mỗi loại 0,5 ml, tiêm IM, các bên đối diện của cổ
5	SIV HA H1	Không	Trộn và tiêm IM, liều 1 ml

Kết quả và kết luận

Từ các kết quả đo được trong Ví dụ 8, một vài tác dụng có thể ghi nhận được:

- Các mẫu hình hiệu giá NI đối với 4 typ NA tại ba thời điểm đo là hầu như giống nhau, do đó các kết quả trình bày trên Fig. 5 của NA N1 có điển biểu thị các mẫu hình hiệu giá chống lại 3 typ NA còn lại.
- Tương tự, các mẫu hình đáp ứng hiệu giá NI đối với 4 typ NA ở 7 dpv2, như được trình bày trên Fig. 6 phần lớn là giống nhau.
- Kết quả hiệu giá NI của đối chứng HA H1 RP (nhóm 5) như dự tính không tạo ra hiệu giá NI; điều này thiết lập ngưỡng hiệu giá đối với đáp ứng đặc hiệu.
- Ngoại trừ sai số thực nghiệm nhất định, hầu hết hiệu giá NI trong các nhóm 2 - 4, tiếp nhận RP và tá chất dầu, là cao hơn đáng kể so với hiệu giá NI của nhóm chỉ tiếp nhận RP (nhóm 1). Điều này minh họa rằng tá chất dầu tăng cường mạnh mẽ việc gây miễn dịch bằng RP.
- Nhóm tiếp nhận RP và tá chất dầu một cách đồng thời (nhóm 2), xác nhận tác dụng mạnh của tá chất dầu đã ghi nhận được trong Ví dụ trước đó.
- Tác dụng gây miễn dịch của sử dụng cùng lúc RP và của tá chất dầu (các nhóm 3 - 4) rất gần với tác dụng gây miễn dịch của sử dụng đồng thời: sự kích thích

mạnh đáp ứng miễn dịch của RP. Không có tác dụng rõ ràng về sự khác biệt ở vị trí dùng.

Sáng chế không bị giới hạn phạm vi bởi các phương án cụ thể được mô tả trong bản mô tả này. Thực vậy, các cải biến khác nhau theo sáng chế ngoài các cải biến được mô tả trong bản mô tả này sẽ trở nên hiển nhiên đối với chuyên gia trong lĩnh vực này nhờ phần mô tả trên đây. Các cải biến như vậy được dự tính nằm trong phạm vi của yêu cầu bảo hộ kèm theo.

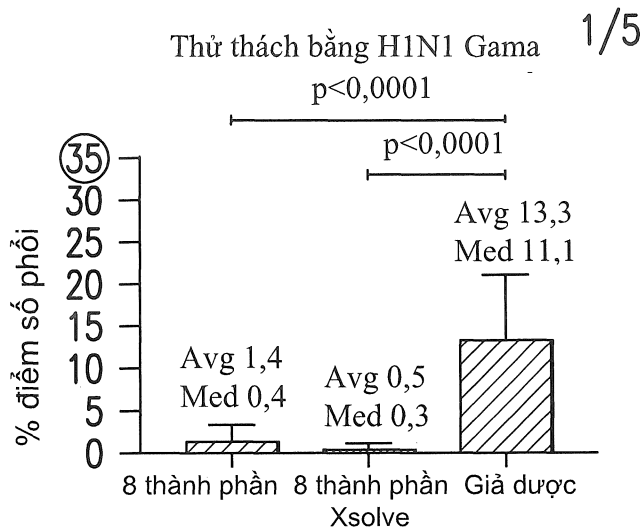
Cũng cần lưu ý rằng tất cả các kích thước bazơ hoặc kích thước axit amin, và tất cả các giá trị trọng lượng phân tử hoặc khối lượng phân tử, dùng cho axit nucleic hoặc polypeptit là xấp xỉ, và được đưa ra để mô tả.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Vacxin bao gồm hạt replicon ARN của alphavirus mã hóa kháng nguyên có nguồn gốc từ tác nhân gây bệnh ở động vật, trong đó vacxin còn bao gồm tá chất dầu bao gồm dầu khoáng và dầu phi khoáng, trong đó dầu khoáng là dầu parafin lỏng và trong đó dầu phi khoáng là vitamin E-axetat.
2. Vacxin theo điểm 1, trong đó lượng dầu khoáng trong tá chất dầu là 1 - 70% v/v tá chất dầu.
3. Vacxin theo điểm 1 hoặc 2, trong đó tổng lượng dầu phi khoáng trong tá chất dầu là 0,1 - 30% w/v tá chất dầu.
4. Vacxin theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1-3, trong đó tá chất dầu được điều chế dưới dạng nhũ tương dầu trong nước.
5. Vacxin theo điểm 4, trong đó nhũ tương dầu trong nước là nhũ tương có kích thước submicron.
6. Vacxin theo điểm 4, trong đó nhũ tương của tá chất dầu bao gồm chất nhũ hóa.
7. Vacxin theo điểm 6, trong đó chất nhũ hóa bao gồm Polysorbate.
8. Vacxin theo điểm 7, trong đó Polysorbate là polyoxyetylen sorbitan mono-oleat.
9. Vacxin theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1-8, trong đó hạt replicon ARN của alphavirus là hạt replicon ARN của alphavirus gây bệnh viêm não ngựa Venezuela (VEE).
10. Vacxin theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1-9, trong đó tác nhân gây bệnh ở động vật là tác nhân gây bệnh ở động vật được chọn từ nhóm bao gồm cá, chim và động vật có vú.
11. Vacxin theo điểm 10, trong đó động vật có vú là lợn.
12. Vacxin theo điểm 10, trong đó chim là gà hoặc gà tây.
13. Vacxin theo điểm 10, trong đó cá là thành viên của họ Cichlidae.
14. Kit bao gồm ít nhất hai vật chứa, trong đó ít nhất một vật chứa bao gồm hạt replicon ARN của alphavirus gây bệnh viêm não ngựa Venezuela (VEE) mã hóa kháng nguyên có nguồn gốc từ tác nhân gây bệnh ở động vật, và ít nhất một vật chứa bao gồm tá chất dầu bao gồm dầu khoáng và dầu phi khoáng, trong đó dầu khoáng là dầu parafin lỏng và trong đó dầu phi khoáng là vitamin E-axetat.

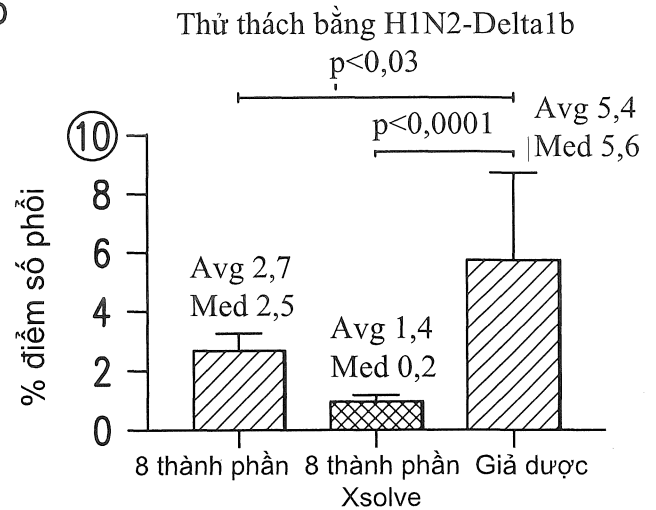
DANH MỤC TRÌNH TỰ

- <110> Intervet Inc.
Intervet International BV
Mogler, Mark
Strait, Erin
Segers, Ruud
- <120> VAXIN BAO GỒM HẠT REPLICON VÀ TÁ CHẤT DẦU
- <130> 24651
- <160> 2
- <170> PatentIn phiên bản 3.5
- <210> 1
<211> 13
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
- <220>
<223> mỗi
- <400> 1
ggcgcgccgc acc
13
- <210> 2
<211> 8
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
- <220>
<223> trình tự kể đầu 3'
- <400> 2
ttaattaa
8



Tổn thương phổi

FIG. 1A



Tổn thương phổi

FIG. 1B

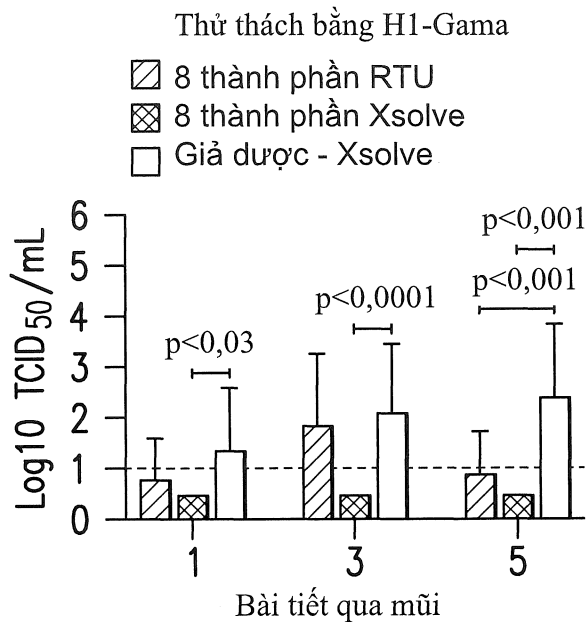


FIG. 1C

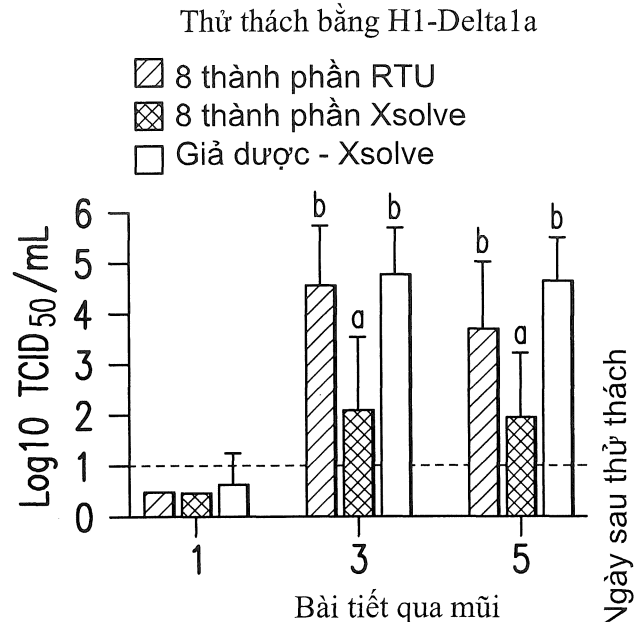
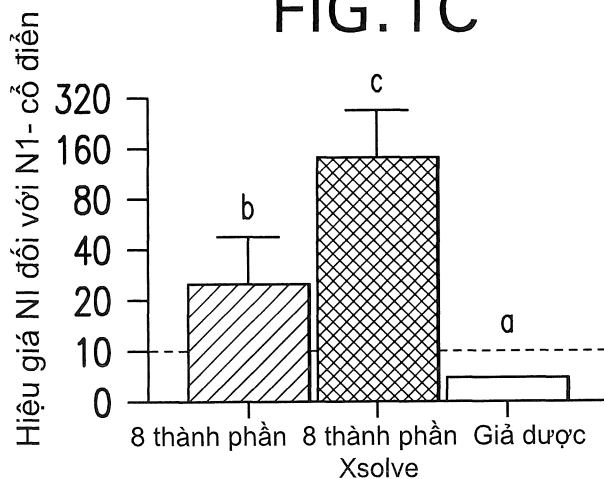
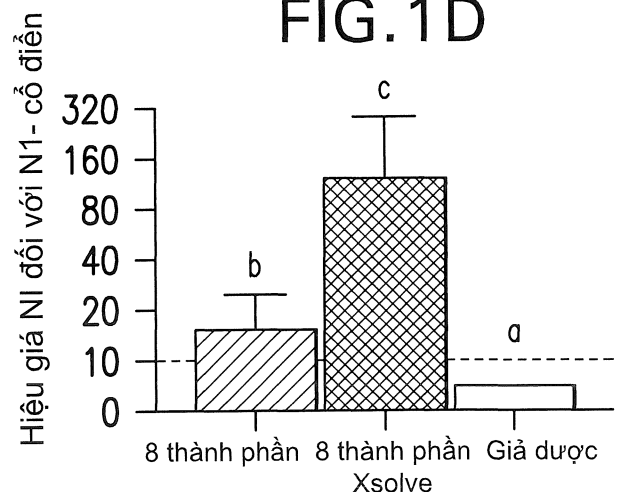


FIG. 1D



Hiệu giá NI

FIG. 1E



Hiệu giá NI

FIG. 1F

Avg: Trung bình
Med: Trung vị

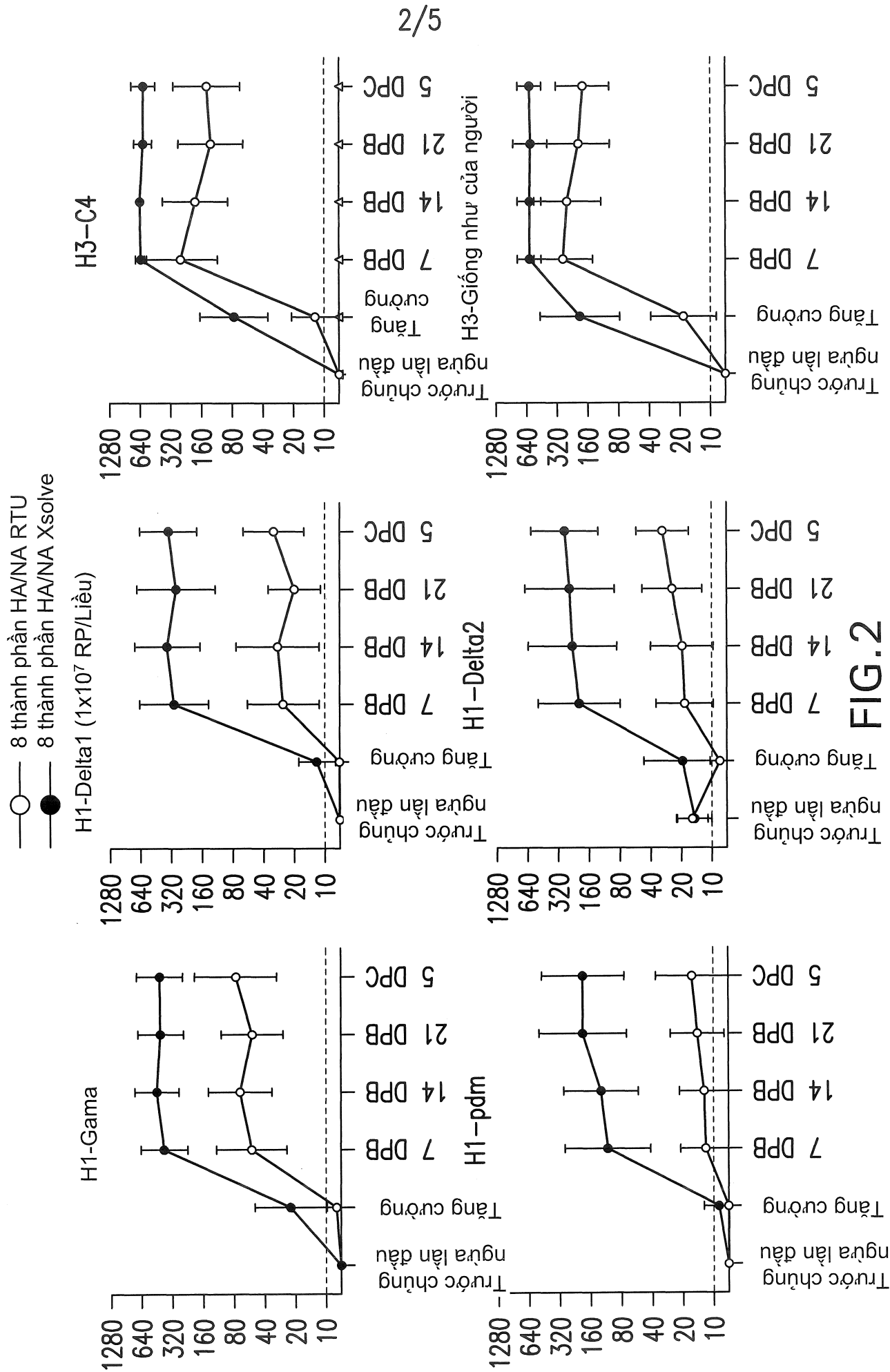


FIG.2

3/5

Hiệu giá NI đối với protein RP N1 - cổ điển

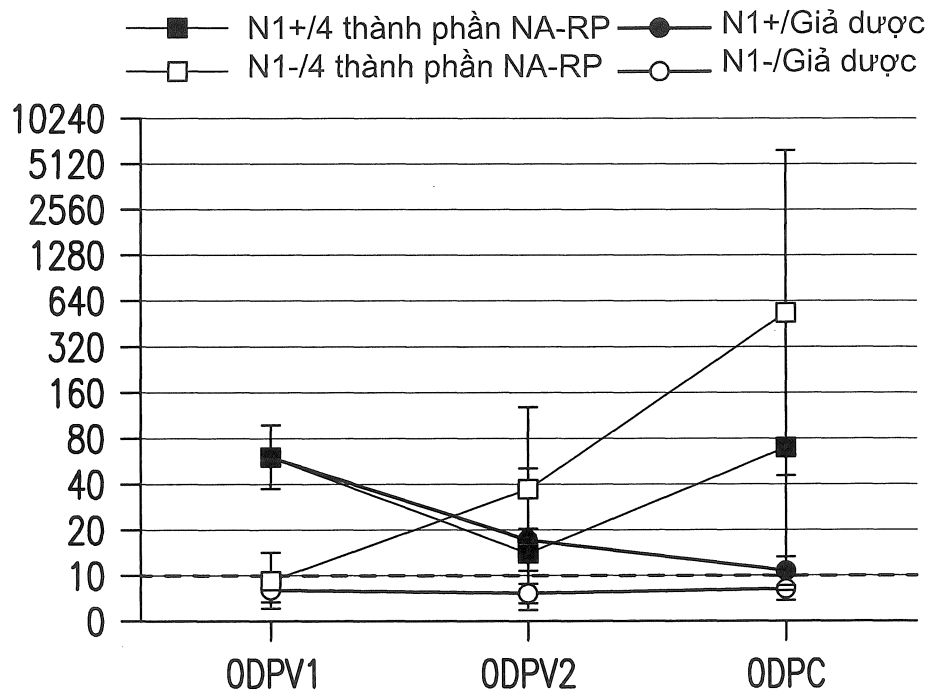


FIG.3

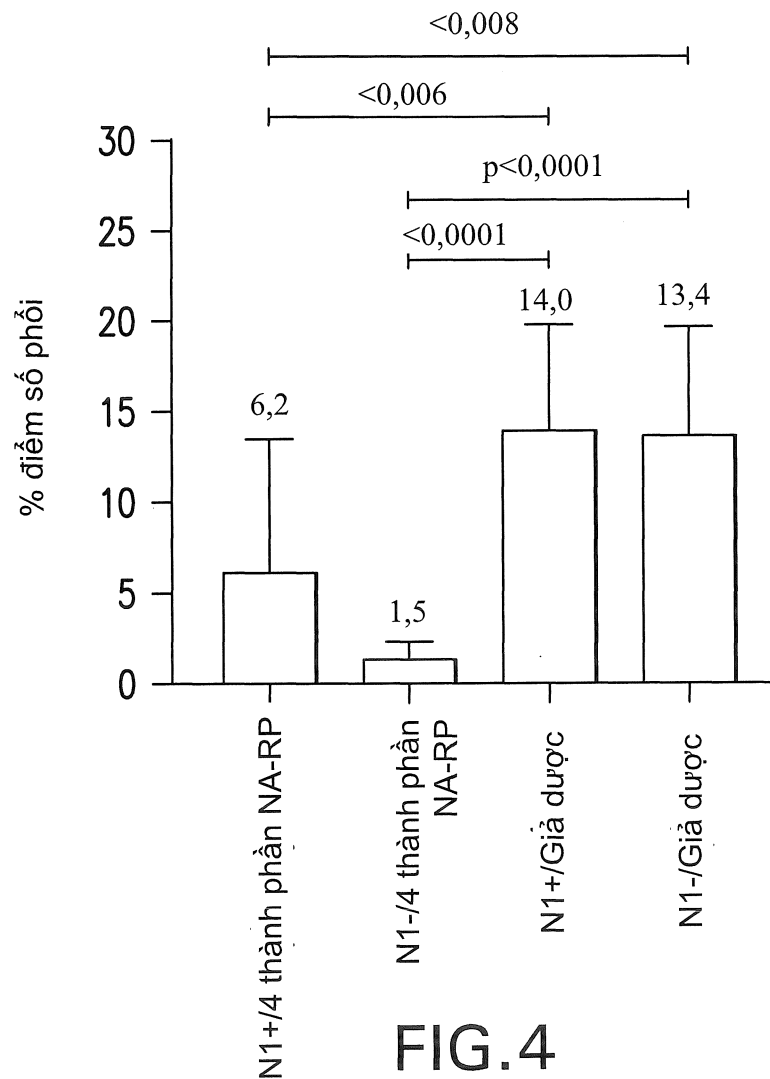


FIG.4

4/5

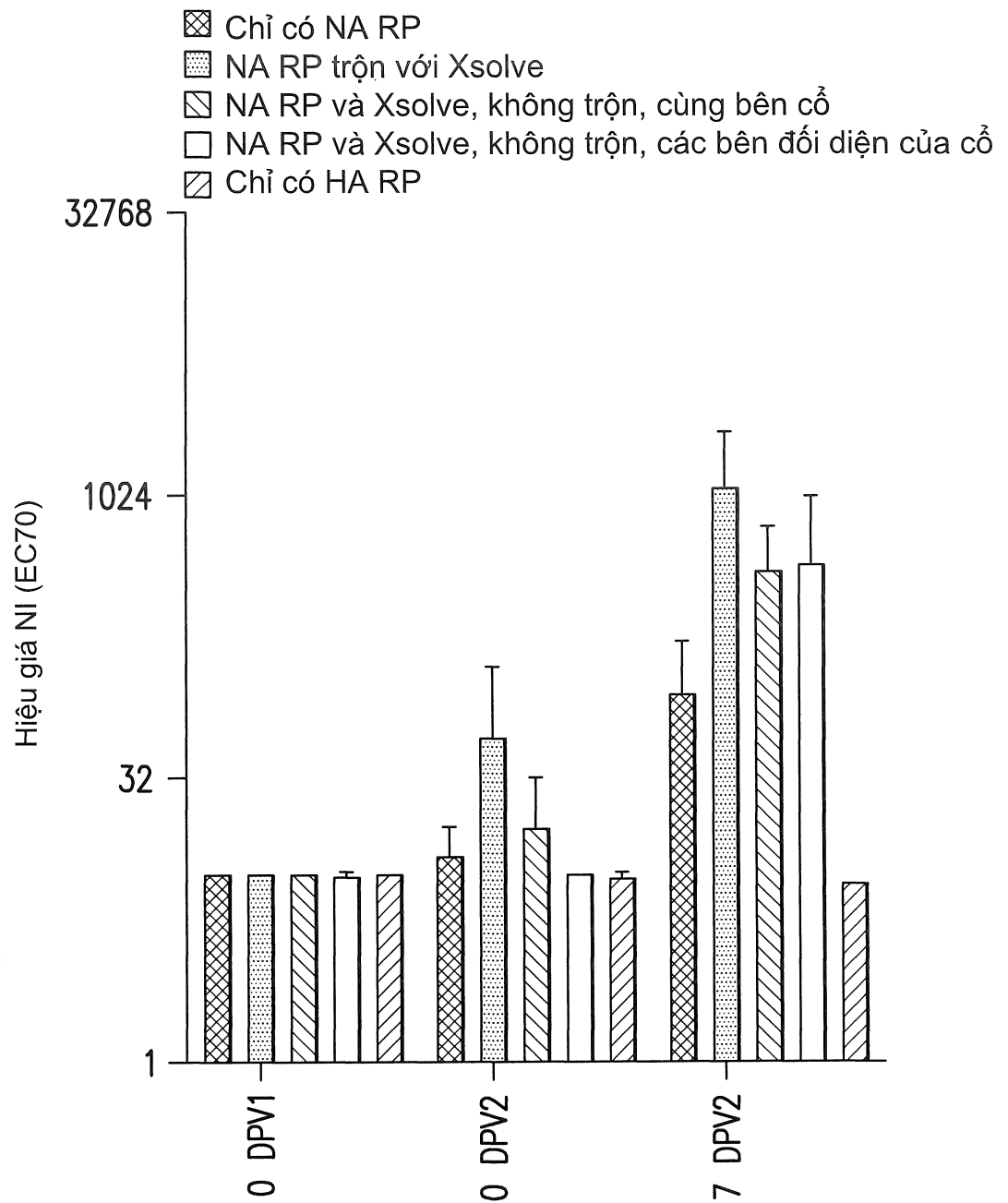


FIG.5

5/5

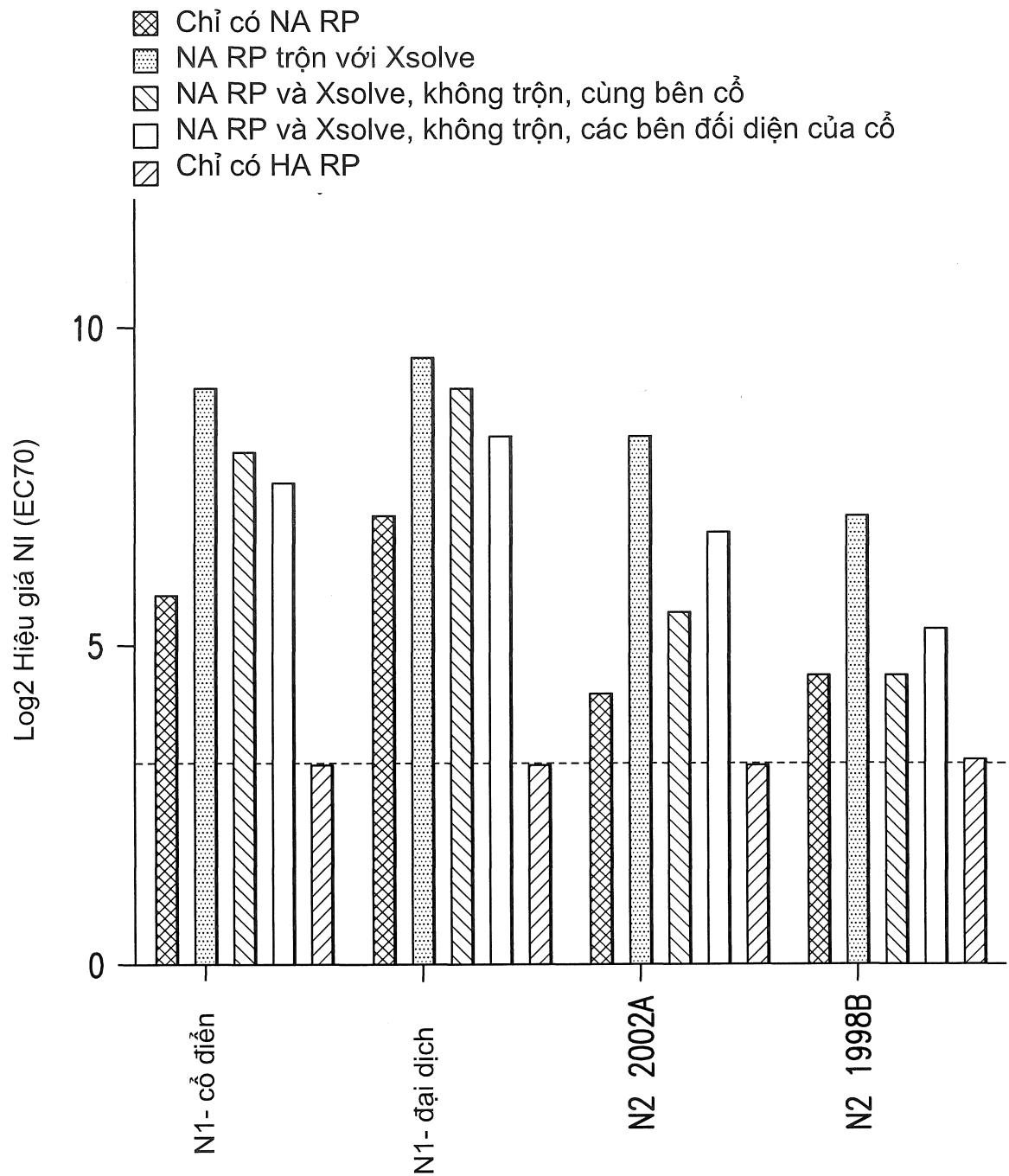


FIG.6