



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

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

(11)



1-0052994

(51)^{2020.01} A61K 39/215; A61K 38/16; A61K
39/00; C12N 15/82; A61P 31/14; C07K
14/005; A23K 20/147

(13) B

(21) 1-2021-05318

(22) 13/04/2020

(86) PCT/KR2020/004954 13/04/2020

(87) WO2020/213898 22/10/2020

(30) 10-2019-0044008 16/04/2019 KR

(45) 25/11/2025 452

(43) 25/01/2022 406A

(73) BIOAPPLICATIONS INC. (KR)

(Jigok-dong, Pohang Technopark) 394, Jigok-ro, Nam-gu, Pohang-Si,
Gyeongsangbuk-do 37668, Republic of Korea

(72) SOHN, Eun-Ju (KR); LEE, Yong Jik (KR).

(74) Công ty TNHH Trường Xuân (AGELESS CO.,LTD.)

(54) CHẾ PHẨM VACXIN VIRUT GÂY DỊCH TIÊU CHẢY CẤP Ở LỢN, CHẾ PHẨM
THỨC ĂN CHĂN NUÔI, VECTƠ BIỂU HIỆN PROTEIN VIRUT NÀY, THỂ
BIẾN NẠP ĐƯỢC BIẾN NẠP VECTƠ NÀY, VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT
PROTEIN VIRUT NÀY

(21) 1-2021-05318

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm vaccin virus gây dịch tiêu chảy cấp ở lợn chứa protein của virus gây dịch tiêu chảy cấp ở lợn có trình tự axit amin thể hiện bởi SEQ ID NO:5, chế phẩm thức ăn chăn nuôi để phòng ngừa hoặc điều trị dịch tiêu chảy cấp ở lợn chứa protein của virus gây dịch tiêu chảy cấp ở lợn, vector để biểu hiện protein của virus gây dịch tiêu chảy cấp ở lợn, thể biến nạp được biến nạp vector, và phương pháp sản xuất protein của virus gây dịch tiêu chảy cấp ở lợn.

FIG. 4

Huyết thanh		Trước	Sau	Trước	Sau
NC đối chứng âm	1	0,08	0,09		
	2	0,10	0,10		
	3	0,08	0,11		
	4	0,10	0,11		
	5	0,11	0,09		
PC đối chứng dương	6	0,07	1,31		
	7	0,09	0,49		
	8	0,07	2,04		
	9	0,08	0,79		
	10	0,09	2,20		
dùng PEDV-S1:pFc2	11	0,09	3,05		
	12	0,08	2,06		
	13	0,06	3,03		
	14	0,06	2,88		
	15	0,07	2,19		

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chế phẩm vaccin virus gây dịch tiêu chảy cấp ở lợn chứa protein S1 của virus gây dịch tiêu chảy cấp ở lợn có trình tự axit amin thể hiện bởi SEQ ID NO: 5 làm hoạt chất, và tương tự.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Dịch tiêu chảy cấp ở lợn (porcine epidemic diarrhea - PED) là bệnh đường ruột ở lợn gây tử vong và rất dễ lây lan, đặc trưng bởi tiêu chảy cấp, nôn mửa và mất nước, và gây ra tỷ lệ chết cao ở lợn con sơ sinh. Bệnh này được báo cáo lần đầu tiên ở Anh vào năm 1971, và đã lây lan nhanh chóng khắp châu Âu, và được cho là đã lây lan sang lục địa châu Á vào những năm 1980. Virus tương tự virus corona ban đầu được chỉ định là CV777 đã được xác định là tác nhân gây bệnh ở Bỉ vào năm 1978.

Để ngăn ngừa bệnh PED này, đang xuất hiện nhu cầu phát triển một loại vaccin tiểu đơn vị như là chiến lược an toàn hơn, kinh tế hơn, và tác động nhanh hơn khi bệnh khởi phát. Vaccin tiểu đơn vị được sử dụng làm protein kháng nguyên của vaccin bằng cách sản xuất hàng loạt protein cấu trúc hoặc phi cấu trúc với tính kháng nguyên đã biết, cấu thành vi sinh vật gây bệnh, ở vi sinh vật tái tổ hợp (*E. coli* hoặc hệ biểu hiện khác).

Ở Hàn Quốc, vaccin PED sống giảm độc lực thường được sử dụng, nhưng vấn đề lớn nhất của vaccin này là, mặc dù được làm giảm độc lực nhưng virus vẫn sống, vì vậy chúng phục hồi độc tính và trở thành mầm bệnh, và do đó, có thể có vấn đề về độ an toàn. Ngoài ra, trong quá trình phát triển vaccin, đối với quá trình làm giảm độc lực, cần một thời gian tương đối dài để nuôi cấy cấp hai 100 lần trên tế bào động vật, do đó khó có thể đáp ứng nhanh với các loại virus có tốc độ đột biến cao và chi phí cho việc phát triển vaccin cũng tương đối cao vì sử dụng phương pháp nuôi cấy tế bào động vật.

Trong khi đó, các loại vaccin để phòng ngừa bệnh này thường được sản xuất bằng cách sử dụng tế bào động vật, thay vì vi khuẩn do quá trình gấp cuộn của protein hoặc glycosyl hóa. Tuy nhiên, do phương pháp sản xuất vaccin sử dụng tế bào động vật

cần chi phí lớn để mở rộng cơ sở vật chất để sản xuất hàng loạt, nên việc sản xuất vacxin không dễ dàng, và hầu hết vacxin đều đắt tiền. Ngoài ra, vacxin virus bất hoạt được sản xuất bằng cách sử dụng tế bào động vật không chỉ khó bảo quản, mà còn có nhược điểm là rất dễ bị nhiễm virus có thể lây nhiễm cho động vật. Tuy nhiên, không giống như tế bào động vật, vì tế bào thực vật có khả năng bị nhiễm virus có thể lây nhiễm cho động vật rất thấp, nên có thể được sản xuất hàng loạt bất cứ lúc nào miễn là khu vực nuôi cấy được bảo đảm, và được bảo quản lâu dài trong cơ thể thực vật, người ta mong đợi rằng có thể sản xuất vacxin ổn định và rẻ tiền.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế được tạo ra để giải quyết các vấn đề nêu trên, và hướng đến việc tạo ra protein virus PED tái tổ hợp mà không chỉ cho phép được sản xuất hiệu quả bằng cách sử dụng thực vật, mà còn thể hiện khả năng sinh miễn dịch và khả năng trung hòa virus cao, chế phẩm vacxin chứa protein này, và phương pháp điều chế protein này.

Tuy nhiên, các vấn đề kỹ thuật cần giải quyết trong sáng chế không chỉ giới hạn ở các vấn đề được mô tả ở trên, và cả các vấn đề khác không được mô tả ở đây sẽ được những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này hiểu đầy đủ từ phần mô tả sau đây.

Sáng chế đề xuất chế phẩm vacxin virus PED, chứa protein virus PED có trình tự axit amin thể hiện bởi SEQ ID NO: 5 làm hoạt chất. Protein virus PED này cũng có thể bao gồm trình tự tương đương về chức năng của trình tự axit amin thể hiện bởi SEQ ID NO: 5 trong phạm vi của sáng chế, và trình tự tương đương về chức năng này được dùng để chỉ polypeptit có độ tương đồng trình tự ít nhất 60% trở lên, tốt hơn là 70% trở lên, tốt hơn nữa là 80% trở lên, và tốt nhất là 90% trở lên với trình tự axit amin như làm kết quả của thêm, thay thế hoặc loại bỏ axit amin, và thể hiện hoạt tính về cơ bản giống như trình tự axit amin thể hiện bởi SEQ ID NO: 5, và miễn là nó là trình tự axit amin của protein virus PED mà có thể được sản xuất ổn định bằng cách sử dụng cơ thể thực vật, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất thực phẩm để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh PED, có chứa protein virus PED làm hoạt chất.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất phương pháp phòng ngừa hoặc điều trị bệnh PED bằng cách dùng protein virus PED cho cá thể.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất việc sử dụng protein virus PED để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh PED.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất việc sử dụng protein virus PED để điều chế vaccin hoặc thuốc PED.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất vector để biểu hiện protein virus PED, chứa polynucleotit mã hóa trình tự axit amin thể hiện bởi SEQ ID NO: 5. Tốt hơn là, polynucleotit này là trình tự polynucleotit thể hiện bởi SEQ ID NO: 1.

Theo một phương án của sáng chế, trong vector, gen vùng khởi động và polynucleotit mã hóa trình tự axit amin thể hiện bởi SEQ ID NO: 5 có thể thực hiện liên kết tuần tự được.

Theo phương án khác của sáng chế, vector có thể có cấu trúc được thể hiện trong FIG. 1, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Theo phương án khác nữa của sáng chế, vector có thể còn chứa gen mã hóa một hoặc nhiều peptit được chọn từ nhóm bao gồm peptit tín hiệu lưới nội chất (*endoplasmic reticulum* - ER), mảnh Fc và protein gắn kết chaperon (chaperone binding protein - BiP), nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Theo phương án khác nữa của sáng chế, peptit tín hiệu ER có thể là peptit được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự peptit thể hiện bởi KDEL, HDEL, SEKDEL, KHEDL, KEEL, và SEHEDL, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Theo phương án khác nữa của sáng chế, vùng khởi động có thể là vùng khởi động 35S có nguồn gốc từ virus khảm súp lơ, vùng khởi động ARN 19S có nguồn gốc từ virus khảm súp lơ, vùng khởi động protein actin ở thực vật, vùng khởi động protein ubiquitin, vùng khởi động virus cự bào (*cytomegalovirus* - CMV), vùng khởi động virus simian 40 (simian virus 40 - SV40), vùng khởi động virus hợp bào hô hấp (respiratory syncytial virus - RSV), vùng khởi động nhân tố kéo dài 1 alpha (elongation factor-1 alpha - EF-1 α), vùng khởi động pEMU, vùng khởi động MAS, vùng khởi động histon, hoặc vùng khởi động Clp, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Theo phương án khác nữa của sáng chế, vector biểu hiện tái tổ hợp có thể còn bao gồm polynucleotit mã hóa protein gắn kết chaperon, gen mã hóa peptit His-Asp-Glu-Leu (HDEL), và gen mã hóa mảnh Fc globulin miễn dịch miễn dịch ở lợn.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất thể biến nạp được biến nạp vector.

Theo một phương án của sáng chế, tốt hơn là thể biến nạp là vi sinh vật như *E. coli*, *Bacillus*, *Salmonella* hoặc nấm men, tế bào côn trùng, tế bào động vật bao gồm tế bào người, động vật như chuột nhà, chuột cống, chó, khỉ, lợn, ngựa hoặc bò, *Agrobacterium tumefaciens*, hoặc thực vật, và tốt hơn nữa là cây lương thực như lúa gạo, lúa mì, lúa mạch, ngô, đậu, khoai tây, đậu đỏ, yến mạch hoặc lúa miến; cây rau như *Arabidopsis*, cải thảo, củ cải, ớt đỏ, dâu tây, cà chua, dưa hấu, dưa chuột, bắp cải, dưa tây, bí đỏ, hành lá, hành tây, hoặc cà rốt; cây trồng đặc sản như nhân sâm, thuốc lá, bông, vùng, mía, củ cải đường, tía tô, đậu phộng hoặc hạt cải; cây ăn quả như cây táo, cây lê, cây chà là, đào, nho, quýt, hồng, mận, mơ hoặc chuối; và hoa chẳng hạn như hoa hồng, hoa cẩm chướng, hoa cúc, hoa huệ tây, hoặc hoa tulip, nhưng miễn là thể biến nạp là sinh vật có thể được biến nạp vector của sáng chế, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất protein virus PED, bao gồm các bước: (a) nuôi thể biến nạp; và (b) phân lập và tinh sạch protein virus PED từ thể biến nạp hoặc dung dịch nuôi. Thể biến nạp tốt hơn là chính tế bào của nó, cơ thể thực vật hoặc sản phẩm được nuôi bao gồm tế bào, và dung dịch nuôi tốt hơn là dung dịch nuôi từ tế bào được loại bỏ sau khi nuôi tế bào. Miễn là dung dịch nuôi bao gồm kháng nguyên tái tổ hợp của sáng chế, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Theo một phương án của sáng chế, quá trình tinh sạch của bước (b) có thể là quá trình tinh sạch bằng cách sử dụng phân đoạn ở thể nước, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Protein S1 của virus PED tái tổ hợp của sáng chế không chỉ thể hiện hiệu quả ở cơ thể thực vật, mà còn có độ hòa tan trong nước cao, dễ dàng phân lập và tinh chế, và hoạt động như kháng nguyên trong cơ thể, do đó thể hiện khả năng sinh miễn dịch và khả năng trung hòa virus cao. Vì vậy, protein S1 của virus PED tái tổ hợp được mong

đội sẽ được sử dụng rộng rãi trong các lĩnh vực khác nhau. Ngoài ra, do khả năng sinh miễn dịch và khả năng trung hòa virus đáng kể trong cơ thể, protein S1 của virus PED tái tổ hợp có thể được sử dụng làm chế phẩm vắc xin PED mới.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG. 1 thể hiện sự sắp xếp của các gen để biểu hiện protein S1 của virus PED (PED virus S1 - PEDV-S1) ở cơ thể thực vật theo một phương án của sáng chế.

FIG. 2 thể hiện kết quả xác nhận sự biểu hiện của protein PEDV S1 ở cơ thể thực vật thông qua phương pháp western blotting theo một phương án của sáng chế.

FIG. 3 thể hiện kết quả phân lập và tinh sạch protein PEDV S1 theo một phương án của sáng chế.

FIG. 4 thể hiện kết quả xác nhận khả năng sinh miễn dịch sau khi kháng thể của protein PEDV S1 tái tổ hợp được dùng 2 lần theo một phương án của sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo sáng chế, bằng cách sử dụng gen của protein virus PED thể hiện bởi SEQ ID NO: 1, đã xác nhận rằng protein virus PED có khả năng sinh miễn dịch cao trong cơ thể thực vật có thể được sản xuất và phân lập hiệu quả. Theo đó, vì protein virus PED của sáng chế có thể được sản xuất hàng loạt một cách ổn định và hiệu quả, nên nó được kỳ vọng sẽ cung cấp vắc xin PED rẻ tiền và ổn định.

Thuật ngữ “kháng nguyên” được sử dụng ở đây là thuật ngữ chung cho tất cả các vật liệu gây ra phản ứng miễn dịch trong cơ thể, và tốt hơn là virus, hóa chất, vi khuẩn, phấn hoa, tế bào ung thư, tôm, hoặc peptit một phần hoặc protein của chúng, và miễn là vật liệu này là bất kỳ vật liệu nào có thể gây ra phản ứng miễn dịch trong cơ thể, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Thuật ngữ “virus gây dịch tiêu chảy cấp ở lợn (porcine epidemic diarrhea - PED)” được sử dụng ở đây thuộc họ *Coronaviridae*, và có ARN mạch đơn là hệ gen, chiều dài khoảng 28 Kb, và mã hóa 3 loại protein cấu thành chính, như protein gai, protein màng hoặc vỏ, và protein nucleocapsid. Thuật ngữ “protein vỏ” được sử dụng ở đây là protein cấu thành chính của virus PED, và có chức năng sinh học quan trọng trong việc nhận biết tế bào đích và dung hợp màng tế bào với virus. Gen một phần của protein gai có thể

được sử dụng làm thể quyết định kháng nguyên giảm độc lực (epitop trung hòa), và trong quá trình trưởng thành, protein gai thường được phân cắt thành tiểu đơn vị gắn kết thụ thể S1 và tiểu đơn vị gắn kết màng S2. Cụ thể là, miền S1 của protein S có thể chứa miền gắn kết thụ thể (receptor-binding domain - RBD) làm trung gian gắn kết đặc hiệu với thụ thể tế bào.

Thuật ngữ “vacxin” được sử dụng ở đây là tác nhân sinh học chứa kháng nguyên gây ra phản ứng miễn dịch đối với cơ thể sống, và dùng để chỉ chất sinh miễn dịch tạo ra khả năng miễn dịch trong cơ thể sống bằng đường tiêm hoặc uống vào người hoặc động vật để phòng ngừa bệnh truyền nhiễm. Động vật là người hoặc động vật không phải người, và động vật không phải người là lợn, bò, ngựa, chó, dê hoặc cừu, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Thuật ngữ “vector biểu hiện” được sử dụng ở đây để chỉ vector có thể biểu hiện peptit hoặc protein được mã hóa bởi axit nucleic khác loại được chèn vào vector, và tốt hơn là, vector được sản xuất để biểu hiện kháng nguyên đích được dung hợp mảnh Fc ở lợn (theo sáng chế, protein virus PED). Thuật ngữ “vector” dùng để chỉ bất kỳ phương tiện nào để đưa và/hoặc chuyển bazơ vài tế bào chủ *in vitro*, *ex vivo* hoặc *in vivo*, và có thể là đơn vị sao chép mà đoạn ADN khác được liên kết vào để cảm ứng quá trình sao chép của đoạn liên kết, và thuật ngữ “đơn vị sao chép” là đơn vị di truyền (ví dụ, plasmid, thực khuẩn thể, cosmid, nhiễm sắc thể, hoặc virus) đóng vai trò là đơn vị tự sao chép ADN *in vivo*, nghĩa là có thể sao chép bằng cách tự điều khiển. Vector biểu hiện tái tổ hợp của sáng chế tốt hơn là chứa vùng khởi động, là yếu tố khởi đầu phiên mã mà ARN polymeraza bám vào, trình tự gen chỉ huy tùy chọn để điều hòa quá trình phiên mã, trình tự mã hóa vị trí bám mRNA ribosom thích hợp và trình tự điều hòa kết thúc quá trình phiên mã và dịch mã, và nhân tố kết thúc, tốt hơn là, còn chứa gen vị trí M17 5' UTR để làm tăng mức độ tổng hợp protein, gen BiP để chuyển protein đích đến ER, mảnh Fc làm tăng mức độ biểu hiện và độ tan của protein đích, gen của peptit tín hiệu ER (cùng nghĩa với trình tự nhắm ER) làm giảm thiểu sự phân hủy của protein để protein được duy trì ổn định trong ER, và vị trí tách dòng, và tốt hơn nữa là, còn chứa gen tag để dễ dàng phân lập protein tái tổ hợp, và gen chỉ thị để chọn lọc gen kháng kháng sinh để chọn lọc thể biến nạp.

Thuật ngữ “protein virus PED” được sử dụng ở đây có thể chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 5, và tốt hơn là, được thể hiện bởi trình tự axit amin SEQ ID NO: 5. Theo một phương án của sáng chế, do có độ tan cao, protein virus PED dễ dàng được phân lập và tinh sạch, ức chế sự quản tụ của protein tái tổ hợp, và do đó có hiệu quả để duy trì hoạt tính sinh lý hoặc được lý của protein tái tổ hợp.

Ngoài ra, protein của sáng chế có thể được mã hóa bởi trình tự bazơ của gen thể hiện bởi SEQ ID NO: 1. Ngoài ra, biến thể gen được bao gồm trong phạm vi của sáng chế. Cụ thể là, gen có thể chứa trình tự bazơ có độ tương đồng trình tự 70% trở lên, tốt hơn nữa là, 80% trở lên, và tốt nhất là, 90% trở lên với trình tự bazơ SEQ ID NO: 1. Ví dụ, protein của sáng chế chứa polynucleotit có độ tương đồng trình tự 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100%.

Thuật ngữ “gen BiP” là một phần của trình tự BiP được sử dụng để di chuyển protein tái tổ hợp được biểu hiện đến ER, và tốt hơn là gen chứa trình tự bazơ SEQ ID NO: 2, và tốt nhất là gen thể hiện bởi SEQ ID NO: 2, và có chứa trình tự bazơ có độ tương đồng trình tự 80% trở lên, tốt hơn nữa là, 90% trở lên, và tốt hơn nữa là 95% trở lên với trình tự bazơ SEQ ID NO: 2. Thuật ngữ “% tương đồng trình tự” so với polynucleotit được xác định bằng cách so sánh vùng so sánh với trình tự được sắp thẳng tối ưu, và trong vùng so sánh, một phần của trình tự polynucleotit có thể bao gồm sự thêm hoặc bớt (nghĩa là khoảng trống) so với trình tự tham chiếu (không có sự thêm hoặc bớt) để có sự sắp thẳng tối ưu của trình tự. Thuật ngữ “gen BIP” được sử dụng để di chuyển protein tái tổ hợp được biểu hiện đến ER, và có thể chỉ có một số axit amin còn lại sau khi một phần của trình tự được loại bỏ sau khi được biểu hiện.

Thuật ngữ “peptit tín hiệu ER” dùng để chỉ trình tự axit amin cho phép protein được nhận dạng bởi hạt nhận dạng tín hiệu trên ER để chuyển vị trí vào khoang ER. Theo sáng chế, không có giới hạn về loại và trình tự axit amin của peptit tín hiệu ER, miễn là nó là peptit tín hiệu ER ở thực vật được biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, và ví dụ về peptit tín hiệu ER trong các tài liệu được bộc lộ trong US 20130295065 và WO2009158716 có thể được tham khảo. Theo sáng chế, “peptit tín hiệu ER” tốt hơn là bất kỳ polypeptit được chọn từ nhóm bao gồm KDEL (SEQ ID NO: 6), HDEL (SEQ ID NO: 7), SEKDEL (SEQ ID NO: 8), KHEDL (SEQ ID NO: 9), KEEL

(SEQ ID NO: 10), và SEHEDL (SEQ ID NO: 11), và tốt nhất là, polypeptit thể hiện bởi HDEL (His-Asp-Glu-Leu, SEQ ID NO: 7), và được mã hóa bởi SEQ ID NO: 4. Ngoài ra, như là peptit tín hiệu ER của sáng chế, biến thể của SEQ ID NO: 4 được bao gồm trong phạm vi của sáng chế. Cụ thể là, gen chứa trình tự bazơ có độ tương đồng trình tự tốt hơn là 90% trở lên, tốt hơn nữa là, 95% trở lên, và tốt nhất là 98% trở lên với trình tự bazơ SEQ ID NO: 4. Thuật ngữ “% tương đồng trình tự” so với polynucleotit được xác định bằng cách so sánh vùng so sánh với trình tự được sắp thẳng tối ưu, và trong vùng so sánh, một phần của trình tự polynucleotit có thể bao gồm sự thêm hoặc bớt (nghĩa là khoảng trống) so với trình tự tham chiếu (không có sự thêm hoặc bớt) để có sự sắp thẳng tối ưu của trình tự. Vị trí liên kết của peptit tín hiệu ER được đặc trưng bởi việc được thêm (hoặc được liên kết) vào đầu tận cùng C của protein được biểu hiện hoặc được tổng hợp trong tế bào thực vật.

Thuật ngữ “mảnh Fc” dùng để chỉ một phần của globulin miễn dịch không có vị trí gắn kết kháng nguyên, còn lại sau khi chuỗi nặng (chuỗi H) được liên kết bằng liên kết S-S khi globulin miễn dịch bị phân hủy bởi papain, và mảnh Fc của sáng chế tốt hơn là mảnh Fc ở lợn, và tốt hơn nữa là, mảnh Fc ở lợn thể hiện bởi SEQ ID NO: 3. Tuy nhiên, không có giới hạn miễn là nó là mảnh Fc làm tăng mức độ biểu hiện và độ tan của protein đích khi được dung hợp với protein đích. Ngoài ra, như là mảnh Fc của sáng chế, biến thể của SEQ ID NO: 3 được bao gồm trong phạm vi của sáng chế. Cụ thể làm gen chứa trình tự bazơ có độ tương đồng trình tự tốt hơn là 90% trở lên, tốt hơn nữa là 95% trở lên, và tốt nhất là 98% trở lên với trình tự bazơ SEQ ID NO: 3. Thuật ngữ “% tương đồng trình tự” so với polynucleotit được xác định bằng cách so sánh vùng so sánh với trình tự được sắp thẳng tối ưu, và trong vùng so sánh, một phần của trình tự polynucleotit có thể bao gồm sự thêm hoặc bớt (nghĩa là khoảng trống) so với trình tự tham chiếu (không có sự thêm hoặc bớt) để có sự sắp thẳng tối ưu của trình tự.

Thuật ngữ “vị trí tách dòng” bao gồm các đoạn chèn để liên kết/phân biệt các gen trong vectơ, và tốt hơn là vùng thể hiện bởi “ggatcctg” hoặc “ccccgggca” trong SEQ ID NO: 12, “RIL, Arg Ile Leu” nằm ở vị trí thứ 8 đến thứ 10 của SEQ ID NO: 13, hoặc “PRA, Pro Arg Ala” nằm ở vị trí thứ 727 đến thứ 729 của SEQ ID NO: 13, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Theo sáng chế, protein virus tốt hơn là được cung cấp ở dạng dung hợp với mảnh Fc. Thuật ngữ “dung hợp” có nghĩa là cả dung hợp hóa học và di truyền, và theo sáng chế, tốt hơn là, dùng để chỉ dung hợp di truyền, Thuật ngữ “dung hợp di truyền” dùng để chỉ liên kết được tạo ra bởi liên kết công hóa trị thẳng thông qua sự biểu hiện di truyền của trình tự ADN mã hóa protein.

Gen để gắn thẻ có thể bao gồm, ví dụ, Avi tag, calmodulin tag, polyglutamat tag, E tag, FLAG tag, HA tag, His tag, Myc tag, S tag, SBP tag, IgG-Fc tag, CTB tag, Softag 1 tag, Softag 3 tag, Strep tag, TC tag, V5 tag, VSV tag, và Xpress tag, và IgG-Fc tag có thể có nguồn gốc từ người, chuột, thỏ hoặc lợn.

Gen chỉ thị để chọn lọc có thể là, ví dụ, gen kháng thuốc diệt cỏ như glyphosat hoặc phosphinothrixin, gen kháng kháng sinh như kanamycin, G418, bleomycin, hygromycin hoặc chloramphenicol, hoặc gen aadA, và vùng khởi động có thể là, ví dụ, vùng khởi động pEMU, vùng khởi động MAS, vùng khởi động histon, vùng khởi động Clp, vùng khởi động 35S có nguồn gốc từ virus khảm súp lơ, vùng khởi động ARN 19S có nguồn gốc từ virus khảm súp lơ, vùng khởi động protein actin ở thực vật, vùng khởi động protein ubiquitin, vùng khởi động virus cự bào (CMV), vùng khởi động virus simian 40 (SV40), vùng khởi động virus hợp bào hô hấp (RSV), vùng khởi động nhân tố kéo dài 1 alpha (EF-1 α), và nhân tố kết thúc có thể là, ví dụ, nhân tố kết thúc nopaline synthase (nopaline synthase - NOS), nhân tố kết thúc amylaza RAmY1 A ở lúa gạo, nhân tố kết thúc faceolin, nhân tố kết thúc của gen octopine của *Agrobacterium tumefaciens*, hoặc nhân tố kết thúc rrnB1/B2 của *E. coli*, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Thuật ngữ “vector” được sử dụng ở đây có cấu trúc được thể hiện trong FIG. 1, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Thuật ngữ “vector” được sử dụng ở đây tốt hơn là gen có trình tự axit amin SEQ ID NO: 13, và tốt nhất là trình tự axit amin thể hiện bởi SEQ ID NO: 13, và chứa trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự 80% trở lên, tốt hơn nữa là 90% trở lên, và tốt hơn nữa là 95% trở lên với trình tự SEQ ID NO: 13.

Ngoài ra, trình tự axit amin có thể mã hóa trình tự gen thể hiện bởi SEQ ID NO: 12, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó. Cụ thể là, gen có thể chứa trình tự bazơ có độ tương đồng 90% trở lên, tốt hơn nữa là 95% trở lên, và tốt nhất là 98% trở lên với trình tự bazơ SEQ ID NO: 12. Thuật ngữ “% tương đồng trình tự” so với polynucleotide

được xác định bằng cách so sánh vùng so sánh với trình tự được sắp thẳng tối ưu, và trong vùng so sánh, một phần của trình tự polynucleotit có thể bao gồm sự thêm hoặc bớt (nghĩa là khoảng trống) so với trình tự tham chiếu (không có sự thêm hoặc bớt) để có sự sắp thẳng tối ưu của trình tự.

Thuật ngữ “biến nạp” được sử dụng ở đây bao gồm sự thay đổi về đặc tính di truyền của sinh vật sống được bởi ADN được tiêm vào, thuật ngữ “sinh vật chuyển gen” là sinh vật sống được tạo ra bằng cách tiêm gen bên ngoài thông qua phương pháp di truyền phân tử, và tốt hơn là, sinh vật sống được biến nạp bằng vector biểu hiện tái tổ hợp của sáng chế. Sinh vật sống là thể sống như vi sinh vật, tế bào nhân thực, côn trùng, động vật, hoặc thực vật mà không có giới hạn, và tốt hơn là, *E. coli*, *Salmonella*, *Bacillus*, nấm men, tế bào động vật chuột nhà, chuột cống, chó, khỉ, lợn, ngựa, bò, *Agrobacterium tumefaciens* hoặc thực vật, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Thuật ngữ “thực vật” được sử dụng ở đây là thực vật có thể sản xuất protein với số lượng lớn, và cụ thể hơn là, có thể được chọn từ nhóm bao gồm thuốc lá, *Arabidopsis thaliana*, ngô, lúa gạo, đậu tương, cải dầu, cỏ linh lăng, hướng dương, lúa miến, lúa mì, bông, đậu phộng, cà chua, khoai tây, rau diếp và hạt tiêu, và tốt hơn là thuốc lá. Thuốc lá theo sáng chế là thực vật thuộc chi *Nicotiana*, có thể biểu hiện quá mức protein, nhưng không có giới hạn cụ thể về loại cây thuốc lá, và sáng chế có thể được thực hiện bằng cách chọn loài phù hợp cho phương pháp biến nạp và mục đích sản xuất hàng loạt protein. Ví dụ, loài *Nicotiana benthamiana* L. hoặc *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi có thể được sử dụng.

Thể biến nạp có thể được chuẩn bị bằng cách biến nạp, chuyển nạp, biến nạp qua trung gian *Agrobacterium*, bắn bằng súng hạt, sóng siêu âm, điện phân và biến nạp qua trung gian polyetylen glycol (PEG), không có giới hạn miễn là thể biến nạp được chuẩn bị bằng bất kỳ phương pháp nào để tiêm vector của sáng chế.

Thuật ngữ “độ tan” được sử dụng ở đây để chỉ mức độ hòa tan protein hoặc peptit đích trong dung môi thích hợp để dùng cho cơ thể người. Cụ thể là, độ tan cho biết mức độ bão hòa của chất tan trong dung môi nhất định ở nhiệt độ cụ thể. Độ tan có thể được đo bằng cách xác định nồng độ bão hòa của dung môi, và ví dụ, độ tan có thể được xác định bằng cách bổ sung lượng quá mức chất tan vào dung môi, khuấy và lọc dung dịch, và đo nồng độ bằng máy quang phổ UV hoặc HPLC, nhưng sáng chế không bị giới hạn

ở đó. Độ tan cao thích hợp hơn để phân lập và tinh sạch protein tái tổ hợp, và có ưu điểm là ức chế sự quần tụ của protein tái tổ hợp và duy trì hoạt tính sinh lý hoặc dược lý của protein tái tổ hợp.

Thuật “phòng ngừa” được sử dụng ở đây để chỉ tất cả các hoạt động ức chế hoặc trì hoãn sự xuất hiện của bệnh PED bằng cách dùng protein virus PED tái tổ hợp của sáng chế.

Thuật ngữ “điều trị” được sử dụng ở đây để chỉ tất cả các hoạt động liên quan đến việc cải thiện hoặc thay đổi có lợi các triệu chứng của bệnh PED bằng cách dùng protein theo sáng chế.

Thuật ngữ “cá thể” được sử dụng ở đây để chỉ đối tượng mà có thể dùng protein virus PED tái tổ hợp của sáng chế, nhưng cá thể này không bị giới hạn.

Thuật ngữ “chế phẩm vaccin” được sử dụng ở đây có thể được bào chế dưới dạng chế phẩm dùng đường miệng như bột, hạt, viên nén, viên nang, hỗn dịch, nhũ tương, xi-rô hoặc son khí, hoặc dung dịch tiêm vô trùng theo phương pháp thông thường. Chế phẩm vaccin có thể được bào chế bằng chất pha loãng hoặc tá dược như chất độn, chất làm đặc, chất kết dính, chất làm ướt, chất phân hủy, chất hoạt động bề mặt, thường được sử dụng. Chế phẩm rắn để dùng đường miệng có thể là viên nén, thuốc viên, bột, hạt hoặc viên nang, và chế phẩm dạng rắn này có thể thu được bằng cách trộn ít nhất một trong các tá dược như tinh bột, canxi cacbonat, sucroza, lactoza và gelatin với chất nhũ hóa tương tự lecithin. Ngoài ra, ngoài tá dược đơn giản, chất bôi trơn như magiê stearat và bột talc cũng có thể được sử dụng. Chất tạo huyền phù, chất lỏng dùng bên trong, nhũ tương hoặc xi-rô được sử dụng làm chế phẩm lỏng dùng đường miệng, và ngoài chất pha loãng đơn giản thường được sử dụng như nước hoặc parafin lỏng, các tá dược khác, ví dụ, chất làm ướt, chất tạo ngọt, chất tạo hương và chất bảo quản có thể được bao gồm. Dung dịch nước vô trùng, chất không chứa nước, chất tạo huyền phù, chất nhũ hóa hoặc chất làm đông khô được bao gồm như là chế phẩm dùng đường ngoài ruột. Là một chất không chứa nước hoặc chất tạo huyền phù, Propylen glycol, polyetylen glycol, dầu thực vật như dầu ô liu, hoặc este có thể tiêm được như etyl oleat có thể được sử dụng như là chất không chứa nước hoặc chất tạo huyền phù

Ngoài ra, thuật ngữ “tá dược” được sử dụng ở đây để chỉ bất kỳ vật liệu nào làm tăng phản ứng miễn dịch dịch thể và/hoặc tế bào đối với kháng nguyên. Ở đây, chế phẩm

vacxin theo sáng chế có thể còn bao gồm thêm “tá dược”. Tác dược có thể là, ví dụ, tá dược Freund hoàn toàn (complete Freund's adjuvant - CFA), tá dược Freund không hoàn toàn (incomplete Freund's adjuvant - IFA), phèn, dầu, Lipid A, monophosphoryl lipid A, tác nhân vi khuẩn như *Bacillus-Calmette-Guerrin* (BCG), axit nucleic như CpG-DNA, dsRNA, tác nhân thành phần vi khuẩn như lao tố, vật liệu phân tử cao tự nhiên như hemoxyanin ở sao sao lỗ khóa hoặc mannam ở nấm men, muramyl tripeptit hoặc muramyl dipeptit hoặc dẫn xuất của chúng, phèn, copolyme khối không ion, hoặc xytokin như interleukin 2 (IL-2), nhân tố kích thích khuẩn lạc đại thực bào bạch cầu hạt (granulocyte macrophage colony stimulating factor - GM-CSF), interferon- α (IFN- α), hoặc interferon- β (IFN- β), và sự kết hợp của ít nhất một hoặc hai tá dược trên, và theo một phương án của sáng chế, tá dược dầu IMS1313 được sử dụng.

Chế phẩm vacxin hoặc dược phẩm theo sáng chế có thể được bào chế dưới dạng chế phẩm dùng đường miệng như bột, hạt, viên nén, viên nang, hỗn dịch, nhũ tương, xi-rô hoặc son khí, chế phẩm dùng bên ngoài, thuốc đạn hoặc dung dịch tiêm vô trùng.

Đường dùng đối với chế phẩm vacxin theo sáng chế có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, đường miệng, tĩnh mạch, trong cơ, trong động mạch, trong tủy sống, trong màng cứng, trong tim, qua da, dưới da, trong màng bụng, trong mũi, đường ruột, cục bộ, dưới lưỡi hoặc trực tràng. Đường miệng hoặc ngoài ruột được ưu tiên. Thuật ngữ “ngoài ruột” được sử dụng ở đây có nghĩa là các kỹ thuật tiêm dưới da, trong da, trong tĩnh mạch, trong cơ, trong khớp, trong bao hoạt dịch, trong xương ức, trong màng cứng, trong thương tổn và trong sọ. Chế phẩm vacxin của sáng chế có thể được dùng dưới dạng thuốc đạn để dùng trực tràng.

Liều lượng của chế phẩm vacxin hoặc dược phẩm theo sáng chế được lựa chọn dựa trên tuổi, cân nặng, giới tính hoặc tình trạng cơ thể của cá thể. Lượng cần thiết để cảm ứng phản ứng bảo vệ miễn dịch ở cá thể mà không có phản ứng phụ riêng biệt có thể thay đổi tùy theo sự hiện diện của bất kỳ protein tái tổ hợp nào được sử dụng làm chất sinh miễn dịch và bất kỳ tá dược nào. Nói chung, mỗi liều chứa 0,1 đến 1000 μg , và tốt hơn là 0,1 đến 100 μg protein tái tổ hợp của sáng chế trên mỗi mL dung dịch vô trùng. Trong trường hợp chế phẩm vacxin, nếu cần, có thể thực hiện kích thích kháng nguyên lặp lại tùy ý sau liều ban đầu.

“Chế phẩm thức ăn chăn nuôi” được sử dụng ở đây là thức ăn chăn nuôi chứa protein S1 của virus PED tái tổ hợp của sáng chế, và thức ăn chăn nuôi có thể là sản phẩm phụ của thịt lợn, thịt bò hoặc thịt gà cũng như ngô, gạo, rơm rạ thông thường, cỏ hoang dã, cỏ, ỉ chua, cỏ khô, hoặc cỏ bản địa, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó, và không có giới hạn miễn là nó là thức ăn chăn nuôi được sử dụng để nuôi gia súc. Các phương pháp để bổ sung và trộn protein S1 của virus PED tái tổ hợp của sáng chế với thức ăn chăn nuôi này có thể bao gồm phương pháp trộn cơ học, hấp phụ và hấp lưu, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Sau đây, để giúp hiểu sáng chế, các ví dụ điển hình sẽ được đề xuất. Tuy nhiên, các ví dụ sau đây chỉ được cung cấp để dễ hiểu hơn về sáng chế chứ không phải nhằm giới hạn sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Tạo cấu trúc vectơ biểu hiện protein S1 của virus PED (PEDV-S1) tái tổ hợp ở thực vật

Vectơ biểu hiện tái tổ hợp ở thực vật được tạo cấu trúc để biểu hiện protein S1 của virus PED ở cơ thể thực vật được thể hiện trong FIG. 1. Cụ thể hơn là, thông tin gen cho protein S1 của virus PED đã được bảo mật, và gen SEQ ID NO: 1 được tổng hợp dưới dạng trình tự được tối ưu hóa để biểu hiện ở *Nicotiana benthamiana*. Vectơ biểu hiện protein S1 của virus PED ở thực vật được tạo cấu trúc bằng cách liên kết tuần tự polynucleotit (SEQ ID NO: 2) mã hóa peptit tín hiệu của protein gắn kết chaperon (BiP), polynucleotit (SEQ ID NO: 1) mã hóa protein S1 của virus PED, polynucleotit (SEQ ID NO: 3) mã hóa pFc2, là mảnh Fc (mảnh Fc globulin miễn dịch ở lợn (pFc) và polynucleotit (SEQ ID NO: 4) mã hóa peptit His-Asp-Glu-Leu (HDEL) giữa gen vùng khởi động CaMV 35S và nhân tố kết thúc NOS của vectơ pCAMBIA1300.

Ví dụ 2: Xác nhận sự biểu hiện của protein S1 của PEDV tái tổ hợp

2.1. Biểu hiện tạm thời của vectơ biểu hiện ở thực vật

Biến nạp vectơ biểu hiện ở thực vật trong ví dụ 1 vào chủng *Agrobacterium* strain LBA4404 bằng phương pháp điện phân. Nuôi cấy lắc *Agrobacterium* được biến nạp trong 5 mL môi trường lỏng chiết xuất nấm men pepton (yeast extract peptone - YEP) (10 g chiết xuất nấm men, 10 g pepton, 5 g NaCl, 50 mg/L kanamycin, và 25 mg/L

rifampixin) ở 28 °C trong 16 giờ, cấy 1 mL môi trường nuôi cấy sơ bộ vào 50 mL môi trường YEP tươi và nuôi lắc ở 28 °C trong 6 giờ. Thu thập *Agrobacterium* được nuôi thông qua ly tâm (7000 vòng/phút, 4 °C, 5 phút), và tái huyền phù trong đệm thẩm lọc (MES 10 mM (pH 5,7), MgCl₂ 10 mM, acetosyringon 200 µM) đến O.D. 1,0 ở bước sóng 600 nm. Tiêm dịch huyền phù *Agrobacterium* vào mặt sau của lá *Nicotiana benthamiana* sử dụng ống tiêm không có kim tiêm để thực hiện thẩm lọc Agro.

2.2. Xác nhận sự biểu hiện của protein S1 của virus PED tái tổ hợp trong cơ thể thực vật

Chiết protein từ lá thực vật được chuẩn bị trong ví dụ 2.1 và ly tâm, và sau đó xác định protein trong phân đoạn nước (S) chứa trong dung dịch và protein trong phân đoạn viên (pellet: P) bằng phương pháp western blotting (thẩm tách tây). Cụ thể hơn là, trộn 30 µL mỗi phân đoạn với đệm mẫu SDS, và sau đó làm nóng. Ngoài ra, tải phân đoạn lên gel SDS-PAGE 10% cho quá trình điện di để phân tách protein theo kích thước, và chuyển protein được phân tách lên màng PVDF và phong tỏa bằng sữa tách béo 5%, kháng thể thứ cấp kháng lợn nhận biết pFc2 được liên kết với màng, và xử lý bằng dung dịch ECL theo phương pháp được cung cấp bởi nhà sản xuất để xác định sự biểu hiện của protein S1 của virus PED tái tổ hợp. Kết quả được thể hiện trong FIG. 2.

Như được thể hiện trong FIG. 2, đã xác nhận rằng hầu hết các protein S1 của virus PED tái tổ hợp được biểu hiện có mặt trong phân đoạn nước.

Từ kết quả trên, đã xác nhận rằng vector để biểu hiện protein S1 của virus PED tái tổ hợp của sáng chế có thể biểu hiện hiệu quả protein S1 của virus PED tái tổ hợp trong cơ thể thực vật, và do protein S1 của virus PED tái tổ hợp được chuẩn bị bằng cách sử dụng vector có độ tan cao, nên dễ dàng phân lập và tinh sạch, và sự quản lý của protein tái tổ hợp bị ức chế để có hiệu quả trong việc duy trì hoạt tính sinh lý hoặc được lý của protein tái tổ hợp.

Ví dụ 3: Phân lập và tinh sạch protein S1 của PEDV tái tổ hợp

Bổ sung 200 mL dung dịch tách chiết protein (Tris 50 mM (pH 7,2), NaCl 150 mM, Triton X-100 0,1 %, chất ức chế proteaza 1X) vào 40 g *Nicotiana ventamia* được chuẩn bị trong ví dụ 2.1, hỗn hợp được thực hiện phá vỡ mô bằng máy trộn, và ly tâm ở 13000 vòng/phút trong 20 phút ở 4 °C để thu hồi chiết xuất. Để phân lập và tinh sạch protein virus PED tái tổ hợp đã biểu hiện, thực hiện sắc ký ái lực cột lấp đầy nhựa protein

A-sepharosa. Lấp đầy cột bằng 5 mL nhựa và làm cân bằng với 50 mL dung dịch rửa (Tris 50 mM (pH 7,2), NaCl 150 mM). Sau khi đưa chiết xuất protein được thu hồi vào cột, cho chảy 100 mL dung dịch rửa để rửa nhựa, rửa giải protein tái tổ hợp bằng dung dịch rửa giải (natri xitrat 0,1 M (pH 3,0), NaCl 150 mM), và trung hòa dịch rửa giải bằng cacbonat bổ sung dung dịch trung hòa (Tris 1 M (pH 9,0)). Thay thế dung dịch rửa giải chứa protein tái tổ hợp bằng nước muối sinh lý (PBS) sử dụng màng lọc kích thước 30 kD, và cô đặc, từ đó thu được protein của virus PED tái tổ hợp được phân lập và tinh sạch. Xác nhận protein được phân lập và tinh sạch bằng cách nhuộm màu xanh Coomassie sau khi thực hiện SDS-PAGE (FIG. 3).

Như được thể hiện trong FIG. 3, đã xác nhận rằng protein tái tổ hợp có kích thước khoảng 120 Kd đã được tinh sạch.

Protein tái tổ hợp của sáng chế đã được tinh sạch tốt mà không có sự khác biệt lớn so với protein thông thường. Kết quả này cho thấy rằng, khi protein được biểu hiện ở thực vật, vẫn đề có khả năng làm giảm hiệu quả sản xuất do cấu trúc đường bị biến đổi đã không được tìm thấy, và protein theo sáng chế được sản xuất tốt ở thực vật.

Ví dụ 4: Xác nhận khả năng sinh miễn dịch của protein S1 PEDV được biểu hiện ở thực vật

Để xác nhận liệu kháng nguyên protein S1 của virus PED tái tổ hợp có cảm ứng kháng thể *in vivo* và do đó có khả năng sinh miễn dịch hay không, thực hiện thí nghiệm với 5 con lợn cái 6 tuần tuổi cho mỗi nhóm. Cụ thể hơn là, dùng nước muối sinh lý cho đối chứng âm, dùng vắc xin PED có sẵn trên thị trường (Joongang Vaccine) cho đối chứng dương, và dùng dưới da protein S1 của virus PED tái tổ hợp cho nhóm thử nghiệm với liều lượng 150 µg 2 lần mỗi 3 tuần. Khi tiêm kháng nguyên, trộn và tiêm cùng một lượng tá dược IMS1313 (SEPPIC). Lấy máu từ tĩnh mạch cổ hoặc tim trước khi dùng kháng nguyên và tại thời điểm hai tuần sau khi dùng kháng nguyên lần thứ hai, tiếp theo là phân tách huyết thanh, và bảo quản trong tủ lạnh ở -20 °C. Xác định sự sản xuất kháng thể đặc hiệu chống lại protein S1 của PEDV trong mỗi huyết thanh bằng cách sử dụng đĩa ELISA được phủ protein tái tổ hợp PEDV-S1 dung hợp His tag, và kết quả được thể hiện trong FIG. 4.

Như được thể hiện trong FIG. 4, đã xác nhận rằng không có phản ứng với protein S1 của virus PED tái tổ hợp được quan sát thấy trong huyết thanh của nhóm không điều

trị, nhưng có phản ứng với protein S1 của virus PED tái tổ hợp được thể hiện trong huyết thanh của nhóm dùng 2 lần vaccin có sẵn trên thị trường hoặc protein kháng nguyên tái tổ hợp, và so với nhóm dùng vaccin có sẵn trên thị trường, nhóm dùng protein kháng nguyên tái tổ hợp cho thấy tỷ lệ sản xuất kháng thể đặc hiệu tương đối cao hơn.

Ví dụ 5: Xác nhận hiệu giá kháng thể trung hòa trong máu

Xác nhận liệu các kháng thể trong máu được cảm ứng bởi việc dùng protein kháng nguyên tái tổ hợp có khả năng trung hòa virus PED hay không bằng cách sử dụng huyết thanh được chuẩn bị trong ví dụ 4. Cụ thể hơn là, trong thử nghiệm kháng thể trung hòa, sử dụng chủng virus PEDV QIAP1401 và tế bào Vero là vật chủ gây nhiễm. Phân tách huyết thanh từ máu thu được, cố định ở 57 °C trong 30 phút, và sau đó pha loãng 2 lần bằng môi trường thiết yếu tối thiểu (Minimum Essential Media - MEM) Eagle chứa 10 µg/ml trypsin. Trộn lượng bằng nhau của 316 TCID₅₀/0,1 mL virus PEDV và huyết thanh pha loãng để trung hòa ở 37 °C trong 90 phút. Ngay trước khi kết thúc nuôi cấy, rửa 3 lần tế bào Vero được chuẩn bị ở trạng thái đơn lớp trong đĩa 96 giếng bằng PBS, bổ sung 100 µL hỗn hợp huyết thanh-virus, và sau đó nuôi ở 37 °C trong 2 giờ. Sau khi nuôi, bổ sung 100 µL môi trường chứa 2 µg/mL trypsin, và nuôi virus ở 37 °C trong 3 đến 5 ngày đến khi bộc lộ hiệu ứng gây bệnh tế bào (cytopathic effect - CPE). Đo hiệu giá kháng thể trung hòa bằng cách quan sát hệ số pha loãng huyết thanh của giếng ngay trước khi CPE được biểu lộ dưới kính hiển vi (bảng 1).

Kết quả là, hiệu giá kháng thể trung hòa bởi protein kháng nguyên PEDV-S1 tái tổ hợp trung bình là 16,0 (Log₂) và hiệu giá kháng thể trung hòa bởi vaccin có sẵn trên thị trường là 7,2 (Log₂), cho thấy rằng sự hình thành hiệu giá kháng thể trung hòa bởi protein kháng nguyên PEDV-S1 tái tổ hợp cao hơn so với sự hình thành hiệu giá kháng thể trung hòa bởi vaccin có sẵn trên thị trường.

Bảng 1

Kháng nguyên được dùng	Số thứ tự	Hiệu giá kháng thể trung hòa
Nước muối sinh lý	1	< 4
	2	< 4

	3	< 4
	4	< 4
	5	< 4
Vaxxin thương mại	6	8
	7	4
	8	8
	9	8
	10	8
PEDV-S1:pFc2	11	16
	12	16

Từ kết quả trên, đã xác nhận rằng protein S1 của virus PED tái tổ hợp của sáng chế không chỉ biểu hiện một cách hiệu quả trong cơ thể thực vật, mà còn có khả năng tan trong nước cao, và do đó protein dễ dàng được phân lập và tinh sạch, và đóng vai trò như là kháng nguyên trong cơ thể, do đó thể hiện khả năng sinh miễn dịch và khả năng trung hòa virus cao. Do đó, đã xác nhận rằng protein có thể được sử dụng như là chế phẩm vaccine PED mới.

Sau đây, ví dụ điều chế dược phẩm và chế phẩm thức ăn chăn nuôi của sáng chế sẽ được mô tả, nhưng các ví dụ chỉ được nêu ra để mô tả cụ thể sáng chế, thay vì giới hạn sáng chế.

Ví dụ điều chế 1. Điều chế dược phẩm

1.1. Điều chế bột

Bảng 2

Protein S1 của virus PED tái tổ hợp	20 mg
Lactose	100 mg
Bột talc	10 mg

Bột đã được điều chế bằng cách trộn các thành phần trên và đổ đầy hỗn hợp vào túi kín.

1.2. Điều chế viên nén

Bảng 3

Protein S1 của virus PED tái tổ hợp	10 mg
Bột ngô	100 mg
Lactose	100 mg
Magiê stearat	2 mg

Viên thuốc được điều chế bằng cách trộn các thành phần trên và hóa hợp hỗn hợp theo phương pháp thông thường để điều chế viên nén.

1.3. Điều chế viên nang

Bảng 4

Protein S1 của virus PED tái tổ hợp	10 mg
Xenluloza tinh thể	3 mg
Lactose	14,8 mg
Magiê stearat	0,2 mg

Viên nang được điều chế bằng cách trộn các thành phần trên và đổ đầy hỗn hợp vào nang gelatin theo phương pháp thông thường để điều chế viên nang.

1.4. Điều chế chế phẩm tiêm

Bảng 5

Protein S1 của virus PED tái tổ hợp	10 mg
Manitol	180 mg
Nước cất vô trùng để tiêm	2974 mg
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	26 mg

Chế phẩm tiêm được điều chế với hàm lượng các thành phần như trên cho mỗi ống (2 mL) theo phương pháp thông thường để điều chế chế phẩm tiêm.

1.5. Điều chế dịch lỏng

Bảng 6

Protein S1 của virus PED tái tổ hợp	20 mg
Đường đồng phân hóa	10 g
Manitol	5 g
Nước tinh khiết	q.s.

Dịch lỏng được điều chế bằng cách bổ sung và hòa tan từng thành phần trong nước tinh khiết, bổ sung một lượng thích hợp hương chanh và trộn chúng với nhau, bổ sung nước tinh khiết vào đến tổng thể tích 100 mL, và sau đó đổ dung dịch thu được vào chai màu nâu và khử trùng dung dịch theo phương pháp điều chế dịch lỏng thông thường.

Ví dụ điều chế 2. Điều chế chế phẩm thức ăn chăn nuôi

Bảng 7

Protein S1 của virus PED tái tổ hợp	100 mg
Vitamin E	0,7 mg

L-cacnيتين	0,7 mg
------------	--------

Thức ăn chăn nuôi được điều chế bằng cách trộn các thành phần trên theo phương pháp điều chế thức ăn chăn nuôi thông thường.

Những người có hiểu biết thông thường trong lĩnh vực này phải hiểu rằng mô tả ở trên của sáng chế là ví dụ, và các phương án điều chỉnh được bộc lộ ở đây có thể dễ dàng được sửa đổi thành các dạng cụ thể khác mà không xa rời bản chất kỹ thuật hoặc các dấu hiệu thiết yếu của sáng chế. Do đó, các phương án điều chỉnh được mô tả ở trên nên được hiểu là để minh họa và không giới hạn ở bất kỳ khía cạnh nào.

Khả năng áp dụng công nghiệp

Protein S1 của virus PED tái tổ hợp của sáng chế có thể được biểu hiện một cách hiệu quả trong cơ thể thực vật, và có khả năng tan trong nước cao, nó dễ dàng được phân lập và tinh chế, và cũng đóng vai trò như là kháng nguyên trong cơ thể để thể hiện khả năng sinh miễn dịch và khả năng trung hòa virus cao, và do đó nó được kỳ vọng sẽ được sử dụng trong nhiều loại lĩnh vực. Hơn nữa, do khả năng sinh miễn dịch và khả năng trung hòa virus đáng kể trong cơ thể, protein này được kỳ vọng sẽ được sử dụng như là chế phẩm vắc xin PED mới, và do đó khả dụng trong công nghiệp.

Đơn này yêu cầu hưởng quyền ưu tiên và lợi ích của Đơn đăng ký sáng chế Hàn Quốc số 10-2019-0044008, nộp ngày 16/04/2019, sự bộc lộ của đơn Hàn Quốc này được đưa vào đây bằng cách tham chiếu toàn bộ.

YÊU CẦU BẢO HỘ

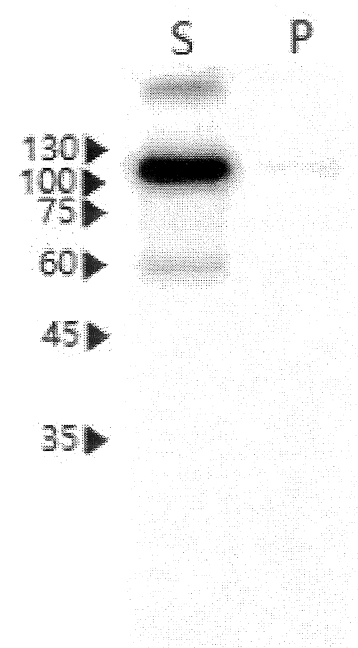
1. Chế phẩm vaccin virus gây dịch tiêu chảy cấp ở lợn, chứa protein của virus gây dịch tiêu chảy cấp ở lợn có trình tự axit amin thể hiện bởi SEQ ID NO: 5 làm hoạt chất.
2. Chế phẩm thức ăn chăn nuôi để phòng ngừa hoặc điều trị dịch tiêu chảy cấp ở lợn, chứa protein của virus gây dịch tiêu chảy cấp ở lợn có trình tự axit amin thể hiện bởi SEQ ID NO: 5 làm hoạt chất.
3. Vector để biểu hiện protein của virus gây dịch tiêu chảy cấp ở lợn, chứa trình tự polynucleotit thể hiện bởi SEQ ID NO: 1.
4. Vector theo điểm 3, có cấu trúc được thể hiện trong FIG. 1.
5. Vector theo điểm 4, vector này còn chứa:

gen mã hóa một hoặc nhiều peptit được chọn từ nhóm bao gồm peptit tín hiệu lưới nội chất, mảnh Fc và protein gắn kết chaperon (chaperone binding protein - BiP).
6. Vector theo điểm 5, trong đó peptit tín hiệu lưới nội chất là peptit được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự peptit thể hiện bởi KDEL, HDEL, SEKDEL, KHEDL, KEEL và SEHEDL.
7. Thẻ biến nạp được biến nạp vector theo điểm bất kỳ trong số các điểm 3 đến 6.
8. Thẻ biến nạp theo điểm 7, là thực vật.
9. Phương pháp sản xuất protein của virus gây dịch tiêu chảy cấp ở lợn, phương pháp này bao gồm các bước:
 - (a) nuôi thể biến nạp theo điểm 8; và
 - (b) phân lập và tinh sạch protein của virus gây dịch tiêu chảy cấp ở lợn từ thể biến nạp hoặc dung dịch nuôi.
10. Phương pháp theo điểm 9, trong đó quá trình tinh sạch trong bước (b) là quá trình tinh sạch sử dụng phân đoạn nước.

FIG. 1

BiP	PEDV-S1	pFc2	HDEL
-----	---------	------	------

FIG. 2



2/3

FIG.3

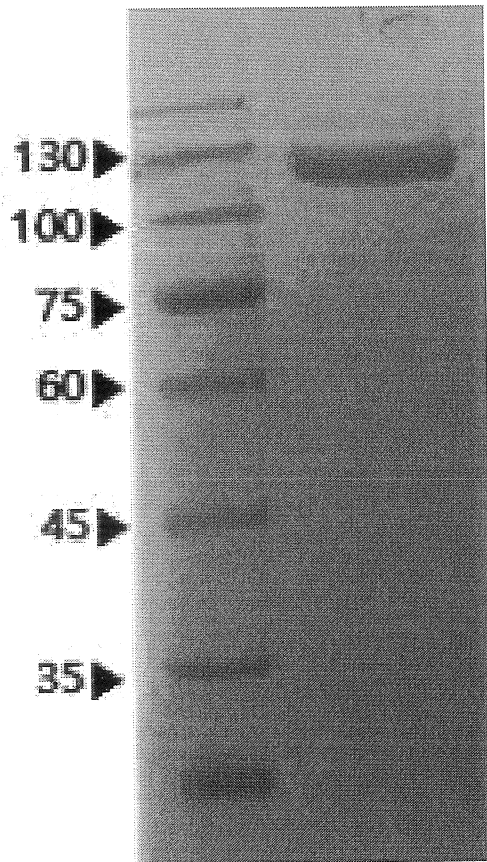
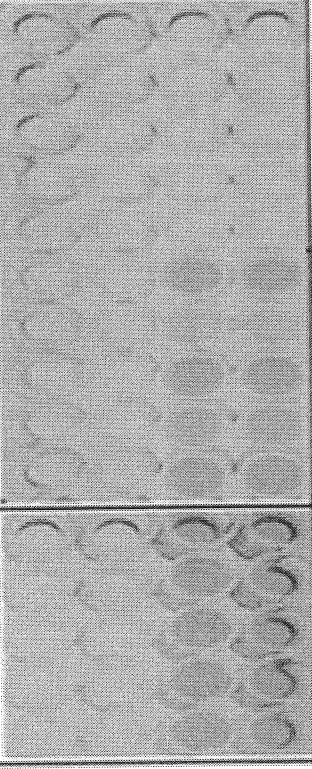


FIG. 4

Huyết thanh		Trước	Sau	Trước	Sau
NC đối chứng âm	1	0,08	0,09		
	2	0,10	0,10		
	3	0,08	0,11		
	4	0,10	0,11		
	5	0,11	0,09		
PC đối chứng dương	6	0,07	1,31		
	7	0,09	0,49		
	8	0,07	2,04		
	9	0,08	0,79		
	10	0,09	2,20		
dùng PEDV-S1:pFc2	11	0,09	3,05		
	12	0,08	2,06		
	13	0,06	3,03		
	14	0,06	2,88		
	15	0,07	2,19		

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> BioApplications Inc

<120> Chế phẩm vacxin virus gây dịch tiêu chảy cấp ở lợn, chế phẩm thức ăn chăn nuôi, vectơ biểu hiện protein virus này, thể biến nạp được biến nạp vectơ này, và phương pháp sản xuất protein virus này

<130> MPCT20-020

<150> KR 10-2019-0044008

<151> 2019-04-16

<160> 13

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 2148

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> PEDV-S1

<400> 1

caagatgtca ctagatgttc tgcaaacacg aatttcgggc gtttcttttc aaaattcaac
60

gttcaagcac ccgcagtggc tgcctcggc ggttatctgc ctataggcga gaatcagggt
120

gtgaacagta cttggatttg tgctgggtcaa caccctacag ctacggcggt tcacggcatc
180

tttgtatcac atattagagg aggacatggt ttgtgaaattg ggatctcaca ggaacctttt
240

gacccatgtg gttatcaact ttacttacac aaagcgacta atggtaatac aaatgctacc
300

gccaggctta gaatttgtca gtttccaagc atcaagacct tgggcccgac tgcaaacaac
360

gatgttacga ccggtaggaa ttgtcttttc aataaggcaa ttccagctca tatgtctgaa
420

cattctgttg taggtataac atgggataac gatagagtta ctgtgttttc cgataaaatt
480

tactatttct acttcaagaa cgactggctg cgagtcgcta ctaagtgcta taatagtggc
540

ggatgcgcta tgcagtacgt gtacgagcca acatactata tgttgaatgt tacctctgct
600

ggggaggacg ggatttccta tcaaccttgc acagccaatt gcatcggata tgctgctaatt
660

gtttttgcta ctgagcctaa cggtcacatc ccagaaggat tttctttcaa taactggttc
720

cttcttagca atgactctac tctagtacat ggaaaagtag tgtcgaatca accgctgctc
780

gtgaattgtc ttcttgctat accaaagatc tacggacttg gacaattttt ctcctttaac
840

caaactatcg acgggggtctg taatggcgct gctgttcaaa gagccccga ggctcttcga
900

tttaatatatta atgataccag cgttattctt gctgaaggct cgatcgttct tcatactgct
960

ctgggggacta acttttcttt tgtgtgcagt aactcttcta atccacacct tgccactttt
1020

gctatgccac ttggggccac acaggttcca tactactggt ttctgaagggt ggacacttat
1080

aattctactg tctacaagtt tctcgtctgt ttgccaccaa ctgtcagaga aatagttatt
1140

actaagtacg gtgatgtata tgttaacggg tttgaatatc tacatctagg ccttctcgat
1200

gctgttacta tcaatttcac tggccatgga acagacgatg atgttagtgg cttctggacg
1260

atagcctcta caaatttcgt tgatgctctt atagaagtcc aaggaaactgc tattcagcgt
1320

atcctttact gcgacgatcc agtctcacag cttaaagtgt ctcaggttgc attcgatctc
1380

gatgatggat tttatcctat ttcttcgaga aacctcctgt ctcacgagca accaatatct
1440

ttcgtgactc ttccctcttt taacgatcat tcttttgta atataaccgt ttcagcttcc
1500

tttgaggac attctggagc taaccttatt gcttctgaca ctacgattaa tgggttctcc
1560

tcctttctgcg tcgacacaag acaattcacc atttctcttt tctacaatgt tactaattct
1620

tatggatacg tttccaagtc tcaagactct aattgcccgt ttactcttca gtctgttaac
1680

gattatcttt ctttttctaa gttttgtgtt tctacctctc ttcttgcgtc tgcttgacag
1740

attgatcttt tcggataccc agagtttggc tctggagtta aattcactag cttttatttc
1800

cagtttacta agggagagct aattactgga actccaaaac ctcttgaagg agtgactgat
1860

gtttctttta tgacgcttga tgtgtgtact aagtatacta tctacgggtt caaggagag
1920

ggtattataa ctcttactaa ctcttctttt cttgctggtg tttattacac tagcgactct
1980

ggacaattac ttgctttcaa aaacgttact tctggagcgg tttattctgt gactccatgt
2040

tcgttctccg aacaggccgc ttatgttgat gacgatattg ttggtgtcat ttcaagcctt
2100

tcctcatcta cctttaacag caccagggaa cttccaggat ttttctat
2148

<210> 2
<211> 273
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> protein gắn kết chaperon (BiP)

<400> 2
atggctcgct cgtttgagc taacagtacc gttgtgttgg cgatcatctt cttcggtgag
60

tgattttccg atcttcttct ccgatttaga tctcctctac attgttgctt aatctcagaa
120

ccttttttcg ttgttcctgg atctgaatgt gtttgtttgc aatttcacga tcttaaaagg
180

ttagatctcg attggtattg acgattggaa tctttacgat ttcaggatgt ttatttgcgt
240

tgtcctctgc aatagaagag gctacgaagt taa
273

<210> 3
 <211> 681
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Fc2 ở lớn

<400> 3
 gttggaagac catgccctat atgtcctgct tgtgaaggct caggccctc tgcttttata
 60
 ttcccaccaa agccgaagga taccttgatg atttcacgta caccacaagt tacttggtgtt
 120
 gttgtggatg tttcacaaga aaatcctgag gtacaattca gctggtatgt tgatggggta
 180
 gaagtgcaca ctgcacagac tcgaccaaag gaggcccagt ttaactcgac ttatagagtt
 240
 gtttctgttc tccaatcca acacgaagat tggctgaagg gcaaggaatt tgaatgcaag
 300
 gttaacaata aagatctacc agcaccaatt accaggatta tttctaaggc aaaaggagcc
 360
 tccagagagc cccaagttta cacattgtct ctttctgctg aggagcttag tagaagtaaa
 420
 gtgagcatta cctgcttagt gacgggattc taccctccag acatcgacgt cgaatggaaa
 480
 tctaattggc aacctgagcc agaaggtaac tataggacta ctccaccaca acaggacgtc
 540
 gatggcacat actttcttta ttcaaaactt gctgtcgata aggcaagttg gcaaagagga
 600
 gatccatttc agtgtgctgt aatgcatgag gctttgcata atcattatac acagaaatca
 660
 gtttctaata cacaaggga a
 681

<210> 4
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HDEL

<400> 4
catgatgagc tc
12

<210> 5
<211> 716
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PEDV-S1

<400> 5
Gln Asp Val Thr Arg Cys Ser Ala Asn Thr Asn Phe Arg Arg Phe Phe
1 5 10 15
Ser Lys Phe Asn Val Gln Ala Pro Ala Val Val Val Leu Gly Gly Tyr
20 25 30
Leu Pro Ile Gly Glu Asn Gln Gly Val Asn Ser Thr Trp Tyr Cys Ala
35 40 45
Gly Gln His Pro Thr Ala Ser Gly Val His Gly Ile Phe Val Ser His
50 55 60
Ile Arg Gly Gly His Gly Phe Glu Ile Gly Ile Ser Gln Glu Pro Phe
65 70 75 80
Asp Pro Ser Gly Tyr Gln Leu Tyr Leu His Lys Ala Thr Asn Gly Asn
85 90 95
Thr Asn Ala Thr Ala Arg Leu Arg Ile Cys Gln Phe Pro Ser Ile Lys
100 105 110
Thr Leu Gly Pro Thr Ala Asn Asn Asp Val Thr Thr Gly Arg Asn Cys
115 120 125
Leu Phe Asn Lys Ala Ile Pro Ala His Met Ser Glu His Ser Val Val
130 135 140
Gly Ile Thr Trp Asp Asn Asp Arg Val Thr Val Phe Ser Asp Lys Ile
145 150 155 160
Tyr Tyr Phe Tyr Phe Lys Asn Asp Trp Ser Arg Val Ala Thr Lys Cys
165 170 175
Tyr Asn Ser Gly Gly Cys Ala Met Gln Tyr Val Tyr Glu Pro Thr Tyr
180 185 190
Tyr Met Leu Asn Val Thr Ser Ala Gly Glu Asp Gly Ile Ser Tyr Gln

195					200					205					
Pro	Cys	Thr	Ala	Asn	Cys	Ile	Gly	Tyr	Ala	Ala	Asn	Val	Phe	Ala	Thr
	210					215					220				
Glu	Pro	Asn	Gly	His	Ile	Pro	Glu	Gly	Phe	Ser	Phe	Asn	Asn	Trp	Phe
225					230					235					240
Leu	Leu	Ser	Asn	Asp	Ser	Thr	Leu	Val	His	Gly	Lys	Val	Val	Ser	Asn
				245					250					255	
Gln	Pro	Leu	Leu	Val	Asn	Cys	Leu	Leu	Ala	Ile	Pro	Lys	Ile	Tyr	Gly
			260					265					270		
Leu	Gly	Gln	Phe	Phe	Ser	Phe	Asn	Gln	Thr	Ile	Asp	Gly	Val	Cys	Asn
	275						280					285			
Gly	Ala	Ala	Val	Gln	Arg	Ala	Pro	Glu	Ala	Leu	Arg	Phe	Asn	Ile	Asn
	290					295					300				
Asp	Thr	Ser	Val	Ile	Leu	Ala	Glu	Gly	Ser	Ile	Val	Leu	His	Thr	Ala
305						310					315				320
Leu	Gly	Thr	Asn	Phe	Ser	Phe	Val	Cys	Ser	Asn	Ser	Ser	Asn	Pro	His
				325					330					335	
Leu	Ala	Thr	Phe	Ala	Met	Pro	Leu	Gly	Ala	Thr	Gln	Val	Pro	Tyr	Tyr
			340					345					350		
Cys	Phe	Leu	Lys	Val	Asp	Thr	Tyr	Asn	Ser	Thr	Val	Tyr	Lys	Phe	Leu
		355					360					365			
Ala	Val	Leu	Pro	Pro	Thr	Val	Arg	Glu	Ile	Val	Ile	Thr	Lys	Tyr	Gly
		370				375					380				
Asp	Val	Tyr	Val	Asn	Gly	Phe	Glu	Tyr	Leu	His	Leu	Gly	Leu	Leu	Asp
385					390					395					400
Ala	Val	Thr	Ile	Asn	Phe	Thr	Gly	His	Gly	Thr	Asp	Asp	Asp	Val	Ser
				405					410					415	
Gly	Phe	Trp	Thr	Ile	Ala	Ser	Thr	Asn	Phe	Val	Asp	Ala	Leu	Ile	Glu
			420					425					430		
Val	Gln	Gly	Thr	Ala	Ile	Gln	Arg	Ile	Leu	Tyr	Cys	Asp	Asp	Pro	Val
		435					440					445			
Ser	Gln	Leu	Lys	Cys	Ser	Gln	Val	Ala	Phe	Asp	Leu	Asp	Asp	Gly	Phe
		450				455					460				
Tyr	Pro	Ile	Ser	Ser	Arg	Asn	Leu	Leu	Ser	His	Glu	Gln	Pro	Ile	Ser
465					470					475					480
Phe	Val	Thr	Leu	Pro	Ser	Phe	Asn	Asp	His	Ser	Phe	Val	Asn	Ile	Thr

```

                485                490                495
Val Ser Ala Ser Phe Gly Gly His Ser Gly Ala Asn Leu Ile Ala Ser
                500                505                510

Asp Thr Thr Ile Asn Gly Phe Ser Ser Phe Cys Val Asp Thr Arg Gln
                515                520                525

Phe Thr Ile Ser Leu Phe Tyr Asn Val Thr Asn Ser Tyr Gly Tyr Val
                530                535                540

Ser Lys Ser Gln Asp Ser Asn Cys Pro Phe Thr Leu Gln Ser Val Asn
545                550                555                560

Asp Tyr Leu Ser Phe Ser Lys Phe Cys Val Ser Thr Ser Leu Leu Ala
                565                570                575

Ser Ala Cys Thr Ile Asp Leu Phe Gly Tyr Pro Glu Phe Gly Ser Gly
                580                585                590

Val Lys Phe Thr Ser Leu Tyr Phe Gln Phe Thr Lys Gly Glu Leu Ile
                595                600                605

Thr Gly Thr Pro Lys Pro Leu Glu Gly Val Thr Asp Val Ser Phe Met
                610                615                620

Thr Leu Asp Val Cys Thr Lys Tyr Thr Ile Tyr Gly Phe Lys Gly Glu
625                630                635                640

Gly Ile Ile Thr Leu Thr Asn Ser Ser Phe Leu Ala Gly Val Tyr Tyr
                645                650                655

Thr Ser Asp Ser Gly Gln Leu Leu Ala Phe Lys Asn Val Thr Ser Gly
                660                665                670

Ala Val Tyr Ser Val Thr Pro Cys Ser Phe Ser Glu Gln Ala Ala Tyr
                675                680                685

Val Asp Asp Asp Ile Val Gly Val Ile Ser Ser Leu Ser Ser Ser Thr
690                695                700

Phe Asn Ser Thr Arg Glu Leu Pro Gly Phe Phe Tyr
705                710                715

```

```

<210>      6
<211>      4
<212>      PRT
<213>      Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<223>      KDEL

```

<400> 6
Lys Asp Glu Leu
1

<210> 7
<211> 4
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HDEL

<400> 7
His Asp Glu Leu
1

<210> 8
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> SEKDEL

<400> 8
Ser Glu Lys Asp Glu Leu
1 5

<210> 9
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> KHEDL

<400> 9
Lys His Glu Asp Leu
1 5

<210> 10
<211> 4
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> KEEL

<400> 10
Lys Glu Glu Leu
1

<210> 11
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> SEHEDL

<400> 11
Ser Glu His Glu Asp Leu
1 5

<210> 12
<211> 3131
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Vector hoàn chỉnh

<400> 12
atggctcgct cgtttgagc taacagtacc gttgtgttg cgatcatctt cttcggtgag
60

tgattttccg atcttcttct ccgatttaga tctcctctac attgttgctt aatctcagaa
120

ccttttttcg ttgttcctgg atctgaatgt gtttgtttgc aatttcacga tcttaaaagg
180

ttagatctcg attggtattg acgattggaa tctttacgat ttcaggatgt ttatttgcgt
240

tgtcctctgc aatagaagag gctacgaagt taaggatcct gcaagatgtc actagatgtt
300

ctgcaaacac gaatttccgg cgtttctttt caaaattcaa cgttcaagca cccgcagtgg
360

ttgtcctcgg aggttatctg cctataggcg agaatacaggg tgtgaacagt acttgggtatt
420

gtgctgggtca acaccctaca gctagcggcg ttcacggcat ctttgtatca catattagag
480

gaggacatgg ttttgaaatt gggatctcac aggaaccttt tgatcctagt ggttatcaac
540

tttacttaca caaagcgact aatggtaata caaatgctac cgccaggctt agaatttgct
600

agtttccaag catcaagacc ttgggcccga ctgcaaaca c gatgttacg accggtagga
660

attgtctttt caataaggca attccagctc atatgtctga acattctggt gtaggtataa
720

catgggataa cgatagagtt actgtgtttt ccgataaaat ttactatttc tacttcaaga
780

acgactggtc gcgagtcgct actaagtgct ataatagtgg tggatgcgct atgcagtacg
840

tgtacgagcc aacatactat atgttgaatg ttacctctgc tggggaggac gggatttcct
900

atcaaccttg cacagccaat tgcacggat atgctgctaa tgtttttgct actgagccta
960

acggtcacat ccagaagga ttttctttca ataactgggt ccttcttagc aatgactcta
1020

ctctagtaca tggaaaagta gtgtcgaatc aaccgctgct cgtgaattgt cttcttgcta
1080

taccaaagat ctacggactt ggacaatttt tctcctttta ccaaactatc gacgggggtct
1140

gtaatggcgc tgctgttcaa agagccccg aggctcttcg atttaattt aatgatacca
1200

gcgttattct tgctgaaggc tcgatcgctt ttcatactgc tctggggact aacttttctt
1260

ttgtgtgcag taactcttct aatccacacc ttgccacttt tgctatgcca cttggggcca
1320

cacaggttcc atactactgt tttctgaagg tggacactta taattctact gtctacaagt
1380

ttctcgctgt ttggccacca actgtcagag aaatagttat tactaagtac ggtgatgtat
1440

atgttaacgg gtttgaatat ctacatctag gccttctcga tgctgttact atcaatttca
1500

ctggccatgg aacagacgat gatgttagtg gcttctggac gatagcctct acaaatttcg
1560

ttgatgctct tatagaagtc caaggaactg ctattcaacg tatecctttac tgcgacgac
1620

cagtctcaca gcttaaagt tctcagggtg cattcgatct cgatgatgga tttatccta
1680

tttcttcgag aaacctcctg tctcagcagc aaccaatate tttcgtgact cttccctctt
1740

ttaacgatca ttcttttggt aatataaccg tttcagcttc ctttggagga cattctggag
1800

ctaaccttat tgcttctgac actacgatta atgggttctc ctccttctgc gtcgacacaa
1860

gacaattcac catttctctt ttctacaatg ttactaatc ttatggatac gttccaagt
1920

ctcaagactc taattgcccg tttactcttc agtctgttaa cgattatctt tctttttcta
1980

agttttgtgt ttctacctt cttcttgctg ctgcttgac gattgatctt ttcggatacc
2040

cagagtttgg ctctggaggt aaattcacta gcctttatct ccagtttact aaggagagc
2100

taattactgg aactcaaaa cctcttgaag gagtgactga tgtttctttt atgacgcttg
2160

atgtgtgtac taagtatact atctacgggt tcaagggaga ggtattata actcttacta
2220

actcttcttt tcttgctggt gtttattaca ctacgactc tggacaatta cttgctttca
2280

aaaacgttac ttctggagcg gtttattctg tgactccatg ttcgttctcc gaacaggccg
2340

cttatgttga tgacgatatt gttggtgtca tttcaagcct ttctcatct acctttaaca
2400

gcaccaggga acttcagga tttttctatc ccggggcagt tggaagacca tgcctatat
2460

gtcctgcttg tgaagggtca ggtccctctg cttttatatt ccaccaaag ccgaaggata
2520

ccttgatgat ttcacgtaca ccacaagtta cttgtgttgt tgtggatggt tcacaagaaa
2580

atcctgaggt acaattcagc tggatatgtg atggggtaga agtgcacact gcacagactc
2640

gaccaaagga ggcccagttt aactcgactt atagagttgt ttctgttctc ccaatccaac
2700

acgaagattg gctgaagggc aaggaatttg aatgcaaggt taacaataaa gatctaccag
2760

caccaattac caggattatt tctaaggcaa aaggaccctc cagagagccc caagtttaca
2820

cattgtctcc ttctgctgag gagcttagta gaagtaaagt gagcattacc tgcttagtga
2880

cgggattcta cctccagac atcgacgtcg aatggaaatc taatgggtcaa cctgagccag
2940

aaghtaacta taggactact ccaccacaac aggacgtcga tggcacatac tttctttatt
3000

caaaacttgc tgtcgataag gcaagttggc aaagaggaga tccatttcag tgtgctgtaa
3060

tgcattgaggc tttgcataat cattatacac agaaatcagt ttctaaaaca caagggaaac
3120

atgatgagct c
3131

<210> 13
<211> 960
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Vector hoàn chỉnh

<400> 13
Ile Glu Glu Ala Thr Lys Leu Arg Ile Leu Gln Asp Val Thr Arg Cys
1 5 10 15
Ser Ala Asn Thr Asn Phe Arg Arg Phe Phe Ser Lys Phe Asn Val Gln
20 25 30
Ala Pro Ala Val Val Val Leu Gly Gly Tyr Leu Pro Ile Gly Glu Asn
35 40 45
Gln Gly Val Asn Ser Thr Trp Tyr Cys Ala Gly Gln His Pro Thr Ala
50 55 60
Ser Gly Val His Gly Ile Phe Val Ser His Ile Arg Gly Gly His Gly
65 70 75 80

Phe Glu Ile Gly Ile Ser Gln Glu Pro Phe Asp Pro Ser Gly Tyr Gln
 85 90 95
 Leu Tyr Leu His Lys Ala Thr Asn Gly Asn Thr Asn Ala Thr Ala Arg
 100 105 110
 Leu Arg Ile Cys Gln Phe Pro Ser Ile Lys Thr Leu Gly Pro Thr Ala
 115 120 125
 Asn Asn Asp Val Thr Thr Gly Arg Asn Cys Leu Phe Asn Lys Ala Ile
 130 135 140
 Pro Ala His Met Ser Glu His Ser Val Val Gly Ile Thr Trp Asp Asn
 145 150 155 160
 Asp Arg Val Thr Val Phe Ser Asp Lys Ile Tyr Tyr Phe Tyr Phe Lys
 165 170 175
 Asn Asp Trp Ser Arg Val Ala Thr Lys Cys Tyr Asn Ser Gly Gly Cys
 180 185 190
 Ala Met Gln Tyr Val Tyr Glu Pro Thr Tyr Tyr Met Leu Asn Val Thr
 195 200 205
 Ser Ala Gly Glu Asp Gly Ile Ser Tyr Gln Pro Cys Thr Ala Asn Cys
 210 215 220
 Ile Gly Tyr Ala Ala Asn Val Phe Ala Thr Glu Pro Asn Gly His Ile
 225 230 235 240
 Pro Glu Gly Phe Ser Phe Asn Asn Trp Phe Leu Leu Ser Asn Asp Ser
 245 250 255
 Thr Leu Val His Gly Lys Val Val Ser Asn Gln Pro Leu Leu Val Asn
 260 265 270
 Cys Leu Leu Ala Ile Pro Lys Ile Tyr Gly Leu Gly Gln Phe Phe Ser
 275 280 285
 Phe Asn Gln Thr Ile Asp Gly Val Cys Asn Gly Ala Ala Val Gln Arg
 290 295 300
 Ala Pro Glu Ala Leu Arg Phe Asn Ile Asn Asp Thr Ser Val Ile Leu
 305 310 315 320
 Ala Glu Gly Ser Ile Val Leu His Thr Ala Leu Gly Thr Asn Phe Ser
 325 330 335
 Phe Val Cys Ser Asn Ser Ser Asn Pro His Leu Ala Thr Phe Ala Met
 340 345 350
 Pro Leu Gly Ala Thr Gln Val Pro Tyr Tyr Cys Phe Leu Lys Val Asp
 355 360 365

Thr Tyr Asn Ser Thr Val Tyr Lys Phe Leu Ala Val Leu Pro Pro Thr
 370 375 380
 Val Arg Glu Ile Val Ile Thr Lys Tyr Gly Asp Val Tyr Val Asn Gly
 385 390 395 400
 Phe Glu Tyr Leu His Leu Gly Leu Leu Asp Ala Val Thr Ile Asn Phe
 405 410 415
 Thr Gly His Gly Thr Asp Asp Asp Val Ser Gly Phe Trp Thr Ile Ala
 420 425 430
 Ser Thr Asn Phe Val Asp Ala Leu Ile Glu Val Gln Gly Thr Ala Ile
 435 440 445
 Gln Arg Ile Leu Tyr Cys Asp Asp Pro Val Ser Gln Leu Lys Cys Ser
 450 455 460
 Gln Val Ala Phe Asp Leu Asp Asp Gly Phe Tyr Pro Ile Ser Ser Arg
 465 470 475 480
 Asn Leu Leu Ser His Glu Gln Pro Ile Ser Phe Val Thr Leu Pro Ser
 485 490 495
 Phe Asn Asp His Ser Phe Val Asn Ile Thr Val Ser Ala Ser Phe Gly
 500 505 510
 Gly His Ser Gly Ala Asn Leu Ile Ala Ser Asp Thr Thr Ile Asn Gly
 515 520 525
 Phe Ser Ser Phe Cys Val Asp Thr Arg Gln Phe Thr Ile Ser Leu Phe
 530 535 540
 Tyr Asn Val Thr Asn Ser Tyr Gly Tyr Val Ser Lys Ser Gln Asp Ser
 545 550 555 560
 Asn Cys Pro Phe Thr Leu Gln Ser Val Asn Asp Tyr Leu Ser Phe Ser
 565 570 575
 Lys Phe Cys Val Ser Thr Ser Leu Leu Ala Ser Ala Cys Thr Ile Asp
 580 585 590
 Leu Phe Gly Tyr Pro Glu Phe Gly Ser Gly Val Lys Phe Thr Ser Leu
 595 600 605
 Tyr Phe Gln Phe Thr Lys Gly Glu Leu Ile Thr Gly Thr Pro Lys Pro
 610 615 620
 Leu Glu Gly Val Thr Asp Val Ser Phe Met Thr Leu Asp Val Cys Thr
 625 630 635 640
 Lys Tyr Thr Ile Tyr Gly Phe Lys Gly Glu Gly Ile Ile Thr Leu Thr
 645 650 655

```

Asn Ser Ser Phe Leu Ala Gly Val Tyr Tyr Thr Ser Asp Ser Gly Gln
      660                      665                      670

Leu Leu Ala Phe Lys Asn Val Thr Ser Gly Ala Val Tyr Ser Val Thr
      675                      680                      685

Pro Cys Ser Phe Ser Glu Gln Ala Ala Tyr Val Asp Asp Asp Ile Val
      690                      695                      700

Gly Val Ile Ser Ser Leu Ser Ser Ser Thr Phe Asn Ser Thr Arg Glu
705                      710                      715                      720

Leu Pro Gly Phe Phe Tyr Pro Arg Ala Val Gly Arg Pro Cys Pro Ile
      725                      730                      735

Cys Pro Ala Cys Glu Gly Pro Gly Pro Ser Ala Phe Ile Phe Pro Pro
      740                      745                      750

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Gln Val Thr Cys
      755                      760                      765

Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asn Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp
      770                      775                      780

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Arg Pro Lys Glu
785                      790                      795                      800

Ala Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile Gln
      805                      810                      815

His Glu Asp Trp Leu Lys Gly Lys Glu Phe Glu Cys Lys Val Asn Asn
      820                      825                      830

Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Thr Arg Ile Ile Ser Lys Ala Lys Gly
      835                      840                      845

Pro Ser Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Ser Pro Ser Ala Glu Glu
      850                      855                      860

Leu Ser Arg Ser Lys Val Ser Ile Thr Cys Leu Val Thr Gly Phe Tyr
865                      870                      875                      880

Pro Pro Asp Ile Asp Val Glu Trp Lys Ser Asn Gly Gln Pro Glu Pro
      885                      890                      895

Glu Gly Asn Tyr Arg Thr Thr Pro Pro Gln Gln Asp Val Asp Gly Thr
      900                      905                      910

Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Ala Val Asp Lys Ala Ser Trp Gln Arg
      915                      920                      925

Gly Asp Pro Phe Gln Cys Ala Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
      930                      935                      940

```

Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Val	Ser	Lys	Thr	Gln	Gly	Lys	His	Asp	Glu	Leu
945					950					955					960