



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

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

(11)



1-0053868

(51)⁷ A61K 39/12; A61K 39/39

(13) B

(21) 1-2018-00636

(22) 27/07/2016

(86) PCT/EP2016/067850 27/07/2016

(87) WO2017/021242 09/02/2017

(30) 62/199,840 31/07/2015 US

(45) 25/11/2025 452

(43) 25/09/2018 366A

(73) INTERVET INTERNATIONAL B.V. (NL)

Wim de Körverstraat 35, 5831 AN Boxmeer, the Netherlands

(72) WEISS, Christian (DE); SIMARD, Nathalie C. (GB); KOESLING, Jan (DE).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) CHẾ PHẨM ĐIỀU BIẾN MIỄN DỊCH ĐỂ ĐIỀU TRỊ HOẶC NGĂN NGỪA SỰ
LÂY NHIỄM Ở CÁ

(21) 1-2018-00636

(57) Sáng chế nói chung đề cập đến chế phẩm điều biến miễn dịch để gây ra và cải thiện đáp ứng miễn dịch ở đối tượng loài thủy sinh. Cụ thể, chế phẩm điều biến miễn dịch này được dùng để gây ra đáp ứng miễn dịch nhằm gia tăng khả năng chống lại mầm bệnh ở đối tượng. Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm điều biến miễn dịch để cải thiện năng suất và khả năng sống sót của cá được nuôi trong môi trường nước.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế nói chung đề cập đến phương pháp tạo ra đáp ứng miễn dịch ở đối tượng bằng cách hoạt hóa miễn dịch bẩm sinh. Cụ thể, chế phẩm điều biến miễn dịch được sử dụng để kích thích miễn dịch bẩm sinh ở thành phần thuộc loài thủy sinh.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến phương pháp sử dụng plasmit kích thích miễn dịch để điều biến miễn dịch bẩm sinh ở đối tượng loài thủy sinh. Plasmit kích thích miễn dịch này có thể chứa trình tự axit nucleic có độ đồng nhất về mặt trình tự ít nhất là 80% với trình tự SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, hoặc kết hợp của chúng. Theo một số khía cạnh, plasmit kích thích miễn dịch này có thể chứa phân tử axit nucleic có độ đồng nhất về mặt trình tự ít nhất là 84% với trình tự SEQ ID NO: 4. Theo một số khía cạnh, plasmit kích thích miễn dịch này có thể chứa trình tự SEQ ID NO: 1. Theo một số khía cạnh, plasmit kích thích miễn dịch này có thể chứa trình tự SEQ ID NO: 4. Theo một số khía cạnh, plasmit kích thích miễn dịch này có thể chứa trình tự SEQ ID NO: 2. Theo một số khía cạnh, plasmit kích thích miễn dịch này có thể chứa trình tự SEQ ID NO: 3.

Theo các khía cạnh khác, plasmit kích thích miễn dịch có thể bao gồm trình tự axit nucleic có độ đồng nhất về mặt trình tự ít nhất là 80% với trình tự SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 hoặc tổ hợp của chúng. Theo một số khía cạnh, plasmit kích thích miễn dịch này có thể chứa phân tử axit nucleic có độ đồng nhất về mặt trình tự ít nhất là 84% với trình tự SEQ ID NO: 4. Theo một số khía cạnh, plasmit kích thích miễn dịch này có thể chứa trình tự SEQ ID NO: 1. Theo một số khía cạnh, plasmit kích thích miễn dịch này có thể chứa trình tự SEQ ID NO: 4. Theo một số khía cạnh, plasmit kích thích miễn dịch này có thể chứa trình tự SEQ ID NO: 2. Theo một số khía cạnh, plasmit kích thích miễn dịch này có thể chứa trình tự SEQ ID NO: 3.

Theo một số khía cạnh, tốt hơn là plasmit kích thích miễn dịch này không

chứa trình tự axit nucleic mã hóa gen đánh dấu có thể chọn lọc hoặc có thể sàng lọc chức năng hoặc có chiều dài đầy đủ. Theo các khía cạnh khác, plasmit kích thích miễn dịch này chứa trình tự axit nucleic mã hóa gen đánh dấu có thể chọn lọc hoặc có thể sàng lọc mà không phải là gen kháng chất kháng sinh.

Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến các các dược phẩm chứa bất kỳ trong số các plasmit kích thích miễn dịch, hoặc các trình tự ADN, được mô tả ở đây và chất mang dược dụng.

Sáng chế cũng đề cập đến các chế phẩm điều biến miễn dịch chứa chất dẫn cation liposom và bất kỳ trong số các plasmit kích thích miễn dịch, hoặc các trình tự ADN, được mô tả ở đây.

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề cập đến các phương pháp sử dụng các plasmit kích thích miễn dịch, hoặc các trình tự ADN, được mô tả ở đây. Phương pháp sử dụng thích hợp bao gồm việc dùng để điều trị cho đối tượng thuộc loài thủy sinh. Việc dùng để điều trị này bao gồm điều trị chẩn đoán, điều trị chống nhiễm trùng, và điều trị sau nhiễm trùng cho đối tượng hoặc các đối tượng.

Sáng chế đề cập đến các phương pháp kích thích hoặc gây ra đáp ứng miễn dịch ở đối tượng. Theo một số khía cạnh, các phương pháp này bao gồm việc kích thích đáp ứng miễn dịch ở đối tượng bằng cách cho đối tượng dùng chế phẩm điều biến miễn dịch được mô tả ở đây. Theo một số khía cạnh, các phương pháp này bao gồm việc kích thích đáp ứng miễn dịch ở đối tượng bằng cách cho đối tượng dùng plasmit kích thích miễn dịch, hoặc trình tự ADN được mô tả ở đây.

Các đối tượng và các dấu hiệu khác sẽ phần nào được thể hiện rõ ràng và phần nào được chỉ ra dưới đây.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

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

FIG. 1 thể hiện sơ đồ của plasmid pMB75.6 (SEQ ID NO: 2);

FIG. 2 thể hiện sơ đồ của plasmid pGCMB75.6 (SEQ ID NO: 1);

FIG. 3 thể hiện sơ đồ của plasmid pLacZ75.6 (SEQ ID NO: 4);

FIG. 4 minh họa dưới dạng đồ thị tỷ lệ phần trăm tử vong hàng ngày sau thí nghiệm kiểm chứng tính miễn dịch đối với bể cá M5.

FIG. 5 minh họa dưới dạng đồ thị tỷ lệ phần trăm tử vong hàng ngày sau thí nghiệm kiểm chứng tính miễn dịch đối với bể cá M6.

FIG. 6 thể hiện đường cong sống sót Kaplan-Meier đối với tỷ lệ tử vong phối hợp từ mỗi nhóm của nghiên cứu vaccin. Trục thẳng đứng là khả năng sống sót ở thời điểm DPC cụ thể (trục nằm ngang). Dấu chữ thập ở cuối đường cong thể hiện dữ liệu đã được kiểm duyệt (cá sống vượt quá 27 DPC). DPC: ngày sau thử nghiệm.

FIG. 7 mô tả so sánh từng cặp giữa 12 nhóm cá từ nghiên cứu vaccin, với các nhóm liên kết (được miêu tả dưới dạng các giao điểm được hiển thị bằng các vòng tròn màu xanh lá cây) cho thấy không có sự khác biệt đáng kể giữa chúng ($\alpha=0.05$).

FIG. 8 minh họa dưới dạng đồ thị tỷ lệ phần trăm sống sót tương đối của các nhóm nghiên cứu vaccin so với nhóm đối chứng được xử lý bằng dextroza 5%. Thực hiện so sánh giữa tỷ lệ tử vong lũy tích ở cuối thí nghiệm (RPSend). Sự khác biệt đáng kể về tỷ lệ tử vong lũy tích ($\alpha = 0,05$) giữa nhóm sử dụng dextroza 5 % và các nhóm xử lý khác được chỉ ra với dấu *.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo sáng chế, chế phẩm có khả năng gây ra đáp ứng miễn dịch ở đối tượng nhận, cũng như các phương pháp sử dụng, đã được phát hiện. Cụ thể là, sáng chế đề cập đến các chế phẩm axit nucleic, hoặc các chế phẩm điều biến miễn dịch, và các ứng dụng của chúng. Đã phát hiện ra rằng các chế phẩm điều biến miễn dịch có thể được sử dụng để điều biến hệ thống miễn dịch của thành phần thuộc loài thủy sinh. Sáng chế là đặc biệt hữu dụng trong việc điều trị và ngăn ngừa các bệnh lây nhiễm gây ra bởi các vi sinh vật, như, nhưng không chỉ giới hạn ở, virus, vi khuẩn, nấm mốc, nấm, nấm men, các ký sinh trùng và các loài vi sinh vật khác đã biết trong lĩnh

vực này. Các chế phẩm và các phương pháp sử dụng các chế phẩm điều biến miễn dịch được bàn luận chi tiết hơn như dưới đây.

I. Các chế phẩm

Các chế phẩm hữu dụng theo sáng chế, như các chế phẩm được mô tả ở đây, thường có thể được sử dụng làm liệu pháp chẩn đoán, liệu pháp điều trị chống nhiễm trùng, hoặc liệu pháp điều trị đối với các bệnh truyền nhiễm. Các chế phẩm này được đề cập ở đây là các chế phẩm điều biến miễn dịch. Các chế phẩm điều biến miễn dịch này chứa ít nhất một plasmit kích thích miễn dịch hoặc trình tự ADN kích thích miễn dịch, có khả năng gây ra đáp ứng miễn dịch ở đối tượng nhận. Theo một số khía cạnh, đáp ứng miễn dịch là đáp ứng miễn dịch bẩm sinh. Theo một số khía cạnh, đáp ứng miễn dịch là tổ hợp gồm đáp ứng miễn dịch bẩm sinh và đáp ứng miễn dịch thu được. Theo một số khía cạnh, các chế phẩm điều biến miễn dịch có thể còn chứa chất dẫn cấp liposom.

A. Các axit nucleic

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề cập đến các phân tử axit nucleic hữu dụng để điều trị hoặc ngăn ngừa các tác nhân gây ra bệnh truyền nhiễm. Các phân tử axit nucleic được mô tả ở đây có thể được chứa trong một plasmit kích thích miễn dịch, như ADN chuỗi đơn hoặc chuỗi kép tuyến tính, trình tự axit amin, axit ribonucleic (ARN), hoặc các kết hợp của chúng. Theo một số khía cạnh, sáng chế đề cập đến các phân tử axit nucleic, các vectơ, và các tế bào chủ (in vitro, in vivo, hoặc ex vivo) chứa plasmit kích thích miễn dịch hoặc trình tự ADN kích thích miễn dịch.

Các phân tử axit nucleic được mô tả trong bản mô tả này được làm giàu các motif CpG. Các motif CpG có thể cảm ứng sự kích thích miễn dịch thông qua các thụ thể giám sát miễn dịch bao gồm các thụ thể giống Toll đặc hiệu, như TLR9 và TLR21. Ngoài các phân tử axit nucleic được mô tả trong bản mô tả này cũng chứa chứa các motif kích thích miễn dịch không CpG. Theo một số khía cạnh, các phân tử axit nucleic chứa khoảng 2-20% motif CpG trên tần suất của motif CpG được mong đợi trong các trình tự axit nucleic ngẫu nhiên. Theo một số khía cạnh, các phân tử axit nucleic chứa khoảng 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20,

25, 30, 35, 40%, hoặc hơn các motif CpG trên tần suất của motif CpG được mong đợi trong các trình tự axit nucleic ngẫu nhiên. Theo một số khía cạnh, các phân tử axit nucleic chứa khoảng 10% các motif CpG trên tần suất của motif CpG được mong đợi trong các trình tự axit nucleic ngẫu nhiên. Theo một số khía cạnh, so với ADN động vật có xương sống, quan sát thấy mức làm giàu các motif CpG là nhiều hơn 10 lần. Theo một số khía cạnh, các phân tử axit nucleic chứa khoảng 2 đến 50 lần, hoặc nhiều hơn các motif CpG so với ADN của động vật có xương sống. Theo một số khía cạnh, các phân tử axit nucleic chứa khoảng 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 lần hoặc hơn các motif CpG so với ADN của động vật có xương sống.

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề cập đến các plasmit kích thích miễn dịch, hoặc các trình tự ADN, mà không chứa gen kháng chất kháng sinh. Các plasmit này có thể không chứa các gen đánh dấu có thể chọn lọc hoặc có thể sàng lọc bất kỳ. Ví dụ, plasmit pGCMB75.6 được mô tả ở đây không chứa các gen đánh dấu có thể chọn lọc hoặc có thể sàng lọc chức năng hoặc có chiều dài đầy đủ bất kỳ. Trình tự của pGCMB75.6 được cung cấp trên SEQ ID NO: 1.

Theo một số khía cạnh, tốt hơn là các plasmit kích thích miễn dịch được mô tả ở đây không chứa trình tự axit nucleic mã hóa gen đánh dấu có thể chọn lọc hoặc có thể sàng lọc chức năng hoặc có chiều dài đầy đủ. Theo một số khía cạnh, các plasmit kích thích miễn dịch này không chứa gen kháng chất kháng sinh. Ví dụ, các plasmit này không chứa gen kháng kanamycin. Theo một số khía cạnh, tốt hơn là các plasmit được mô tả ở đây không mã hóa chất sinh miễn dịch.

Theo một số khía cạnh, các plasmit kích thích miễn dịch này có thể chứa trình tự axit nucleic mã hóa gen đánh dấu có thể chọn lọc hoặc có thể sàng lọc mà không phải là gen kháng chất kháng sinh. Ví dụ, plasmit pLacZMB75.6 được mô tả ở đây chứa gen LacZ là gen đánh dấu có thể sàng lọc. Bản đồ của pLacZMB75.6 được cung cấp trên FIG. 3 và trình tự nucleotit của pLacZMB75.6 được cung cấp dưới dạng SEQ ID NO: 4. Như được thể hiện trên Fig. 3, pLacZMB75.6 là tương tự như pGCMB75.6, nhưng chứa gen đánh dấu có thể sàng lọc LacZ.

Cần hiểu rõ rằng các trình tự nucleotit của pMB75.6 (SEQ ID NO: 2 OR SEQ

ID NO: 3 (p MB75.6 với vị trí giới hạn AscI)), pGCMB75.6 (SEQ ID NO: 1) hoặc pLacZMB75.6 (SEQ ID NO: 4) plasmit có thể được thay đổi ở một mức độ nhất định mà không ảnh hưởng bất lợi đáng kể đến các đặc tính kích thích miễn dịch của chúng. Theo một số khía cạnh, sáng chế đề cập đến plasmit kích thích miễn dịch chứa trình tự axit nucleic có độ đồng nhất về mặt trình tự ít nhất là 89% với trình tự của pGCMB75.6 (SEQ ID NO: 1). Tốt hơn là plasmit kích thích miễn dịch chứa trình tự axit nucleic có ít nhất 75%, ít nhất 76%, ít nhất 77%, ít nhất 78%, ít nhất 79%, ít nhất 80%, ít nhất 81%, ít nhất 82%, ít nhất 83%, ít nhất 84%, ít nhất 85%, ít nhất 86%, ít nhất 87%, ít nhất 88%, ít nhất 89%, ít nhất 90%, ít nhất 91%, ít nhất 92%, ít nhất 93%, ít nhất 94%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng về trình tự với trình tự của pGCMB75.6 (SEQ ID NO: 1). Theo một số khía cạnh, tốt hơn nữa là plasmit kích thích miễn dịch chứa trình tự của pGCMB75.6 (SEQ ID NO: 1).

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề cập đến plasmit kích thích miễn dịch chứa trình tự axit nucleic có độ đồng nhất về mặt trình tự ít nhất là 84% với trình tự của pLacZMB75.6 (SEQ ID NO: 4). Tốt hơn là plasmit kích thích miễn dịch chứa trình tự axit nucleic có ít nhất 75%, ít nhất 76%, ít nhất 77%, ít nhất 78%, ít nhất 79%, ít nhất 80%, ít nhất 81%, ít nhất 82%, ít nhất 83%, ít nhất 84%, ít nhất 85%, ít nhất 86%, ít nhất 87%, ít nhất 88%, ít nhất 89%, ít nhất 90%, ít nhất 91%, ít nhất 92%, ít nhất 93%, ít nhất 94%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng về trình tự với trình tự của pLacZMB75.6 (SEQ ID NO: 4). Theo một số khía cạnh, tốt hơn nữa là plasmit kích thích miễn dịch chứa trình tự của pLacZMB75.6 (SEQ ID NO: 4).

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề cập đến plasmit kích thích miễn dịch chứa trình tự axit nucleic có độ đồng nhất về mặt trình tự ít nhất là 80% với trình tự của SEQ ID NO: 2. Plasmit kích thích miễn dịch tốt hơn là chứa trình tự axit nucleic có ít nhất 75%, ít nhất 76%, ít nhất 77%, ít nhất 78%, ít nhất 79%, ít nhất 80%, ít nhất 81%, ít nhất 82%, ít nhất 83%, ít nhất 84%, ít nhất 85%, ít nhất 86%, ít nhất 87%, ít nhất 88%, ít nhất 89%, ít nhất 90%, ít nhất 91%, ít nhất 92%, ít nhất 93%, ít nhất 94%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% độ

tương đồng về trình tự với trình tự của SEQ ID NO: 2. Theo một số khía cạnh, plasmit kích thích miễn dịch tốt hơn nữa là chứa trình tự của SEQ ID NO: 2.

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề cập đến plasmit kích thích miễn dịch chứa trình tự axit nucleic có độ đồng nhất về mặt trình tự ít nhất là 80% với trình tự của SEQ ID NO: 3. Plasmit kích thích miễn dịch tốt hơn là chứa trình tự axit nucleic có ít nhất 75%, ít nhất 76%, ít nhất 77%, ít nhất 78%, ít nhất 79%, ít nhất 80%, ít nhất 81%, ít nhất 82%, ít nhất 83%, ít nhất 84%, ít nhất 85%, ít nhất 86%, ít nhất 87%, ít nhất 88%, ít nhất 89%, ít nhất 90%, ít nhất 91%, ít nhất 92%, ít nhất 93%, ít nhất 94%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng về trình tự với trình tự của SEQ ID NO: 3. Theo một số khía cạnh, plasmit kích thích miễn dịch tốt hơn nữa là chứa trình tự của SEQ ID NO: 3.

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề cập đến plasmit kích thích miễn dịch chứa trình tự axit nucleic có ít nhất 89% độ tương đồng về trình tự với trình tự của pGCMB75.6 (SEQ ID NO: 1). Tốt hơn là plasmit kích thích miễn dịch bao gồm trình tự axit nucleic có ít nhất 75%, ít nhất 76%, ít nhất 77%, ít nhất 78%, ít nhất 79%, ít nhất 80%, ít nhất 81%, ít nhất 82%, ít nhất 83%, ít nhất 84%, ít nhất 85%, ít nhất 86%, ít nhất 87%, ít nhất 88%, ít nhất 89%, ít nhất 90%, ít nhất 91%, ít nhất 92%, ít nhất 93%, ít nhất 94%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng về trình tự với trình tự của pGCMB75.6 (SEQ ID NO: 1). Theo một số khía cạnh, tốt hơn nữa là plasmit kích thích miễn dịch chứa trình tự của pGCMB75.6 (SEQ ID NO: 1).

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề cập đến plasmit kích thích miễn dịch chứa trình tự axit nucleic có ít nhất 84% độ tương đồng về trình tự với trình tự của pLacZMB75.6 (SEQ ID NO: 4). Tốt hơn là plasmit kích thích miễn dịch bao gồm trình tự axit nucleic có ít nhất 75%, ít nhất 76%, ít nhất 77%, ít nhất 78%, ít nhất 79%, ít nhất 80%, ít nhất 81%, ít nhất 82%, ít nhất 83%, ít nhất 84%, ít nhất 85%, ít nhất 86%, ít nhất 87%, ít nhất 88%, ít nhất 89%, ít nhất 90%, ít nhất 91%, ít nhất 92%, ít nhất 93%, ít nhất 94%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng về trình tự với trình tự của pLacZMB75.6 (SEQ ID NO: 4). Theo một số khía cạnh, tốt hơn nữa là plasmit kích thích miễn dịch chứa

trình tự của pLacZMB75.6 (SEQ ID NO: 4).

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề cập đến plasmit kích thích miễn dịch bao gồm trình tự axit nucleic có ít nhất 80% độ tương đồng về trình tự với trình tự của SEQ ID NO: 2. Tốt hơn là plasmit kích thích miễn dịch bao gồm trình tự axit nucleic có ít nhất 75%, ít nhất 76%, ít nhất 77%, ít nhất 78%, ít nhất 79%, ít nhất 80%, ít nhất 81%, ít nhất 82%, ít nhất 83%, ít nhất 84%, ít nhất 85%, ít nhất 86%, ít nhất 87%, ít nhất 88%, ít nhất 89%, ít nhất 90%, ít nhất 91%, ít nhất 92%, ít nhất 93%, ít nhất 94%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng về trình tự với trình tự của SEQ ID NO: 2. Theo một số khía cạnh, plasmit kích thích miễn dịch tốt hơn nữa là bao gồm trình tự của SEQ ID NO: 2.

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề cập đến plasmit kích thích miễn dịch bao gồm trình tự axit nucleic có ít nhất 80% độ tương đồng về trình tự với trình tự của SEQ ID NO: 3. Tốt hơn là plasmit kích thích miễn dịch bao gồm trình tự axit nucleic có ít nhất 75%, ít nhất 76%, ít nhất 77%, ít nhất 78%, ít nhất 79%, ít nhất 80%, ít nhất 81%, ít nhất 82%, ít nhất 83%, ít nhất 84%, ít nhất 85%, ít nhất 86%, ít nhất 87%, ít nhất 88%, ít nhất 89%, ít nhất 90%, ít nhất 91%, ít nhất 92%, ít nhất 93%, ít nhất 94%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng về trình tự với trình tự của SEQ ID NO: 3. Theo một số khía cạnh, plasmit kích thích miễn dịch tốt hơn nữa là bao gồm trình tự của SEQ ID NO: 3.

Khía cạnh quan trọng khác của sáng chế đề xuất các trình tự ADN kích thích miễn dịch hoặc các plasmit kích thích miễn dịch có khả năng kích thích đáp ứng miễn dịch chứa các trình tự axit nucleic mà lai trong các điều kiện nghiêm ngặt với SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, hoặc SEQ ID NO: 4. Các trình tự axit nucleic thích hợp bao gồm các trình tự mà tương đồng, về cơ bản là tương tự, hoặc giống với các axit nucleic theo sáng chế. Theo một số khía cạnh, các trình tự axit nucleic tương đồng có mức tương tự về trình tự ít nhất khoảng 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% với SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung tương ứng. Theo các khía cạnh khác, các trình tự axit nucleic tương đồng có mức tương tự về trình tự ít nhất khoảng 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%

81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với SEQ ID NO: 4 hoặc trình tự bổ sung tương ứng. Theo các khía cạnh khác, các trình tự axit nucleic tương đồng có mức tương tự về trình tự ít nhất khoảng 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80% 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với SEQ ID NO: 2 hoặc trình tự bổ sung tương ứng. Theo các khía cạnh khác, các trình tự axit nucleic tương đồng có mức tương tự về trình tự ít nhất khoảng 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80% 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với SEQ ID NO: 3 hoặc trình tự bổ sung tương ứng. Độ giống nhau về mặt trình tự có thể được tính bằng cách sử dụng một số thuật toán đã biết trong lĩnh vực này, như BLAST, được mô tả trong tài liệu của Altschul, S. F., et al., J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990. Các axit nucleic có thể khác nhau về trình tự so với các axit nucleic nêu trên do sự thoái hóa của mã di truyền. Nói chung, trình tự tham chiếu sẽ là 18 nucleotit, thông thường hơn là 30 nucleotit hoặc hơn thế, và có thể chứa toàn bộ trình tự axit nucleic của chế phẩm nhằm mục đích so sánh.

Các trình tự nucleotit mà có thể lai với SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, hoặc SEQ ID NO: 4 được dự tính ở đây. Các điều kiện lai nghiêm ngặt bao gồm các điều kiện như lai ở 50°C hoặc cao hơn và SSC 0,1X (dung dịch natri clorua 15mM/dung dịch natri xitrat 1,5mM). Ví dụ khác là ủ qua đêm ở 42°C trong dung dịch formamit 50%, SSC 5X (dung dịch NaCl 150mM, dung dịch trinatri xitrat 15mM), dung dịch natri phosphat 50mM (pH 7,6), dung dịch Denhardt 5X, dung dịch dextran sulfat 10%, và dung dịch ADN tinh trùng cá hồi đã được cắt, làm biến tính 20µg/ml, sau đó rửa trong dung dịch SSC 0,1X ở khoảng 65°C. Các điều kiện lai nghiêm ngặt được lấy làm ví dụ minh họa là các điều kiện lai mà có độ nghiêm ngặt ít nhất là khoảng 80%, 85%, 90%, hoặc 95% so với các điều kiện cụ thể nêu trên. Các điều kiện lai nghiêm ngặt khác là đã biết trong lĩnh vực này và cũng có thể được áp dụng để đồng nhất hóa các phần tương đồng của các axit nucleic theo sáng chế (Các phương thức hiện tại trong ấn phẩm Molecular Biology, Unit 6, pub. John Wiley & Sons, N.Y. 1989).

Các nucleotit đột biến của các phân tử ADN được mô tả ở đây có thể được sử dụng, với điều kiện là các thể đột biến chứa các trình tự axit nucleic vẫn có khả năng kích thích đáp ứng miễn dịch bẩm sinh như được mô tả ở đây. Trình tự ADN của thể đột biến như vậy thường sẽ khác ở một hoặc nhiều nucleotit hoặc axit amin. Các thay đổi về trình tự có thể là sự thay thế, sự xen đoạn, sự xóa bỏ, hoặc kết hợp của chúng. Các kỹ thuật về đột biến gen được tách dòng là đã được biết đến trong lĩnh vực này. Các phương pháp đột biến đặc hiệu về vị trí có thể được thấy trong các bài báo của Gustin et al., *Biotechniques* 14:22, 1993; Barany, *Gene* 37:111-23, 1985; Colicelli et al., *Mol. Gen. Genet.* 199:537-9, 1985; và Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, CSH Press 1989, pp. 15.3-15.108 và tất cả các bài báo này được đính kèm theo đây bằng cách viện dẫn. Tóm lại, sáng chế đề cập đến các trình tự axit nucleic có khả năng kích thích đáp ứng miễn dịch bẩm sinh ở đối tượng và các biến thể hoặc các thể đột biến của chúng. Ngoài ra, sáng chế còn bao gồm các ARN trung gian được mã hóa bởi các trình tự axit nucleic đã được mô tả, cũng như các trình tự axit amin thu được bất kỳ được mã hóa.

Theo một số khía cạnh, nếu trình tự nucleotit của plasmit kích thích miễn dịch khác với các trình tự được nêu trong các SEQ ID NO. 1, 2, 3, và 4, các dinucleotit CpG trong plasmit tốt hơn là được giữ nguyên. Cách khác, nếu trình tự nucleotit của plasmit được biến đổi khiến cho dinucleotit CpG bị loại bỏ thì trình tự của plasmit có thể được biến đổi ở vị trí khác sao cho tổng số dinucleotit CpG trong plasmit vẫn là như cũ. Các dinucleotit CpG khác ngoài các dinucleotit đã có sẵn trong các trình tự nucleotit của pGCMB75.6 hoặc pLacZMB75.6 cũng có thể được đưa vào plasmit. Do đó, ví dụ, tốt hơn là các plasmit kích thích miễn dịch được mô tả ở đây chứa ít nhất là khoảng 200, ít nhất là khoảng 220, ít nhất là khoảng 240, ít nhất là khoảng 260, ít nhất là khoảng 270, ít nhất là khoảng 275, ít nhất là khoảng 280, ít nhất là khoảng 283, ít nhất là khoảng 285, hoặc ít nhất là khoảng 288 dinucleotit CpG. Ví dụ, plasmit kích thích miễn dịch có thể chứa 283 dinucleotit CpG.

Theo một số khía cạnh, trong đó trình tự nucleotit của plasmit kích thích miễn dịch khác biệt với các trình tự được đề xuất ở đây, các loại motif CpG trong plasmit là được biến đổi để điều biến sự hoạt hóa tổng hợp của các phân tử theo dõi ADN

tương bào. Ví dụ, số lượng các motif CpG kích thích miễn dịch có thể được tăng lên để gia tăng sự hoạt hóa của các các phân tử theo dõi ADN bào tương cụ thể đáp ứng với ngưỡng cụ thể của plasmid/ADN kích thích miễn dịch. Theo cách ví dụ, số lượng các motif CpG không kích thích miễn dịch có thể được tăng lên để làm giảm sự hoạt hóa của các phân tử theo dõi ADN bào tương cụ thể và/hoặc làm tăng sự hoạt hóa của các phân tử theo dõi ADN khác.

Cụ thể là, sáng chế đề cập đến các các dược phẩm chứa bất kỳ trong số các plasmid kích thích miễn dịch, hoặc các trình tự ADN, được mô tả ở đây và chất mang dược dụng.

B. Chất điều biến miễn dịch

Các chế phẩm điều biến miễn dịch thích hợp để sử dụng với các plasmid kích thích miễn dịch được mô tả ở đây được mô tả trong các công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2012/0064151 A1 và 2013/0295167 A1, nội dung của các công bố đơn này được kết hợp theo đây bằng cách tham khảo đến toàn bộ nội dung của chúng.

Chế phẩm điều biến miễn dịch chứa chất dẫn cấp cation liposom và ít nhất một trong số các plasmid kích thích miễn dịch, hoặc các trình tự ADN, được mô tả ở đây.

Chất dẫn cấp liposom thích hợp bao gồm chế phẩm lipid mà có khả năng cấp các phân tử axit nucleic đến các mô của đối tượng được điều trị. Tốt hơn là, chất dẫn cấp liposom có khả năng vẫn ổn định trong đối tượng với thời gian đủ để cấp phân tử axit nucleic và/hoặc chất sinh học. Ví dụ, chất dẫn cấp liposom là ổn định trong đối tượng sử dụng trong thời gian ít nhất là khoảng năm phút, trong ít nhất là khoảng 1 giờ, hoặc trong ít nhất là khoảng 24 giờ.

Chất dẫn phân phát liposom theo sáng chế bao gồm chế phẩm lipid mà có khả năng dung hợp với màng huyết tương của tế bào để phân phát phân tử axit nucleic vào trong tế bào. Nếu phân tử axit nucleic mã hóa một hoặc nhiều protein thì tốt hơn là phức hợp axit nucleic:liposom có hiệu suất chuyển nhiễm ít nhất là khoảng 1 picogram (pg) protein được biểu hiện trên miligram (mg) protein toàn bộ mô trên microgram (μ g) axit nucleic được cấp. Ví dụ, hiệu suất chuyển nhiễm của phức hợp

axit nucleic: liposom có thể ít nhất là khoảng 10pg protein được biểu thị trên mg protein toàn bộ mô trên μg axit nucleic được cấp; hoặc ít nhất là khoảng 50pg protein được biểu hiện trên mg protein toàn bộ mô trên μg axit nucleic được cấp. Hiệu suất chuyển nhiễm của phức hợp có thể thấp đến mức 1 femtogram (fg) protein được biểu hiện trên mg protein toàn bộ mô trên μg axit nucleic được cấp, trong đó các lượng nêu trên được ưu tiên hơn.

Chất dẫn cấp liposom được ưu tiên theo sáng chế có đường kính nằm trong khoảng từ 100 đến 500 nanomet (nm). Ví dụ, chất dẫn cấp liposom có thể có đường kính nằm trong khoảng từ 150 đến 450nm hoặc nằm trong khoảng từ 200 đến 400nm.

Các liposom thích hợp bao gồm liposom bất kỳ, như các liposom thường được dùng trong, ví dụ, các phương pháp cấp gen đã được chuyên gia có trình độ trung bình trong lĩnh vực này biết đến. Các chất dẫn cấp liposom được ưu tiên bao gồm các lipit dạng túi nhiều phiến (multilamellar vesicle: MLV) và các lipit được ép đùn. Các phương pháp sản xuất MLV là đã được biết rõ trong lĩnh vực này. Các chất dẫn cấp liposom được ưu tiên hơn bao gồm các liposom có thành phần lipit đa cation (tức là, các cation liposom) và/hoặc các liposom có khung cholesterol liên hợp với polyetylen glycol. Các chế phẩm liposom cation được lấy làm ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimetylamonium clorua (DOTMA) và cholesterol, N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimetylamonium clorua (DOTAP) và cholesterol, 1-[2-(oleoyloxy)ethyl]-2-oleyl-3-(2-hydroxyethyl)-imidazolium clorua (DOTIM) và cholesterol, dimetyldioctadexylamonium bromua (DDAB) và cholesterol, và các kết hợp của chúng. Chế phẩm liposom được ưu tiên nhất để sử dụng làm chất dẫn cấp bao gồm DOTIM và cholesterol.

Phân tử axit nucleic thích hợp bao gồm bất kỳ trong số các plasmit kích thích miễn dịch được mô tả ở đây. Trình tự axit nucleic mã hóa mã hóa ít nhất là một phần của protein hoặc peptit, trong khi đó trình tự không mã hóa không mã hóa phần bất kỳ của protein hoặc peptit. Theo sáng chế, các axit nucleic "không mã hóa" có thể bao gồm các vùng điều hòa của đơn vị phiên mã, như vùng khởi điểm. Thuật ngữ, "vector trống" có thể được sử dụng thay thế cho thuật ngữ "không mã hóa", và cụ thể

là để chỉ trình tự axit nucleic không chứa phần mã hóa protein, như vector plasmid không có đoạn đính gen. Sự biểu hiện của protein được mã hóa bởi plasmid được mô tả trong bản mô tả này là không cần thiết để gây ra đáp ứng miễn dịch; vì vậy các plasmid không cần chứa trình tự mã hóa bất kỳ được liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự kiểm soát phiên mã. Tuy nhiên, có thể đạt được các mặt thuận lợi nữa (tức là, độ miễn dịch được tăng cường và đặc hiệu với kháng nguyên) bằng cách cho chế phẩm chứa trình tự axit nucleic (ADN hoặc ARN) mã hóa chất sinh miễn dịch và/ hoặc xytokin. Trình tự axit nucleic mã hóa chất sinh miễn dịch và/hoặc xytokin này có thể được chứa trong các plasmid kích thích miễn dịch được mô tả ở đây, hoặc có thể được chứa trong axit nucleic riêng biệt (ví dụ, plasmid riêng biệt) trong chế phẩm.

Có thể đạt được sự tạo phức liposom với các plasmid kích thích miễn dịch, hoặc trình tự ADN kích thích miễn dịch, được mô tả ở đây bằng cách sử dụng các phương pháp chuẩn trong lĩnh vực này hoặc như được mô tả trong patent Mỹ số 6,693,086, toàn bộ nội dung của patent này được đính kèm theo đây bằng cách viện dẫn. Nồng độ thích hợp của plasmid để bổ sung vào liposom bao gồm nồng độ hữu hiệu để cấp lượng plasmid đủ cho đối tượng sao cho gây ra được đáp ứng miễn dịch toàn thân. Ví dụ, plasmid với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 μ g đến 10 μ g có thể được kết hợp với liposom với lượng khoảng 8nmol, plasmid với lượng nằm trong khoảng từ 0,5 μ g đến 5 μ g có thể được kết hợp với liposom với lượng khoảng 8nmol, hoặc plasmid với lượng khoảng 1,0 μ g có thể được kết hợp với liposom với lượng khoảng 8nmol. Tỷ lệ plasmid/lipit (μ gplasmid:nmol lipit) trong chế phẩm có thể ít nhất là khoảng 1:1 plasmid:lipit theo trọng lượng (ví dụ, 1 μ g plasmid:1nmol lipit). Ví dụ, tỷ lệ plasmid/lipit có thể ít nhất là khoảng 1:5, ít nhất là khoảng 1:10, hoặc ít nhất là khoảng 1:20. Các tỷ lệ được biểu thị ở đây được tính theo lượng lipit cation trong chế phẩm, và không tính theo tổng lượng lipit trong chế phẩm. Tỷ lệ plasmid/lipit trong chế phẩm theo sáng chế thích hợp là nằm trong khoảng từ 1:1 đến khoảng 1:80 plasmid:lipit theo trọng lượng; nằm trong khoảng từ 1:2 đến khoảng 1:40 plasmid:lipit theo trọng lượng; nằm trong khoảng từ 1:3 đến khoảng 1:30 plasmid:lipit theo trọng lượng; hoặc nằm trong khoảng từ 1:6 đến khoảng 1:15 plasmid:lipit theo trọng lượng.

C. Tác nhân sinh học

Chế phẩm bất kỳ trong số các chế phẩm điều biến miễn dịch được mô tả ở đây có thể còn chứa ít nhất là một tác nhân sinh học, ngoài chất dẫn cấp liposom và ít nhất là một trong số các plasmit được mô tả ở đây.

Các tác nhân sinh học thích hợp là các tác nhân mà hữu hiệu trong việc ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh. Các tác nhân sinh học này bao gồm các protein tăng cường miễn dịch, các chất sinh miễn dịch, các vacxin, các chất kháng vi sinh vật hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng. Các protein tăng cường miễn dịch thích hợp là các protein mà đã được biết để tăng cường khả năng miễn dịch. Bằng cách ví dụ không giới hạn, xytokin, mà bao gồm họ các protein, là họ protein tăng cường khả năng miễn dịch đã biết. Các chất sinh miễn dịch thích hợp là các protein mà gây ra đáp ứng miễn dịch thể dịch và/hoặc đáp ứng miễn dịch tế bào sao cho việc dùng chất sinh miễn dịch cho đối tượng tạo đáp ứng miễn dịch đặc hiệu với chất sinh miễn dịch kháng lại các protein giống hoặc tương tự mà được bắt gặp trong mô của đối tượng. Chất sinh miễn dịch có thể bao gồm kháng nguyên gây bệnh được biểu hiện bởi vi khuẩn, virus, ký sinh trùng hoặc nấm. Các kháng nguyên được ưu tiên bao gồm các kháng nguyên có nguồn gốc từ các vi sinh vật mà gây bệnh truyền nhiễm ở đối tượng. Theo sáng chế, chất sinh miễn dịch có thể là phần bất kỳ của protein, vốn có hoặc có nguồn gốc tổng hợp, mà gây ra đáp ứng miễn dịch thể dịch và/hoặc đáp ứng miễn dịch tế bào. Như vậy, kích cỡ kháng nguyên hoặc chất sinh miễn dịch có thể nhỏ như khoảng 5–12 axit amin và lớn như protein có chiều dài đầy đủ, bao gồm các kích cỡ bất kỳ trong khoảng này. Kháng nguyên có thể là multime protein hoặc protein dung hợp. Kháng nguyên có thể là kháng nguyên được tinh chế. Cách khác, protein tăng cường miễn dịch hoặc chất sinh miễn dịch có thể được mã hóa bằng plasmit kích thích miễn dịch hoặc bằng axit nucleic khác có trong chế phẩm điều biến miễn dịch. Nếu protein tăng cường miễn dịch hoặc chất sinh miễn dịch được mã hóa bằng phân tử axit nucleic trong chế phẩm điều biến miễn dịch thì trình tự axit nucleic mã hóa protein tăng cường miễn dịch hoặc chất sinh miễn dịch có liên kết về mặt hoạt động với trình tự kiểm soát phiên mã, do vậy chất sinh miễn dịch được biểu hiện ở mô của đối tượng, nhờ đó gây ra đáp ứng miễn dịch đặc hiệu với chất sinh miễn dịch ở đối

tượng, ngoài đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu. Các kỹ thuật sàng lọc yếu tố gây miễn dịch, như yếu tố gây miễn dịch kháng nguyên gây bệnh hoặc hoạt tính xytokin đã được chuyên gia trong lĩnh vực này biết đến và bao gồm nhiều loại thử nghiệm *in vitro* và *in vivo*.

Nếu tác nhân sinh học là vaccin thì vaccin có thể bao gồm vaccin virus, vi khuẩn hoặc ký sinh trùng sống, gây nhiễm hoặc vaccin virus, vi khuẩn, hoặc ký sinh trùng chết, được vô hoạt hoặc vaccin dưới đơn vị, hoặc vaccin bất kỳ đã biết trong lĩnh vực. Một hoặc nhiều vaccin có thể được sử dụng kết hợp với chế phẩm điều biến miễn dịch theo sáng chế. Vaccin thích hợp bao gồm các vaccin đã biết trong lĩnh vực dùng cho loài thủy sinh.

Tác nhân sinh học có thể là chất kháng vi sinh vật. Các chất kháng vi sinh vật thích hợp bao gồm: các quinolon, tốt hơn là các floquinolon, β -lactam, và các chất kháng sinh macrolit-lincosamit-streptogramin (MLS).

Các quinolon thích hợp bao gồm benofloxacin, binfloxacin, cinoxacin, ciprofloxacin, clinafloxacin, danofloxacin, difloxacin, enoxacin, enrofloxacin, fleroxacin, gemifloxacin, ibafloxacin, levofloxacin, lomefloxacin, marbofloxacin, moxifloxacin, norfloxacin, ofloxacin, orbifloxacin, pazufloxacin, pradofloxacin, perfloxacin, sarafloxacin, sparfloxacin, temafloxacin, và tosufloxacin. Các floquinolon được ưu tiên bao gồm ciprofloxacin, danofloxacin, enrofloxacin, moxifloxacin, và pradofloxacin. Các naphthyridon thích hợp bao gồm axit nalidixic.

Các β -lactam thích hợp bao gồm các penixilin (ví dụ, amoxixilin, ampixilin, azloxilin, benzathin penixilin, benzylpenixilin, carbenixilin, cloxaxilin, co-amoxiclav [tức là amoxixilin/axit clavulanic], dicloxaxilin, flucloxaxilin, methixilin, mezloxilin, nafxilin, oxaxilin, phenoxymetylpenixilin, piperaxilin, procain penixilin, temoxilin, và ticarxilin); các cephalosporin (ví dụ, cefaclor, cefalonium, cefamandol, cefapririn, cefazolin, cefepim, cefixim, cefotaxim, cefoxitin, cefpirom, cefpodoxim, cefquinom, ceftazidim, ceftiofur, ceftriaxon, cefuroxim, cephalixin, cephalothin, và defotetan); các carbapenem và các penem (ví dụ, doripenem, ertapenem, faropenem, imipenem, và meropenem); các monobactam ví dụ aztreonam, nocardicin A, tabtoxinin- β -lactam, và tigemonam); và các chất ức chế β -lactamaza ví dụ axit clavulanic,

sulbactam, và tazobactam). Các β -lactam được ưu tiên bao gồm các cephalosporin, đặc biệt là, cefazolin.

Các chất kháng sinh MLS thích hợp bao gồm clindamycin, lincomycin, pirlimycin, và các chất kháng sinh macrolit bất kỳ. Chất kháng sinh lincosamit được ưu tiên là pirlimycin.

Các chất kháng vi sinh vật khác bao gồm các aminoglycosit, clopidol, dimetridazol, erythromycin, framycetin, furazolidon, halofuginon, 2-pyridon, robenidin, sulfonamit, tetracyclin, trimethoprim, các pleuromutilin khác nhau ví dụ tiamulin và valnemulin), và streptomycin khác nhau ví dụ monensin, narasin, và salinomycin).

II. Các phương pháp

Mục đích của sáng chế là đề xuất các chế phẩm điều biến miễn dịch, các plasmit (hoặc trình tự ADN) kích thích miễn dịch, và các phương pháp kích thích miễn dịch và tạo ra khả năng miễn dịch bảo vệ cho những đối tượng chưa bị nhiễm, khả năng miễn dịch bảo vệ cho đối tượng đã bị nhiễm, khả năng miễn dịch tăng cường cho đối tượng chưa bị nhiễm, khả năng miễn dịch tăng cường cho đối tượng đã bị nhiễm, khả năng miễn dịch trị liệu cho đối tượng bị nhiễm, hoặc tổ hợp của chúng. Do vậy, các chế phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng để gây miễn dịch phòng bệnh cho đối tượng hoặc được sử dụng để điều trị bệnh ở đối tượng. Các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này bao gồm việc dùng plasmit kích thích miễn dịch, hoặc trình tự ADN, được mô tả trong bản mô tả này cho đối tượng, và kích thích hệ miễn dịch ở đối tượng.

A. Phương pháp kích thích hệ miễn dịch của đối tượng

Sáng chế đề cập đến phương pháp kích thích, hoặc tăng cường, hệ miễn dịch, ở đối tượng nhận. Các phương pháp này bao gồm việc cho đối tượng dùng lượng hữu hiệu của chế phẩm điều biến miễn dịch được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số khía cạnh, chế phẩm điều biến miễn dịch kích thích đáp ứng miễn dịch ở đối tượng nhận và đáp ứng miễn dịch này giúp chống lại sự lây nhiễm. Theo một số khía cạnh, chế phẩm điều biến miễn dịch hoạt hóa các phân tử theo dõi ADN bào tương.

Theo một số khía cạnh, chế phẩm điều biến miễn dịch làm tăng cường mức độ hoạt động của ít nhất là một tác nhân sinh học như vacxin, khi được dùng trước vacxin này, được dùng đồng thời với vacxin, được dùng sau khi chủng ngừa, hoặc được trộn với vacxin. Theo một số khía cạnh, các phương pháp này đề xuất chiến lược điều trị bệnh mới để bảo vệ đối tượng sử dụng tránh bị các bệnh truyền nhiễm và điều trị bệnh ở cộng đồng bị bệnh truyền nhiễm. Theo một số khía cạnh, các phương pháp này đề xuất phương pháp bảo vệ nhanh hơn, dài hơn và tốt hơn chống lại bệnh khi chất điều biến miễn dịch được sử dụng kết hợp với vacxin, so với việc sử dụng vacxin mà không cùng với chế phẩm điều biến miễn dịch.

Đáp ứng miễn dịch có thể được hoạt hóa ở đối tượng nhận bằng cách dùng lượng hữu hiệu của chế phẩm điều biến miễn dịch, chế phẩm này chứa bất kỳ trong số các chất dẫn cấp liposom được mô tả ở đây, bất kỳ trong số các plasmit kích thích miễn dịch (hoặc các trình tự ADN) được mô tả ở đây, và bất kỳ trong số các tác nhân sinh học được mô tả ở đây. Dự tính là tác nhân sinh học có thể được trộn với hoặc được dùng đồng thời với chất điều biến miễn dịch hoặc độc lập với chất điều biến miễn dịch. Việc dùng độc lập có thể trước hoặc sau khi dùng chất điều biến miễn dịch. Cũng dự tính là việc dùng nhiều hơn một lần chất điều biến miễn dịch hoặc tác nhân sinh học có thể được áp dụng. Hơn nữa, nhiều hơn một tác nhân sinh học có thể được dùng đồng thời với chất điều biến miễn dịch, dùng trước khi dùng chất điều biến miễn dịch, dùng sau khi dùng chất điều biến miễn dịch, hoặc dùng cùng lúc với chất điều biến miễn dịch.

B. Phương pháp cải thiện khả năng sống sót của đối tượng

Sáng chế đề cập đến phương pháp cải thiện khả năng sống sót của thành phần thuộc loài thủy sinh. Các phương pháp cải thiện khả năng sống sót bao gồm việc cho đối tượng dùng lượng hữu hiệu của chế phẩm điều biến miễn dịch được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số khía cạnh, các phương pháp này tạo ra khả năng sống sót được cải thiện của đối tượng nhận so với đối tượng không nhận chế phẩm điều biến miễn dịch.

C. Phương pháp cải thiện sản lượng

Sáng chế đề cập đến phương pháp cải thiện sản lượng của thành phần thuộc loài thủy sinh được nuôi trong môi trường nước. Phương pháp cải thiện sản lượng bao gồm việc cho đối tượng dùng lượng hữu hiệu của chế phẩm điều biến miễn dịch được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số khía cạnh, phương pháp này tạo ra năng suất được cải thiện của đối tượng nhận so với đối tượng không nhận chế phẩm điều biến miễn dịch. Các phương pháp đánh giá năng suất được cải thiện là đã biết trước đây. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ nhận ra rằng sản lượng được cải thiện có thể được xác định khi so sánh sức khỏe, trọng lượng, kích thước, chất lượng thịt, và các thông số khác giữa các đối tượng nhận chế phẩm điều biến miễn dịch và các đối tượng không nhận chế phẩm điều biến miễn dịch.

D. Phương pháp cải thiện hiệu quả sử dụng thức ăn

Sáng chế đề cập đến phương pháp cải thiện hiệu quả sử dụng thức ăn của thành phần thuộc loài thủy sinh được nuôi trong môi trường nước. Phương pháp cải thiện hiệu quả sử dụng thức ăn bao gồm việc cho đối tượng dùng lượng hữu hiệu của chế phẩm điều biến miễn dịch được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số khía cạnh, phương pháp này tạo ra hiệu quả sử dụng thức ăn được cải thiện của đối tượng nhận so với đối tượng không nhận chế phẩm điều biến miễn dịch. Các phương pháp đánh giá hiệu quả sử dụng thức ăn là đã biết trước đây. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ nhận ra rằng hiệu quả sử dụng thức ăn được cải thiện có thể được xác định khi so sánh sức khỏe, trọng lượng, kích thước, chất lượng thịt, và các thông số khác giữa các đối tượng nhận chế phẩm điều biến miễn dịch và các đối tượng không nhận chế phẩm điều biến miễn dịch.

E. Phương pháp cải thiện tỷ lệ sống sót

Sáng chế đề cập đến phương pháp cải thiện tỷ lệ sống sót của thành phần thuộc loài thủy sinh được nuôi trong môi trường nước. Phương pháp cải thiện tỷ lệ sống sót bao gồm việc cho đối tượng dùng lượng hữu hiệu của chế phẩm điều biến miễn dịch được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số khía cạnh, phương pháp này tạo ra tỷ lệ sống sót được cải thiện của đối tượng nhận so với đối tượng không nhận chế phẩm điều biến miễn dịch. Các phương pháp đánh giá tỷ lệ sống sót được cải thiện là đã biết trước đây. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ nhận ra

rằng tỷ lệ sống sót được cải thiện có thể được xác định khi so sánh sức khỏe, trọng lượng, kích thước, chất lượng thịt, và các thông số khác giữa các đối tượng nhận chế phẩm điều biến miễn dịch và các đối tượng không nhận chế phẩm điều biến miễn dịch.

Lượng hữu hiệu của bất kỳ trong số các chế phẩm điều biến miễn dịch được mô tả ở đây có thể được dùng cho đối tượng. Lượng hữu hiệu là đủ để hoạt hóa đáp ứng miễn dịch ở đối tượng nhận. Các phương pháp đo sự hoạt hóa như vậy là đã được biết đến trong lĩnh vực. Ngoài ra, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng lượng hữu hiệu sẽ tùy thuộc vào tuổi tác, thể trọng, loài của đối tượng và giai đoạn nhiễm bệnh, cũng như các yếu tố khác đã biết trong lĩnh vực này. Các lượng hữu hiệu thích hợp có thể nằm trong khoảng từ 0,1µg đến 1000µg trên mỗi đối tượng. Theo một số khía cạnh, lượng hữu hiệu có thể nằm trong khoảng từ 0,1 µg đến khoảng 10 µg, từ khoảng 0,1 µg đến khoảng 5 µg, từ khoảng 0,5 µg đến khoảng 5 µg, từ khoảng 0,25 µg đến khoảng 5 µg, từ khoảng 0,05 µg đến khoảng 10 µg, từ khoảng 5 µg đến khoảng 15 µg, từ khoảng 10 µg đến khoảng 15 µg, từ khoảng 10 µg đến khoảng 20 µg, từ khoảng 20 µg đến khoảng 30 µg, từ khoảng 30 µg đến khoảng 40 µg, từ khoảng 40 µg đến khoảng 50 µg, từ khoảng 50 µg đến khoảng 70 µg, từ khoảng 70 µg đến khoảng 90 µg, từ khoảng 50 µg đến khoảng 100 µg, từ khoảng 100 µg đến khoảng 150 µg, từ khoảng 150 µg đến khoảng 200 µg, từ khoảng 200 µg đến khoảng 250 µg, từ khoảng 250 µg đến khoảng 300 µg, từ khoảng 300 µg đến khoảng 350 µg, từ khoảng 350 µg đến khoảng 400 µg, từ khoảng 400 µg đến khoảng 450 µg, từ khoảng 450 µg, đến khoảng 500 µg, từ khoảng 500 µg đến khoảng 550 µg, từ khoảng 550 µg đến khoảng 600 µg, từ khoảng 600 µg đến khoảng 650 µg, từ khoảng 650 µg đến khoảng 700 µg, từ khoảng 700 µg đến khoảng 750 µg, từ khoảng 750 µg đến khoảng 800 µg, từ khoảng 800 µg đến khoảng 850 µg, từ khoảng 850 µg đến khoảng 900 µg, từ khoảng 900 µg đến khoảng 950 µg, từ khoảng 950 µg đến khoảng 1000 µg. Tốt hơn là, theo một số khía cạnh, lượng hữu hiệu nằm trong khoảng từ 0,5µg đến khoảng 10µg.

F. Các điều kiện sử dụng

Các phương pháp theo sáng chế hoạt hóa đáp ứng miễn dịch ở đối tượng sao

cho đối tượng này được bảo vệ khỏi bệnh mà chịu trách nhiệm gây ra đáp ứng miễn dịch. Như được sử dụng ở đây, cụm từ “được bảo vệ tránh bị bệnh” chỉ việc làm giảm các triệu chứng của bệnh; làm giảm sự xảy ra bệnh; làm giảm độ nặng trên lâm sàng hoặc trên bệnh lý của bệnh; hoặc làm giảm sự nhiễm phải tác nhân gây bệnh. Việc bảo vệ đối tượng có thể chỉ khả năng của chế phẩm điều trị theo sáng chế, khi được dùng cho đối tượng, để ngăn ngừa việc bị bệnh, chữa bệnh, và/hoặc làm thuyên giảm hoặc làm giảm các triệu chứng của bệnh, các dấu hiệu lâm sàng, bệnh lý, hoặc nguyên nhân gây bệnh. Do đó, việc bảo vệ đối tượng để tránh bị bệnh bao gồm cả việc ngăn ngừa xảy ra bệnh (phòng bệnh) và điều trị đối tượng mà đã có bệnh (chữa bệnh). Thuật ngữ "bệnh" chỉ tình trạng sai lệch bất kỳ khỏi tình trạng sức khỏe thông thường ở đối tượng và bao gồm tình trạng trong đó có mặt các triệu chứng bệnh, cũng như các tình trạng bệnh trong đó có xảy ra sự sai lệch, ví dụ, sự nhiễm, sự đột biến gen, khuyết tật di truyền, v.v.) đã xảy ra, nhưng các triệu chứng này chưa được biểu hiện.

Các phương pháp theo sáng chế có thể được sử dụng để ngăn ngừa bệnh, kích thích khả năng miễn dịch tế bào tác động kháng lại bệnh, giảm trừ bệnh, làm thuyên giảm bệnh, và ngăn ngừa bệnh thứ phát do sự xuất hiện của bệnh nguyên phát.

Theo một số khía cạnh, các phương pháp được mô tả ở đây có thể được sử dụng để cải thiện đáp ứng miễn dịch bẩm sinh ở đối tượng khi dùng đồng thời với vaccin so với việc chỉ dùng mỗi vaccin. Theo một số khía cạnh, các phương pháp được mô tả ở đây có thể được sử dụng để cải thiện đáp ứng miễn dịch thu được ở đối tượng khi dùng đồng thời với vaccin so với việc chỉ dùng mỗi vaccin. Nói chung, vaccin khi được dùng không lập tức bảo vệ đối tượng vì nó cần thời gian để kích thích miễn dịch thu được. Thuật ngữ “cải thiện” trong sáng chế được dùng để chỉ sự gây ra đáp ứng miễn dịch bẩm sinh ở đối tượng cho đến khi vaccin bắt đầu bảo vệ đối tượng và/hoặc kéo dài thời gian bảo vệ, qua khả năng miễn dịch thu được, có được bởi vaccin.

Theo một số khía cạnh, các phương pháp theo sáng chế bao gồm việc dùng chế phẩm để bảo vệ chống lại sự nhiễm đối với rất nhiều tác nhân gây bệnh. Chế phẩm được dùng có thể có hoặc có thể không chứa kháng nguyên đặc hiệu để gây ra

đáp ứng miễn dịch đặc hiệu. Dự tính là các phương pháp theo sáng chế sẽ bảo vệ đối tượng sử dụng tránh bị bệnh do các tác nhân vi sinh vật truyền nhiễm gây ra bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các virus, vi khuẩn, nấm, và ký sinh trùng. Chuyên gia trong lĩnh vực này sẽ nhận thức được và hiểu rõ rằng chế phẩm điều biến miễn dịch, như được mô tả ở đây, là hữu hiệu đối với nhiều tác nhân truyền nhiễm, số lượng các tác nhân này là nhiều đến mức không thể liệt kê. Các tác nhân truyền nhiễm được đề xuất ở đây được đề xuất nhằm mục đích lấy làm ví dụ và được đề xuất mà không làm hạn chế phạm vi sử dụng.

G. Sử dụng

Có thể sử dụng bằng nhiều cách khác nhau. Tất nhiên là, cách thức cụ thể được chọn sẽ tùy thuộc vào các tác nhân sinh học cụ thể được chọn, tuổi tác và tình trạng sức khỏe nói chung của đối tượng, tình trạng bệnh lý cụ thể được điều trị và liều lượng cần thiết để có hiệu lực điều trị. Các phương pháp theo sáng chế có thể được thực hành bằng cách sử dụng cách thức sử dụng bất kỳ mà tạo ra mức hoạt hóa đáp ứng miễn dịch hữu hiệu mà không gây ra các tác dụng phụ không thể chấp nhận về mặt lâm sàng. Các chế phẩm có thể được trình bày một cách thuận tiện dưới dạng liều đơn vị và có thể được bào chế bằng phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp đã được biết rất rõ trong lĩnh vực này.

Chế phẩm điều biến miễn dịch có thể được dùng trong tĩnh mạch, trong cơ, trong chân bì, trong màng bụng, dưới da, bằng cách phun, trong trứng, qua đường miệng, trong mắt, trong khí quản, trong mũi, bằng cách ngậm, hấp thụ qua da hoặc mang trong bể, hoặc bằng các phương pháp khác đã biết trong lĩnh vực. Theo một khía cạnh, chất điều biến miễn dịch được dùng dưới da. Theo khía cạnh khác, chất điều biến miễn dịch có thể được dùng trong cơ. Theo khía cạnh khác, chất điều biến miễn dịch được dùng dưới dạng thuốc phun. Theo khía cạnh khác, chất điều biến miễn dịch có thể được dùng qua đường miệng. Theo khía cạnh khác, chất điều biến miễn dịch có thể được dùng qua đường dưới da.

Theo một khía cạnh, bản thân chất điều biến miễn dịch có thể được dùng cho đối tượng trước khi thử (hoặc gây nhiễm). Theo khía cạnh khác, bản thân chất điều biến miễn dịch có thể được dùng cho đối tượng sau khi thử (hoặc gây nhiễm). Theo

khía cạnh khác, bản thân chất điều biến miễn dịch có thể được dùng cho đối tượng đồng thời với khi thử (hoặc gây nhiễm).

Theo một số khía cạnh, chế phẩm điều biến miễn dịch có thể được dùng đồng thời với việc chủng ngừa trước khi thử. Theo một số khía cạnh, chế phẩm điều biến miễn dịch có thể được dùng đồng thời với việc chủng ngừa đồng thời với khi thử. Theo một số khía cạnh, việc dùng đồng thời có thể bao gồm việc dùng vaccin và chất điều biến miễn dịch ở cùng vị trí tổng quát trên đối tượng ở hai điểm khác nhau cạnh nhau (tức là, các vị trí tiêm ở gần nhau trên cổ của đối tượng), ở các phía đối diện của đối tượng ở cùng vị trí tổng quát (tức là, trên mỗi phía của cổ), hoặc trên các khu vực khác nhau của cùng đối tượng. Theo một số khía cạnh, chế phẩm điều biến miễn dịch có thể được dùng trước khi chủng ngừa và thử. Theo một số khía cạnh, chế phẩm điều biến miễn dịch có thể được dùng sau khi chủng ngừa nhưng trước khi thử. Chế phẩm điều biến miễn dịch có thể được dùng cho đối tượng sau khi thử, đối tượng này đã được chủng ngừa trước khi thử (hoặc gây nhiễm).

Chuyên gia trong lĩnh vực này sẽ hiểu rõ rằng cách dùng có thể thay đổi tùy thuộc vào đối tượng và sức khỏe hoặc tình trạng của đối tượng. Đường dùng được đề xuất là nhằm mục đích lấy làm ví dụ và không nhằm giới hạn.

Việc chủng ngừa có thể được thực hiện ở độ tuổi bất kỳ. Vaccin có thể được dùng dưới da, bằng cách phun, qua đường miệng, trong mắt, trong khí quản, trong mũi, *trong trứng*, bằng cách ngâm hoặc bằng các phương pháp khác đã biết trong lĩnh vực. Các vaccin dùng qua đường miệng có thể được dùng trong thức ăn hoặc nước. Hơn nữa, dự tính rằng các phương pháp theo sáng chế có thể được sử dụng dựa trên lịch trình chủng ngừa thông thường.

Chế phẩm điều biến miễn dịch cũng có thể được dùng dưới da, dùng trong mắt, trong khí quản, trong mũi, *trong trứng*, hoặc các phương pháp khác đã biết trong lĩnh vực. Ví dụ, chế phẩm điều biến miễn dịch có thể được dùng trong trứng. Cách khác, chế phẩm điều biến miễn dịch có thể được dùng dưới dạng chế phẩm phun.

Việc dùng cho trứng có thể trước khi thử (hoặc gây nhiễm) hoặc sau khi thử.

Chất điều biến miễn dịch có thể được dùng cho đối tượng từ khoảng 1 đến khoảng 14 ngày trước khi thử nghiệm hoặc từ khoảng 1 đến khoảng 14 ngày sau khi thử nghiệm. Ví dụ, chất điều biến miễn dịch có thể được dùng từ khoảng 1 đến khoảng 7 ngày trước khi thử hoặc từ khoảng 1 đến khoảng 7 ngày sau khi thử. Thích hợp là, chất điều biến miễn dịch được dùng 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ngày trước khi thử hoặc 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ngày sau khi thử.

Các hệ cấp khác có thể bao gồm các hệ cấp giải phóng theo thời gian, hệ cấp giải phóng kéo dài, hoặc hệ cấp giải phóng chậm. Các hệ này có thể tránh được việc dùng lặp lại các chế phẩm do đó gia tăng tính thuận tiện. Nhiều loại hệ giải phóng là đã có và đã biết đối với chuyên gia có trình độ trung bình trong lĩnh vực này. Các hệ này bao gồm các hệ trên cơ sở polyme như poly(lactit-glycolit), các copolyoxalat, polycaprolacton, polyesteramit, polyorthoeste, axit polyhydroxybutyric, và polyanhydrit. Các vi nang từ các polyme nêu trên chứa được chất được mô tả trong, ví dụ, patent Mỹ số 5,075,109.

Các hệ cấp còn bao gồm các hệ không phải polyme đó là các lipid chứa các sterol như cholesterol, các este cholesterol, và axit béo hoặc chất béo trung tính như mono-, di-, và tri-glyxerit; các hệ giải phóng hydrogel; các hệ silastic; các hệ trên cơ sở peptit; các chất phủ sáp; các viên nén sử dụng các chất kết dính và tá dược thông thường; các viên cấy được dung hợp một phần; và các hệ tương tự. Các ví dụ cụ thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các hệ ăn mòn trong đó tác nhân theo sáng chế được chứa dưới dạng trong chất nền như các hệ được mô tả trong các patent Mỹ số 4,452,775, 4,675,189, và 5,736,152, và các hệ khuếch tán trong đó thành phần hoạt tính thấm ở tốc độ được kiểm soát qua polyme như được mô tả trong patent Mỹ số 3, 854,480, 5,133,974, và 5,407,686. Ngoài ra, các hệ cấp cứng trên cơ sở bơm có thể được sử dụng, một số hệ này được làm thích ứng với việc cấy.

Các thay đổi khác có thể được thực hiện trong chế phẩm, các sản phẩm và các phương pháp nêu trên mà không trệch khỏi phạm vi của sáng chế, dự tính rằng tất cả các vấn đề chứa trong phần mô tả nêu trên và trong các ví dụ được nêu dưới đây sẽ được hiểu là chỉ nhằm minh họa và không có nghĩa làm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Các định nghĩa

Thuật ngữ “lượng hữu hiệu” chỉ lượng cần thiết hoặc đủ để nhận được tác dụng sinh học mong muốn. Ví dụ, lượng hữu hiệu của chất điều biến miễn dịch để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh truyền nhiễm là lượng cần thiết để gây ra sự phát triển của đáp ứng miễn dịch khi phơi nhiễm với vi sinh vật, nhờ đó gây ra sự giảm lượng vi sinh vật trong đối tượng và tốt hơn là gây ra sự tiệt trừ vi sinh vật. Lượng hữu hiệu đối với ứng dụng cụ thể bất kỳ có thể thay đổi tùy thuộc vào các yếu tố như bệnh hoặc tình trạng bệnh lý được điều trị, kích cỡ của đối tượng, hoặc độ nặng của bệnh hoặc tình trạng bệnh lý. Chuyên gia có trình độ trung bình trong lĩnh vực này có thể xác định bằng kinh nghiệm lượng hữu hiệu của chất điều biến miễn dịch mà không cần thử nghiệm quá mức.

Thuật ngữ “xytokin” chỉ họ protein tăng cường miễn dịch. Họ xytokin bao gồm yếu tố phát triển chất sinh huyết, các interleukin, các interferon, các phân tử liên họ globulin miễn dịch, các phân tử họ yếu tố hoại tử khối u và các chemokin (tức là các protein mà điều hòa sự di trú và sự hoạt hóa của các tế bào, đặc biệt là các tế bào thực bào). Các xytokin được lấy làm ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, interleukin-2 (IL-2), interleukin-12 (IL-12), interleukin-15 (IL-15), interleukin-18 (IL-18), interferon- α (IFN α), và interferon- γ (IFN γ).

Thuật ngữ “gây ra” có thể được sử dụng thay thế cho các thuật ngữ hoạt hóa, kích thích, sinh ra hoặc tăng cường điều hòa.

Thuật ngữ “gây ra đáp ứng miễn dịch” ở đối tượng chỉ việc kiểm soát hoặc tác động một cách cụ thể đến hoạt tính của đáp ứng miễn dịch, và có thể bao gồm sự hoạt hóa đáp ứng miễn dịch, tăng cường điều hòa đáp ứng miễn dịch, tăng cường đáp ứng miễn dịch và/hoặc thay đổi đáp ứng miễn dịch (như bằng cách gây ra kiểu đáp ứng miễn dịch mà đến lượt nó lại làm thay đổi kiểu đáp ứng miễn dịch phổ biến ở đối tượng từ đáp ứng miễn dịch mà gây hại hoặc không hiệu quả đối với thành đáp ứng miễn dịch mà có lợi hoặc có tính chất bảo vệ).

Thuật ngữ “liên kết về mặt hoạt động” chỉ sự liên kết của phân tử axit nucleic với trình tự kiểm soát phiên mã theo cách mà phân tử này có thể được biểu hiện khi

được chuyển nhiễm (tức là, được biến nạp, tải nạp hoặc chuyển nhiễm) vào tế bào chủ. Các trình tự đối chứng phiên mã là các trình tự mà kiểm soát sự bắt đầu, kéo dài, và kết thúc của quá trình phiên mã. Các trình tự kiểm soát phiên mã đặc biệt quan trọng là các trình tự mà kiểm soát sự bắt đầu phiên mã, như các trình tự hoạt hóa, tăng cường, thực hiện và kìm hãm. Nhiều loại trình tự kiểm soát phiên mã này đã được chuyên gia trong lĩnh vực này biết đến. Các trình tự kiểm soát phiên mã được ưu tiên bao gồm các trình tự mà có tác dụng ở các tế bào loài lông vũ, cá, động vật có vú, vi khuẩn, virus, thực vật, và côn trùng. Mặc dù các trình tự kiểm soát phiên mã bất kỳ có thể được sử dụng theo sáng chế, nhưng các trình tự nay có thể bao gồm các trình tự kiểm soát phiên mã có trong tự nhiên được kết hợp về mặt tự nhiên với trình tự mã hóa chất sinh miễn dịch hoặc protein kích thích miễn dịch.

Các thuật ngữ “phân tử axit nucleic” và “trình tự axit nucleic” có thể được sử dụng thay thế nhau và bao gồm ADN, ARN, hoặc các dẫn xuất của ADN hoặc ARN. Các thuật ngữ còn bao gồm các oligonucleotit và các trình tự lớn hơn như các plasmit, như các plasmit kích thích miễn dịch được mô tả ở đây, và chứa cả hai phân tử axit nucleic mà mã hóa protein hoặc mảnh của nó, và các phân tử axit nucleic mà chứa các vùng điều hòa, các intron, hoặc ADN hoặc ARN không mã hóa khác. Thông thường là, oligonucleotit có trình tự axit nucleic từ khoảng 1 đến khoảng 500 nucleotit, và thông thường hơn nữa là có ít nhất là khoảng 5 nucleotit trên chiều dài của nó. Phân tử axit nucleic có thể thu được từ nguồn bất kỳ, bao gồm các nguồn động vật có vú, cá, vi khuẩn, côn trùng, virus, thực vật, tổng hợp hoặc kết hợp các nguồn này. Phân tử axit nucleic có thể được tạo ra bằng các phương pháp thường đã được biết đến trong lĩnh vực này như kỹ thuật ADN tái tổ hợp (ví dụ, phản ứng chuỗi polymeraza (polymerase chain reaction: PCR), khuếch đại, tách dòng) hoặc tổng hợp hóa học. Các phân tử axit nucleic bao gồm các phân tử axit nucleic tự nhiên và các chất đồng dạng với chúng, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các biến thể alen tự nhiên và các phân tử axit nucleic được cải biến trong đó các nucleotit đã được xen vào, cắt bỏ, thay thế, hoặc nghịch đảo theo cách sao cho các cải biến này hầu như không can thiệp vào khả năng của phân tử axit nucleic để gây ra đáp ứng miễn dịch hữu dụng trong các phương pháp theo sáng chế. Các chất tương đồng axit nucleic có

thể được tạo ra bằng cách sử dụng một số phương pháp đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực này (xem, ví dụ, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Labs Press, 1989), ấn phẩm này được đính kèm theo đây bằng cách viện dẫn.

Các thuật ngữ “chất đánh dấu có thể chọn lọc” và “gen đánh dấu có thể chọn lọc” chỉ gen mà mã hóa sản phẩm mà bảo vệ sinh vật trong đó gen này được biểu hiện tránh khỏi tác nhân chọn lọc (ví dụ, chất kháng sinh) hoặc tránh khỏi tình trạng mà thường sẽ tiêu diệt sinh vật hoặc ức chế sự phát triển của nó. Các gen đánh dấu có thể chọn lọc là các gen kháng chất kháng sinh thông thường nhất, ví dụ, các gen kháng kanamycin, các gen kháng ampicillin, các gen kháng chloramphenicol, các gen kháng tetracyclin, v.v.). Do đó, ví dụ, nếu các tế bào *E. coli* được đem thực hiện biến nạp để đưa plasmit mã hóa gen kháng kanamycin vào và sau đó phát triển trên hoặc trong môi trường chứa kanamycin, thì chỉ các tế bào *E. coli* mà đã được đưa plasmit vào thành công và biểu hiện gen kháng kanamycin sẽ sống sót. Các thuật ngữ “chất đánh dấu có thể chọn lọc” và “gen đánh dấu có thể chọn lọc” còn bao gồm các gen mà mã hóa cho các enzym có liên quan đến sự tổng hợp hợp chất mà là thiết yếu cho sự phát triển của sinh vật. Khi được đưa vào trong vi sinh vật dị dưỡng thụ động mà không thể tổng hợp hợp chất thiết yếu, các gen này cho phép sinh vật phát triển trong môi trường mà đã được bổ sung hợp chất thiết yếu. Ví dụ, các tế bào vi khuẩn mà là dinh dưỡng thụ động đối với axit amin lysin do sự đột biến trong hoặc sự không có mặt của enzym có liên quan đến quy trình sinh tổng hợp lysin thường là không thể phát triển được trên môi trường mà chưa được bổ sung lysin. Nếu vi khuẩn này được đem thực hiện biến nạp để đưa vào plasmit mã hóa enzym có liên quan đến quy trình sinh tổng hợp lysin thì vi khuẩn mà đã đưa plasmit vào thành công và biểu hiện enzym này sẽ sống sót khi được phát triển trên môi trường mà chưa được bổ sung lysin. Các thuật ngữ “chất đánh dấu có thể chọn lọc” và “gen đánh dấu có thể chọn lọc” còn bao gồm các gen mà cho phép chọn lọc gây độc/giải độc. Ví dụ, gen *ccdB* mã hóa protein mà liên kết với ADN gyraza, enzym thiết yếu cho sự phân chia tế bào. Khi liên kết với ADN gyraza, sản phẩm gen *ccdB* làm suy yếu sự sao chép gen và gây ra sự chết tế bào. Do đó, vi khuẩn biểu hiện sản phẩm gen *ccdB* không thể

sống sót. Gen *ccdA* mã hóa protein (“chất giải độc”) mà tác dụng như là chất ức chế tự nhiên của sản phẩm gen *ccdB*. Do đó, nếu vi khuẩn có gen *ccdB* trong hệ gen của chúng được đem thực hiện biến nạp để đưa plasmit mã hóa sản phẩm gen *ccdA* vào thì chỉ các tế bào mà đã đưa plasmit vào thành công và biểu hiện gen *ccdA* sẽ sống sót.

Các thuật ngữ “chất đánh dấu có thể sàng lọc” và “gen đánh dấu có thể sàng lọc” dùng để chỉ gen mà mã hóa sản phẩm mà cho phép người quan sát phân biệt được các tế bào biểu hiện gen đánh dấu có thể sàng lọc và các tế bào không biểu hiện gen đánh dấu có thể sàng lọc. Các hệ gen đánh dấu có thể sàng lọc cũng được biết rõ trong lĩnh vực này và bao gồm, ví dụ, các gen *lacZ* và các gen mã hóa các huỳnh quang như protein huỳnh quang xanh lá cây (GFP-green fluorescent protein), protein huỳnh quang vàng (YFP-yellow fluorescent protein), protein huỳnh quang đỏ (RFP-red fluorescent protein), protein huỳnh quang xanh da trời (BFP-blue fluorescent protein), hoặc protein huỳnh quang xanh lục (CFP-cyan fluorescent protein).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “cải thiện năng suất” dùng để chỉ sự cải thiện về số đo như sức khỏe, trọng lượng, kích thước, chất lượng thịt, hoặc thông số khác giữa các đối tượng nhận chế phẩm điều biến miễn dịch và các đối tượng không nhận chế phẩm điều biến miễn dịch.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “cải thiện khả năng sống sót” dùng để chỉ khả năng sống sót được cải thiện của đối tượng nhận so với đối tượng không nhận chế phẩm điều biến miễn dịch.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “đối tượng” dùng để chỉ thành phần thuộc loài thủy sinh, bao gồm loài bất kỳ trong một số lượng đáng kể loài thủy sinh. Các đối tượng có thể là thành phần bất kỳ trong số các loài thủy sinh, cho dù là nuôi trong nhà hoặc hoang dã, và có thể được nuôi nhằm mục đích thương mại để gây giống, lấy thịt hoặc lấy trứng. Ví dụ về loài thủy sinh bao gồm, mà không giới hạn ở, loài cá, động vật giáp xác, động vật thân mềm bất kỳ, sống trong nước ngọt hoặc nước biển. Loài điển hình bao gồm, mà không giới hạn ở, cá bao gồm thành phần bất kỳ thuộc loài Phylum Chordata, Sub Phylum Vertebrata, và Super Class Pisces. Bằng cách nêu làm ví dụ, mà không nhằm giới hạn, các loài cá như vậy bao gồm cá

da trơn, cá nheo Mỹ, cá bóng đen, cá bóng vàng, cá bóng nâu, cá chép, cá diếc, cá hồi không di cư, cá hồi vân, cá hồi nâu, cá hồi suối đốm, cá hồi di cư, cá hồi Đại Tây Dương, cá hồi Coho, cá hồi chinook (hoặc cá hồi king), cá hanh, cá rutilut, cá chó, cá vược măng, cá lưỡi trâu biển, cá bơn, cá cam Nhật Bản, cá vược, cá vược miệng nhỏ, cá vược miệng to, cá vược sọc, cá sọc, cá măng sữa, cá rô phi, cá dôi, cá chình, cá tuyết, và các loài cá khác bất kỳ hoặc các loài thủy sinh mà sáng chế này có thể được áp dụng sẽ được biết rõ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Theo một số khía cạnh, các đối tượng có thể được chẩn đoán bị bệnh truyền nhiễm, có thể có nguy cơ mắc bệnh truyền nhiễm, hoặc có thể đang bị bệnh truyền nhiễm. Các đối tượng có thể có độ tuổi bất kỳ bao gồm thời kỳ trong trứng, thời kỳ sơ sinh, thời kỳ thanh niên, thời kỳ trưởng thành, thời kỳ trung tuổi, hoặc thời kỳ già.

Bảng 1: Trình tự ADN plasmid

Plasmid	SEQ ID NO.	Trình tự
pMB75.6	2	ctaaattgtaagcgtaatatatttgttaaaattcgcgtaaatatttgttaaatcagctcatttttaac caataggccgaaatcggcaaaatccctataaatcaaaagaatagaccgagatagggtga gtgtgtccagtttgaacaagagtcactattaaagaacgtggactccaacgtcaaagg cgaaaaaccgtctatcagggcgatggccactacgtgaaccatcacctaataagttttg gggtcgaggtgccgtaaaagcactaaatcggaaccctaaggaggccccgatttagagct tgacggggaaagccggcgaaacgtggcgagaaaggaagggaagaaagcgaaaggagc gggcgctagggcgctggcaagtgtagcggtcacgtgcgcgtaaccaccacacccgccg cgcttaatgcgcgctacagggcgcgctccattcgccattcaggctgcgcaactgttggga agggcgatcgggtcgggcctcttcgtattacgccagctggcgaaagggggatgtgtgc aaggcgattaagttgggtaacgccagggtttccagtcacgacgttgtaaacgacggcc agtgagcgcgcgtaatacgaactcactatagggcgaaattgggtaccgggccccccctcgag caggatctatacattgaatcaatattggcaattagccatattagtcattggttatatagcataat caatattggctattggccattgcatacgttgatctatatacataatgtacatttatattggctcat gtccaatatgaccgccatgttgacattgattattgactagttattaatagtaataattacggggt cattagttcatagcccatatattggagttccgcgtacataacttacggtaaatggccgcctgg ctgaccgccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgc caatagggactttccattgacgtcaatgggtggagtattacggtaaaactgccacttggcag tacatcaagtgtatcatatgccaagtccgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggccc cctggcattatgcccagtcacatgacctacgggactttcctacttggcagtcacatctacgtatta gtcacgtctattaccatggtgatgcggttttggcagtcacatcaatgggcgtggatagcgggtt gactcacggggatttccaagtctccacccattgacgtcaatgggagtttgggttggcaccaa aatcaacgggactttccaaaatgtcgtacaactccgccccattgacgcaaatgggcggtgta

	ggcgtgtacgggtgggaggtctatataagcagagctcgtttagtgaaccgtcagatcgctg gagacgccatccacgctgtttgacctccatagaagacaccgggaccgatccagcctcccc tcgaagccgatctgataacgggtaccgataagctggcgccgattaagctacagaagtgggt cgtgaggcactgggcaggttaagtatacagggttacaagacaggtttaaggagaccaataga aactgggctgtcgagacagagaagactcttgcgtttctgataggcacctattgggtcttactga catccactttgcctttctctccacaggtgtccactcccaggttcaattacagctcttaagcagcc gcaagcttgatatcgaattcctgcagccccgggggatccactagtcttagagcgccgccac cgcggtggagctcgaattatcagatcgattaataactatgtcaaaaattgtgtacctttagctt tttaatttgaagggggttaataaggaataatttgatgtatagtgccttgactagagatcataatca gccataccacattttagaggttttacttgccttaaaaaaacctcccacacctccccctgaacct gaaacataaaatgaatgcaattgtgtgtttaacttgtttattgcagcttataatggttacaataa agcaatagcatcacaatttcacaaataaagcattttttcactgcattctagttgtggttgtcc aaactcatcaatgtatcttatcatgtctggatcatcagatctgccggtctccctatagttagtcg tattaatttcgataagccaggttaacctgcattaatgaatcgccaacgcgcggggagagggc ggtttgcgtattggcgctcttccgcttctcgtcactgactcgtcgcgtcggctgttcggc tgcggcgagcgggtatcagctcactcaaggcggttaatacgggttatccacagaatcagggg ataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaa ggccgcgttgctggcggttttccataggctccgccccctgacgagcatcaaaaaatcgac gtcaagtcagagggtggcgaaacccgacaggactataaagataccaggcggttccccctg gaagctccctcgctgcgtctcctgttccgacctgccgcttaccggataacctgtccgcctttct cccttcgggaagcgtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcggttaggt cgctcgtccaagctgggctgtgtgcacgaacccccgttcagccccagcgctgcgcctta tccggtaactatcgtctgagtcacacccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagc cactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcggtgtacagagttcttgaagtgg tggcctaactacggctacactagaagaacagttttggtatctgcgctctgtgaagccagtt accttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaacaaccaccgctggttagcgggtg gttttttgttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatcctttgat ctttctacgggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggatttttggtcatgag cgcgcttaggcttttgcagagatcgatcaagagacaggatgaggatcggttcgatgattga acaagatggattgcacgcaggttctccggccgcttgggtggagaggctattcggctatgact gggcacaacagacaatcggctgctctgatgcccggtgttccggctgtcagcgcaggggc gcccgggtcttttgcagaccgacctgtccggtgccctgaatgaactgcaagacgaggga gcgcggctatcgtggctggccacgacggcggttcttgcgcagctgtgtcgcaggtgtca ctgaagcgggaagggtggtgctattggcggaagtgcggggcaggatctcctgtcat ctcaccttgctcctgccgagaaagtatccatcatggctgatgcaatgcggcggtgcatacg cttgatccggctacctgcccattcgaccaccaagcgaacatcgcatcgagcgcagcacgta ctcggtatggaagccggtcttgcgatcaggatgatctggacgaagagcatcaggggctcg cgccagccgaactgttcgccaggctcaaggcgagcatgcccagcggcgaggatctcgtc gtgacctatggcgatgcctgcttgcgaatatcatggtggaaaatggccgcttttctggattc atcgactgtggccggctgggtgtggcgacggctatcaggacatagcgttggctacctcggt atattgctgaagagcttggcggcgaatgggctgaccgcttctcgtgtttacggtatcgcc gtccccgattcgcagcgcacgccttctatcgccttcttgacgagttcttctgagcgggactct gggggttcgaaatgaccgaccaagcgacgccaacctgccatcacgagatttcgattccacc gccgccttctatgaaaggttgggcttcggaatcgtttccgggacgcgggctggatgatcct ccagcgcggggatctcatgctggagttcttcccaccctaggcgcgctcatgagcggata catatttgaatgtatttagaaaaataaacaatagggggtccgcgcacatttccccgaaaagt
--	---

		gccac
pGCMB75.6	1	tgaccgccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgcc aatagggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaactgccacttggcagt acatcaagtgtatcatatgccaaagtcgccccctattgacgtcaatgacggtaaattggcccg cctggcattatgccagtacatgaccttacgggactttcctacttggcagtacatctacgtatta gtcatcgctattaccatgggtgatgcgggtttggcagtacatcaatgggcgtggatagcgggtt gactcacggggatttccaagtctccacccattgacgtcaatgggagtttgtttggcaccaa aatcaacgggactttccaaaatgtcgtacaactccgccccattgacgcaaattgggcggta ggcggtgacgggtgggaggtctatataagcagagctcgtttagtaaccgtcagatcgctg gagacgccatccacgctgtttgacctccatagaagacaccgggaccgatccagcctcccc tcgaagccgatctgataacggtagcgataagctggcgccgattaagctacagaagtgggt cgtgaggcactgggcaggttaagtatcaaggttacaagacaggttaaggagaccaataga aactgggcttgcgagacagagaagactcttgcgtttctgataggcacctattggcttactga catccactttgcctttctctccacaggtgtccactcccaggttcaattacagctcttaagcagcc gcaagcttgatatcgaattcctgcagccccggggatccactagttctagagcgccgccac cgcggtggagctcgaattatcagatcgattaataactatgctcaaaaattgtgtaccttagctt ttttaattgtaaaggggttaataaggaatatttgatgtatagtgcttgactagagatcataatca gccataccacattttagaggtttacttgcttaaaaaacctcccacacctccccctgaacct gaaacataaaatgaatgcaattgttgttgaactgtttattgcagcttataatggttacaaataa agcaatagcatcacaatttcacaaataaagcattttttcactgcattctagttgtggttgtcc aaactcatcaatgtatcttatcatgtctggatcatcagatctgccggtctccctatagttagtcg tattaatttcgataagccagggttaacctgcattaatgaatcgccaacgcgcggggagaggc ggtttgcgtattgggcgctcttccgcttctcgtcactgactcgctgcgctcggtcgttcggc tgcggcgagcggtatcagctcactcaaaggcggttaatacgggtatccacagaatcagggg ataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaaggccaggaaccgtaaaaa ggccgcgttgctggcggttttccataggctccgccccctgacgagcatcacaaaaatcgac gctcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataaagataaccaggcggttccccctg gaagctccctcgtgcgctctcctgttccgacctgcccgttaccggatacctgtccgccttct ccttcgggaagcgtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcggttaggt cgttcgtccaagctgggctgtgtgcacgaacccccgttcagcccaccgctgcgcctta tccggttaactatcgtttgagtccaacccggttaagacacgacttatgccactggcagcagc cactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcggtgctacagagtcttgaagtgg tggcctaactacggctacactagaagaacagtatttggtatctgcgctctgctgaagccagtt accttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaaacacaccgctggtagcgggtg gttttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgat cttttctacggggtctgacgctcagtggaaacgaaaactcacgttaagggttttggatggg cgcgctaggtctttgcaaagatcgatcaagagacaggatgaggatcgtttcgagcttttc attctgactgcaacgggcaataagtctctgtgtgattaaaaaaagagtgtctgatagcagct tctgaactggttacctgccgtgagtaaattaaaattttattgacttaggtcactaaggcgccctg cgctgaggttgcgtcgtgatatcatcagggcagaccggttacatccccctaacaagctgtat aaagagaaatactatctcattggcggttggcgccacctgacagtgcgacgttgggtgcgtcc gtcgaccaacggtagcgaggttaacagcccaatctatccatgatctcggccaggccgggtc ggccgttatgcagccccggctcgggtatgaagccattaaggagccgaccagcgcgaccg ggcgcccggtcacgctgcctctgctgaagcctgctgtcactccctgcgcggcgtagccg ccgttctcatcgagtaggtccggatcgcgacccccggacgggccccctgggcccaggagcg

		gcctatgacaaatgccgggtagcgatccggcattcagcattgactgcgcacggatccagtc cttgcaggagcccttatgccgaccgtagcaaaaaatgagcccagccgatcgcgagttgtg atccgggtcccgcgattgccggtcgcgatgacggctctgtgtaagcgttatcggtaccaattg ttaagaagtatacgtacgaggtacttgataacttctgcgtagcatacatgaggtttgtat aaaaatggcgggcgatatcaacgcagtgctcagaaatccgaaacagctcgcgggactctgg ggttcgaaatgaccgaccaagcgacgcccacctgccatcacgagatttcgattccaccgc cgccttctatgaaaggttgggcttcggaatcgtttccgggacgccggctggatgatcccca gcgcggggatctcatgctggagttcttcgccaccctaggcgcgctcatgagcggatacat atttgaatgtatttagaaaaataaacaatatgggggtccgcgcacatttccccgaaaagtcc acctaaattgtaagcgttaatatatttgttaaaattcgcgttaaattttgttaaatacagctcattttta accaataggccgaaatcggcaaaatcccttataaatcaaaagaatagaccgagatagggtt gagtgtgttccagtttgaacaagagtcactattaaagaacgtggactccaacgtcaaag ggcgaaaaaccgtctatcaggggcgatggccactacgtgaaccatcacctaatcaagttt ttggggtcgaggtgccgtaaagcactaaatcggaaacctaaaggagcccccgattaga gcttgacggggaaagccggcgaacgtggcgagaaaggaagggaagaaagcgaaagga gcggggcgtagggcgctggcaagtgtagcggtcacgctgcgcgtaaccaccacaccgc cgcgcttaatgcgcgctacaggggcgctccattcgccattcaggctgcgcaactgttgg gaagggcgatcgggtgcgggcctcttcgctattacgccagctggcgaaagggggatgtgct gcaaggcgattaagtgggtaacgccagggtttccagtcacgacgttgtaaaacgacgg ccagtgagcgcgcgtaatacgaactactataggcgaaattgggtaccgggccccccctcg agcaggatctatacattgaatcaatattggcaattagccataattagtcattgggtatatagcata aatcaatattggctattggccattgcatacgttgatctatatacataatgtacatttatattggct catgtccaatatgaccgccatgttgacattgattattgactagttattaatagtaataacacgg ggtcattagttcatagcccatatatggagttccgcgttacataacttacggtaaatggcccgc tggc
pLacZMB75. 6	4	tgaccgccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgcc aataggagactttccattgacgtcaatgggtggagttttacggtaaactgccacttggcagt acatcaagtgtatcatatgccaagtccgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggccg cctggcattatgccagttacatgacctacgggactttcctacttggcagttacatctacgtatta gtcatcgtattaccatgggtgatgcggttttggcagttacatcaatgggcgtggatagcgggtt gactcacggggatttccaagtctccacccattgacgtcaatgggagtttgggttggcaccaa aatcaacgggactttccaaaatgtcgtaacaactccgccccattgacgcaaatgggcggtg ggcgtgtacgggtgggaggtctatataagcagagctcgtttagtgaaccgtcagatcgctg gagacgccatccacgctgtttgacctccatagaagacaccgggaccgatccagcctccc tcgaagccgatctgataacggtaccgataagctggcggccgattaagctacagaagttggt cgtgaggcactgggcaggttaagtatcaaggttacaagacaggttaaggagaccaataga aactgggcttgcgagacagagaagactcttgcgtttctgataggcacctattggcttactga catccactttgctttctctccacaggtgtccactcccaggttcaattacagctcttaagcagcc gccccaaaaaatctcctcaaaaatcatcatcgaaatgaatgggtgaaataatttccctgaataact gtagtgtttcagggcgcggcataataaactatgctcaaaaattgtgtaccttttagctttta atttgtaaagggttaataaggaatatattgatgtatagtgccttgactagagatcataatcagcc ataccacattttagaggttttacttgccttaaaaaacctcccacacctccccctgaacctgaa acataaaatgaatgcaattgttgttgaactgtttattgcagcttataatggttacaaataaagc aatagcatcacaatttcacaaataaagcattttttcactgcattctagtgtgtgttgcctaac tcatcaatgtatcttatcatgtctggatcatcagatctgccggctccctatagttagtctgatta

	atttcgataagccagggttaacctgcattaatgaatcgcccaacgcgcggggagagggcggtt tgcgtattggcgctcttccgcttctcgtcactgactcgtcgcgtcggctcgttcggctgc ggcgagcgggtatcagctcactcaaaggcggtataacggttatccacagaatcaggggata acgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaaggc cgcgttgctggcggttttccataggctccgccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgct caagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataaagataaccaggcggttccccctggaa gctccctcgtcgcgtctcctgttccgacctgcccgttacgggatacctgtccgcctttctccc ttcgggaagcgtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcgggtgtaggtcgtt cgctccaagctgggctgtgtgcacgaacccccgttcagccgacctgctgccttatccg gtaactatcgtcttgagtccaacccggttaagacacgacttatcgccactggcagcagccact ggtaacaggattagcagagcagaggtatgtaggcgggtctacagagttctgaagtggtagc ctaactacggctacactagaagaacagtatttggtatctgcgctctgctgaagccagttacctt cggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaaacaaccaccgctgtagcgggtggtttt ttgttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatctttc tacggggctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggattttggatgaggcgcg cctaggctttgcaaagatcgatcaagagacaggatgaggatcgtttcgcagcttttattctg actgcaacgggcaataagtctctgtgtggattaaaaaagagtgctgtagcagcttctgaa ctggttacctgccgtgagtaaattaaaattttattgacttaggtcactaaggcgcttgcgctga ggttgcgtcgtgatcatcagggcagaccgggttacatccccctaacaagctgtataaagag aaatactatctcattggcggttcccgcacctgacagtgcgacgttgggctgcgtccgctgac caacgggtaccgaggtaacagcccaatctatccatgatctcgccagggccgggtcggccgtt atgcagcccggctcgggtatgaagccattaaggagccgaccagcgcgaccgggcggc cggtcacgctgcctctgctgaagcctgcctgtcactccctgcgcggcgtagcccgccgttctc atcgagtaggctccggatcgcgacccccggacgggcccctgggcccaggagcggcctatg acaaatgccgggtagcgatccggcattcagcattgactgcgcacggatccagtccttgag gagccttatgccgaccgtagcaaaaaatgagcccagccgatcgcgagttgtgatccggt cccgccgattgccggtcgcgatgacggctctgtgtaagcgttatcgttaccaattgtttaaga agtatatacgtacgaggtacttgataacttctgcgtagcatacatgaggtttgtataaaaatg gcgggcatatcaacgcagtgtcagaaatccgaaacagtctgcgggactctggggttcga aatgaccgaccaagcgcgacgccaacctgccatcacgagatttcgattccaccgccgccttc tatgaaaggttgggcttcggaatcgtttccgggacgccggctggatgacctccagcgcg gggatctcatgctggagttcttcgcccaccctaggcgcgctcatgagcggatacatattga atgtatttagaaaaataaacaataggggttccgcgcacatttccccgaaaagtgccaccta aattgtaagcgtaataattttgttaaaatcgcgtaattttgttaaatcagctcatttttaacca ataggccgaaatcggcaaaatcccttataaatcaaaagaatagaccgagataggggtgagt gttgttccagtttgaacaagagtccactattaaagaacgtggactccaacgtcaaaggcg aaaaaccgtctatcagggcgatggccactacgtgaaccatcacctaatcaagtttttggg gtcgaggtgccgtaaaagcactaaatcggaaacctaaaggagccccgatttagagcttga cggggaaagccggcgaaacgtggcgagaaagggaagggaagaaagcgaaaggagcggg cgctagggcgctggcaagtgtagcggtcacgctgcgcgtaaccaccacaccgccgcgc ttaatgcgccgctacagggcgcgctccattcgccattcaggctgcgcaactgttgggaagg gcgatcgggtcgggctcttcgctattacgccagctggcgaaagggggatgtgtgcaag gcgattaagttgggtaacgccaggggtttccagtcacgacgttgtaaaacgacggccagt gagcgcgcgtaatacactcactatagggcgaaattgggtaccgggccccccctcgaggtc gacggtatcgataagcttgatcgaattcctgcagcccgggggatccactagtctagagc ggccgccaccgcggtggagctccagcttttgtcccttagtgagggttaattgcgcgcttgg
--	---

		cgtaatcatggcatagctgttcctgtgtgaaattgttatccgctcacaattccacacaacata cgagccggaagcataaagtgtaaagcctggggtgcctaagtgagtgagctaactcacattaa ttgcgttgcgc
--	--	--

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ không giới hạn dưới đây được đề xuất để minh họa thêm sáng chế.

Ví dụ 1. Đánh giá cá hồi Đại Tây Dương nhận chất điều biến miễn dịch ADN khi được bào chế với kháng nguyên IPNV bất hoạt bằng cách sử dụng thử nghiệm đồng cư trú với IPNV.

Mục đích của nghiên cứu này là nhằm xác định hiệu lực của chất điều biến miễn dịch ADN được dùng cho cá hồi di cư trước khi đồng cư trú với IPNV.

Chất điều biến miễn dịch

Chất điều biến miễn dịch ADN được sử dụng trong nghiên cứu này là phức hợp phức hợp ADN plasmit liposom chứa trình tự dinucleotit CpG. ADN plasmit là plasmit pMB75.6 được biểu thị bởi SEQ ID NO: 2. Phức hợp ADN plasmit liposom được bào chế trong dung dịch dextroza 5%.

Dầu Montanide được sử dụng trong nghiên cứu này (Montanide ISA 763 A) là dầu có khả năng chuyển hóa that mà là tá dược loại I tạo ra đáp ứng miễn dịch mạnh và trong thời gian dài. Montanide ISA 763 A VG, được cung cấp bởi Seppic, chứa dầu tiêm được có khả năng chuyển hóa (không chứa dầu khoáng) và chất nhũ hóa cực kỳ tinh khiết thu được từ manitol và axit oleic tinh khiết có nguồn gốc thực vật.

Kháng nguyên IPNV

IPNV (virus lây nhiễm gây hoại tử tụy - Infectious pancreas necrosis virus) được nhân lên trong dòng tế bào CHSE-214 cho đến khi hiệu lực gây bệnh ở tế bào đạt 100% (CPE) . Kháng nguyên được bất hoạt trong formalin và sau đó được bào chế kết hợp với một trong số các chất điều biến miễn dịch đã nêu ở trên ở nồng độ không đổi trong suốt các quá trình xử lý khác nhau.

Alpha Ject® 2-2

Vaccin sẵn có trên thị trường này được dùng làm mẫu đối chứng. Vaccin này là thể nhũ tương trong dầu được dùng để ngăn ngừa tỷ lệ tử vong ở cá do bệnh nhọt và nhiễm IPNV.

Bào chế vaccin chứa kháng nguyên IPNV

Kháng nguyên IPNV được bào chế ở dạng vaccin đơn trị phối hợp với chất điều biến miễn dịch ADN hoặc dầu Montanide ở ba nồng độ/tỷ lệ khác nhau. Mô tả vắn tắt về chế phẩm xử lý được chỉ ra trong bảng 2.

Bảng 2. Chế phẩm vaccin.

Nhóm điều trị	Chế phẩm vaccin				Số liều cần dùng	Thể tích cuối (ml)
	Kháng nguyên	Tá dược				
		IPNV (hạt virus trên liều lượng 0,05 ml)	Chất điều biến miễn dịch ADN	Montadine ISA 763 A VG (dầu:nước)		
		µg ml ⁻¹	µg trong 0,05 ml			
A	0	0	0	0	110 (90 + 20)	5,5
B	0	2	0	0	110 (90 + 20)	5,5
C	0	20	1	0	110 (90 + 20)	5,5
D	0	200	1	0	110 (90 + 20)	5,5
E	1,5x10 ⁸	0	0	0	110 (90 + 20)	5,5
F	1,5x10 ⁸	2	0	0	120 (90 + 30)	6
G	1,5x10 ⁸	20	1	0	120 (90 + 30)	6
H	1,5x10 ⁸	200	1	0	120 (90 + 30)	6
I	1,5x10 ⁸	0	0	40:60	110 (90 + 20)	5,5
J	1,5x10 ⁸	0	0	50:50	110 (90 + 20)	5,5
K		0	0	70:30	110 (90 + 20)	5,5

	1,5x10 ⁸					
L	Alpha Ject® 2-2				110 (90 + 20)	11

Động vật nghiên cứu

Cá hồi Đại Tây Dương (*Salmo salar*) thu được chưa được chủng ngừa và tình trạng miễn dịch được chú thích bằng tài liệu bởi nhà cung cấp. Cá trưởng thành về mặt giới tính, bị thương hoặc bị biến dạng được loại khỏi nghiên cứu. Cá được chia thành 12 nhóm điều trị (nhóm điều trị A đến L) mỗi nhóm gồm 30 con trong ba bể, tổng số 360 con cá điều trị trong bể. Một nhóm khác gồm 72 con cá được sử dụng là nguồn phát tán virus, hoặc cá phát tán IPNV một cách tích cực, ở mỗi bể trong ba bể. Trước khi sử dụng vacxin, cá thử nghiệm được gây tê và đánh dấu bằng nhãn PIT hai tuần trước ngày điều trị.

Thiết kế nghiên cứu

Cá được bỏ đói trong tối thiểu 48 giờ trước khi dùng vacxin. Nhóm điều trị được cho dùng các liều vacxin hoặc chất đối chứng khác nhau được mô tả trong bảng 2 trên đây vào ngày điều trị. Vacxin hoặc các chất đối chứng được dùng trong màng bụng theo bảng 2. Tiến hành nghiên cứu trong ba bể. Mỗi bể có 12 nhóm thí nghiệm gồm 30 con cá mỗi nhóm. Hai bể được dùng như các mẫu lặp lại cho thí nghiệm dùng liều thử thách (các bể 1 và 2, bảng 3). Bể thứ ba được dùng để lấy mẫu trong nghiên cứu điều biến miễn dịch (bể 3, bảng 3).

Bảng 3. Thiết kế nghiên cứu. Chất điều biến miễn dịch ADN được viết tắt là ADN trong bảng này.

Nhóm	Vacxin/chất đối chứng	Số con cá	Bể và nghiên cứu
A	Dextroza 5%	30	Bể 1 - liều thử thách IPNV đối với thử nghiệm vacxin
B	ADN (2 µg ml ⁻¹)	30	
C	ADN (20 µg ml ⁻¹)	30	
D	ADN (200 µg ml ⁻¹)	30	Cá phát tán virus được tiêm IPNV với nồng độ khoảng
E	Kháng nguyên IPNV	30	

F	Kháng nguyên IPNV/ADN (2 $\mu\text{g ml}^{-1}$)	30	10^7 TCID ₅₀ ml ⁻¹
G	Kháng nguyên IPNV/ADN (20 $\mu\text{g ml}^{-1}$)	30	
H	Kháng nguyên IPNV/ADN (200 $\mu\text{g ml}^{-1}$)	30	
I	Kháng nguyên IPNV/dầu Montanide (40%)	30	
J	Kháng nguyên IPNV/dầu Montanide (50%)	30	
K	Kháng nguyên IPNV/dầu Montanide (70%)	30	
L	Vacxin thương mại theo nhãn	30	
Cá phát tán virus		72	Bể 2 - liệu thử thách IPNV đối với thử nghiệm vacxin Cá phát tán virus được tiêm IPNV với nồng độ khoảng 10^7 TCID₅₀ ml⁻¹
A	Dextroza 5%	30	
B	ADN (2 $\mu\text{g ml}^{-1}$)	30	
C	ADN (20 $\mu\text{g ml}^{-1}$)	30	
D	ADN (200 $\mu\text{g ml}^{-1}$)	30	
E	Kháng nguyên IPNV	30	
F	Kháng nguyên IPNV/ADN (2 $\mu\text{g ml}^{-1}$)	30	
G	Kháng nguyên IPNV/ADN (20 $\mu\text{g ml}^{-1}$)	30	
H	Kháng nguyên IPNV/ADN (200 $\mu\text{g ml}^{-1}$)	30	
I	Kháng nguyên IPNV/dầu Montanide (40%)	30	
J	Kháng nguyên IPNV/dầu Montanide (50%)	30	
K	Kháng nguyên IPNV/dầu Montanide (70%)	30	
L	Vacxin thương mại theo nhãn	30	
Cá phát tán virus		72	Bể 3 - bể lấy mẫu dùng trong nghiên cứu điều biến miễn dịch Cá phát tán virus được tiêm IPNV với nồng độ khoảng 10^7 TCID₅₀ ml⁻¹
A	Dextroza 5%	30	
B	ADN (2 $\mu\text{g ml}^{-1}$)	30	
C	ADN (20 $\mu\text{g ml}^{-1}$)	30	
D	ADN (200 $\mu\text{g ml}^{-1}$)	30	
E	Kháng nguyên IPNV	30	
F	Kháng nguyên IPNV/ADN (2 $\mu\text{g ml}^{-1}$)	30	
G	Kháng nguyên IPNV/ADN (20 $\mu\text{g ml}^{-1}$)	30	
H	Kháng nguyên IPNV/ADN (200 $\mu\text{g ml}^{-1}$)	30	

I	Kháng nguyên IPNV/dầu Montanide (40%)	30	
J	Kháng nguyên IPNV/dầu Montanide (50%)	30	
K	Kháng nguyên IPNV/dầu Montanide (70%)	30	
L	Vacxin thương mại theo nhãn	30	
Cá phát tán virus		48	

Các thí nghiệm dùng liều thử thách được thực hiện đề cập đến việc chuyển sang nước biển sau tối thiểu 600 độ-ngày, khoảng 6 tuần sau khi chủng ngừa và điều khiển chu kỳ sáng. Cá được bỏ đói trong tối thiểu 25 giờ trước khi thử nghiệm. Tất cả các bể được cho dùng liều thử thách ở cùng thời điểm. Cá phát tán virus được tiêm trong màng bụng virus đã được nuôi cấy và được đánh dấu bằng cách cắt vây mỡ ở thời điểm dùng liều thử thách. Sau khi tiêm và đánh dấu, cá phát tán virus được đưa vào các bể. Cá có nguồn gốc từ bể 1 và 2 được phân phối vào các bể M5 và M6, và cá có nguồn gốc từ bể 3 được chuyển đến bể M2.

Lấy mẫu

Đối với mỗi thời điểm, cá được lọc ra và các mẫu mô, chẳng hạn tiền thận, gan và lách, thu được dùng để lập profin miễn dịch. Máu được thu nhận để phân tích huyết thanh và/hoặc hệ phiên mã. Ở mỗi thời điểm, 5 con cá trên mỗi mẫu điều trị được lựa chọn và lấy mẫu. Trước khi chủng ngừa, 10 con cá từ quần thể chung được lấy mẫu. Sau khi chủng ngừa, các mẫu từ bể số 3 được thu nhận ở 24 và 48 giờ sau khi chủng ngừa. Sau khi thử thách, các mẫu từ bể 1 và 2 được lấy để xác nhận tổn thất tiêu chuẩn (10% tỷ lệ tử vong). Các mẫu từ bể 3 được thu nhận ở 3 và 7 ngày sau khi thử thách. Ở cuối giai đoạn thử thách, cá sống sót được lựa chọn và lấy mẫu.

Chọn lọc điển hình cá chết từ các bể thử thách với IPNV (bể 1 và 2) được lấy mẫu thận và được thử nghiệm trong thử nghiệm IPNV Ag ELISA. Thực hiện chọn lọc ở thời điểm bắt đầu, thời điểm giữa, và thời điểm cuối khi tỷ lệ chết đạt đến tổng số là 10% cá (30 con/bể).

Chọn lọc điển hình cá chết trong suốt quá trình thử thách (~10% tổng số cá tham gia

vào thử nghiệm) được kiểm tra vi khuẩn học.

Kết quả

Sau khi đưa cá phát tán virus vào, nghiên cứu thử thách được để tiến triển cho đến khi tỷ lệ chết chững lại hoặc đạt 100% trong nhóm đối chứng âm tính. Đạt được trạng thái bình ổn về tỷ lệ chết ở giữa khoảng thời gian từ ngày 22 và ngày 28 sau khi lây nhiễm ở bể 1 và 2 (FIG. 4 & FIG. 5).

Cá đã chết được lấy mẫu bằng cách sử dụng thử nghiệm IPNV Ag ELISA và phân tích vi khuẩn học. Thử nghiệm IPNV Ag ELISA cho thấy 75,5% cá ở bể M6 dương tính với IPNV, 62,5% cá ở bể M5 và chỉ có 35,2% cá ở bể M2 (bảng 4). Các mẫu được lấy từ 10% cá chết được đưa đi phân tích vi khuẩn học. Tỷ lệ phần trăm mẫu không có sự phát triển của vi khuẩn được lấy từ cá ở các bể khác nhau là 77,5%, 64,9% và 98,1% đối với các bể M5, M6 và M2 tương ứng (Bảng 5). Phần lớn tỷ lệ chết được ghi nhận sau đó là âm tính đối với sự phát triển của vi khuẩn.

Bảng 4. Kết quả IPNV Ag ELISA.

Bể	Tổng số cá được thử nghiệm	Tổng số dương tính
M5	40 (26,5%)	25 (62,5%)
M6	57 (37,7%)	43 (75,5%)
M2	54 (35,8%)	19 (35,2%)

Bảng 5. Kết quả vi khuẩn học từ các bể M5, M6 và M2.

Bể	Ngày lấy mẫu	Tổng số cá được thử nghiệm	Tổng số mẫu âm tính với vi khuẩn	Tổng số mẫu dương tính với vi khuẩn
	01/07/2014	3	3	-
	02/07/2014	5	4	1
	03/07/2014	3	3	-

M5	04/07/2014	1	1	-
	05/07/2014	4	4	-
	08/07/2014	7	-	7
	09/07/2014	5	5	-
	18/07/2014	11	11	-
	21/07/2014	1	0	1
	Tổng cộng	40	31 (77,5%)	9 (22,5%)
M6	01/07/2014	12	7	5
	08/07/2014	12	-	12
	13/07/2014	8	7	1
	14/07/2014	6	4	2
	15/07/2014	4	4	
	16/07/2014	8	8	-
	17/07/2014	5	5	-
	18/07/2014	2	2	-
	Tổng cộng	57	37 (64,9%)	20 (35,1%)
M2	03/07/2014	2	2	-
	04/07/2014	1	1	-
	05/07/2014	1	1	-
	10/07/2014	4	4	-
	15/07/2014	4	4	-
	23/07/2014	42	41	1
	Tổng cộng	54	53 (98,1%)	1 (1,9%)

Đường cong độ sống sót Kaplan-Meier của dữ liệu kết hợp được xác định để hiểu và so sánh thời gian sống sót từ mỗi nhóm điều trị (nhóm A đến L). Như được quan sát trên FIG. 6, xác suất sống sót được tách biệt ở hai quần thể khác nhau. Quần thể với xác suất sống sót thấp hơn bao gồm cả được điều trị bằng dextroza (A) hoặc

3 liều lượng khác nhau của chất điều biến miễn dịch ADN không kèm kháng nguyên (B, C và D) trong khi quần thể thể hiện xác suất sống sót lớn hơn bao gồm các nhóm được điều trị chỉ với kháng nguyên IPNV (E), kháng nguyên IPNV được bào chế với chất điều biến miễn dịch ADN (F, G và H) hoặc với dầu Montanide (I, J và K), và vacxin thương mại (L). Khi so sánh tổng thể, sự khác biệt có nghĩa thống kê được nhận thấy ở các đường cong độ sống sót giữa 12 mẫu điều trị khác nhau (Chi bình phương = 110,6 df = 11; trị số p ($<0,0001$) = $2,2 \times 10^{-16}$).

Các mẫu điều trị được chia thành 2 cụm riêng biệt (FIG. 7). Một cụm bao gồm các mẫu được điều trị bằng dextroza (A) cũng như là tất cả các mẫu điều trị bằng chất điều biến miễn dịch ADN không kèm theo kháng nguyên (B, C, D). Cụm kia bao gồm cá chỉ được điều trị bằng kháng nguyên IPNV (E), vacxin được bào chế với chất điều biến miễn dịch ADN (F, G, H), kháng nguyên được bào chế với Montanide (I, J, K), và vacxin thương mại (L).

Khác biệt đáng kể giữa hai cụm này là hiển nhiên vì vậy khẳng định rằng độ sống sót của cá được cải thiện đáng kể bằng cách chủng ngừa so với nhóm đối chứng âm tính tuy nhiên không nhận thấy sự khác biệt giữa các chế phẩm vacxin khác nhau.

Độ sống sót tương đối tính theo tỷ lệ phần trăm được tính toán ở tất cả các nhóm điều trị ở cuối của thí nghiệm (RPSend) (FIG. 8). Sự khác biệt đáng kể được xác định giữa nhóm đối chứng âm tính được điều trị bằng 5% dextroza và tất cả các nhóm được điều trị bằng chế phẩm vacxin.

Thang đo Speilberg được dùng để đánh giá ảnh hưởng bất lợi có thể có của các tá dược được sử dụng để điều chế vacxin. Không quan sát thấy tác dụng thứ phát cụ thể nào. Thương tổn mô hầu như không tồn tại với điểm bám dính và biến đổi sắc tố chỉ ở mức 2 không thường xuyên (mức thấp) trong sản phẩm thương mại và điểm đối với chất điều biến miễn dịch ADN ở mức 1 (Bảng 6). Không có tồn dư vacxin phát hiện được trong cá bất kỳ được lấy mẫu.

Bảng 6. Điểm Spielberg đối với các bể M5 và M6.

Bể	Nhóm	Số cá được chấm điểm	Sự bám dính nội tạng (0-6)	Sự đổi màu (0-3)	Tồn dư vacxin (0-2)
M5	E	5	0	0	0
	F	7	0	0	0
	G	17	0	0	0
	H	16	1 trong 2 con cá	1 trong 1 con cá	0
	I	12	1 trong 1 con cá	1 trong 1 con cá	0
	J	14	0	0	0
	K	9	1 trong 2 con cá	1 trong 1 con cá	0
	L	9	1 trong 4 con cá 2 trong 5 con cá	1 trong 7 con cá 2 trong 2 con cá	0
M6	A	1	0	3 trong 1 con cá	0
	E	5	0	0	0
	F	7	0	0	0
	G	8	0	0	0
	H	5	1 trong 1 con cá	0	0
	I	13	1 trong 1 con cá	0	0
	J	8	0	1 trong 1 con cá	0
	K	5	0	0	0
	L	10	1 trong 7 con cá 2 trong 3 con cá	1 trong 5 con cá 2 trong 1 con cá	0
Dữ liệu	A	1	0	3 trong 1 con cá	0
	B	1	0	0	0
	D	1	0	0	0
	E	14	0	0	0
	F	21	0	0	0
	G	32	0	0	0

kết hợp	H	19	1 trong 3 con cá	1 trong 1 con cá	0
	I	25	1 trong 2 con cá	1 trong 1 con cá	0
	J	22	0	1 trong 1 con cá	0
	K	14	1 trong 2 con cá	1 trong 1 con cá	0
	L	19	1 trong 11 con cá 2 trong 8 con cá	1 trong 12 con cá 2 trong 3 con cá	0

Kết luận

Trong nghiên cứu này, hiệu lực của chất điều biến miễn dịch ADN được bào chế với IPNV bất hoạt dưới dạng vacxin ở cá hồi Đại Tây Dương đã được đánh giá. Khi chất điều biến miễn dịch ADN được dùng một mình (các mẫu điều trị B, C và D) nó tạo ra sự bảo vệ tối thiểu, với tỷ lệ chết nằm trong khoảng từ 93,3 đến 100% và xác suất sống sót không khác đáng kể so với nhóm đối chứng chỉ dùng dextroza. Điều này được cho là do đáp ứng miễn dịch bẩm sinh được gây ra bởi chất điều biến miễn dịch ADN hầu hết sẽ bị sử dụng trước thời điểm thử thách (588 độ-ngày hoặc khoảng 7 tuần sau khi chủng ngừa) mặc dù nó không được đánh giá trong nghiên cứu này.

Như được mô tả trên FIG. 8, sự có mặt của một mình kháng nguyên bất hoạt IPNV là đủ để làm gia tăng đáng kể xác suất sống sót của cá đã được chủng ngừa với RPSend thêm 21,4% so với nhóm dùng dextroza 5%. Sự bảo vệ được gia tăng hơn nữa với chế phẩm chứa chất điều biến miễn dịch ADN đã được bổ sung tá được (F=28,7%, G=42,9%, H=41,1%) và Montanide (I=42,9%, J=39,3%, K=23,2%). Về khía cạnh độ an toàn, không có vấn đề gì được ghi nhận và chất điều biến miễn dịch ADN được xem là an toàn để dùng cho cá.

Nghiên cứu này chỉ ra ứng dụng tiềm năng của chất điều biến miễn dịch ADN để dùng làm tá được cho vacxin dùng cho cá, nó có khả năng giúp gây ra đáp ứng miễn dịch ở cá hồi Đại Tây Dương cũng như tạo ra profin độ an toàn khi được dùng ở liều 10 ug hoặc thấp hơn.

Trong sáng chế này, cụm từ chứa danh từ và các từ "nêu trên", "đã nêu" được dự tính là gồm một hoặc nhiều danh từ tương ứng. Các thuật ngữ "chứa", "bao gồm" và "có" được dự tính là có nghĩa bao gồm và có nghĩa là có thể có các yếu tố bổ sung ngoài các yếu tố đã liệt kê.

Dựa vào phần mô tả trên đây, người ta sẽ thấy rằng một số đối tượng theo sáng chế đạt được và các kết quả có lợi khác cũng đạt được.

Các thay đổi khác có thể được thực hiện trong sản phẩm, các chế phẩm và các phương pháp nêu trên mà không trệch khỏi phạm vi của sáng chế, dự tính rằng tất cả các vấn đề chứa trong phần mô tả nêu trên và trong các hình vẽ đi kèm sẽ được hiểu là chỉ nhằm minh họa và không có nghĩa làm giới hạn phạm vi của sáng chế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm điều biến miễn dịch để dùng với một tác nhân gây miễn dịch trong điều trị hoặc ngăn ngừa sự lây nhiễm ở cá, trong đó chế phẩm điều biến miễn dịch này chứa trình tự axit nucleic kích thích miễn dịch có độ đồng nhất về trình tự ít nhất là 80% với trình tự được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, và SEQ ID NO: 4, và một chất dẫn cấp liposom chứa các cặp lipid được chọn từ nhóm bao gồm N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimetylmoni clorua (DOTMA) và cholesterol; N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimetylmoni clorua (DOTAP) và cholesterol; 1-[2-(oleoyloxy)ethyl]-2-oleyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolini clorua (DOTIM) và cholesterol; và dimetyldioctadecylamoni bromua (DDAB) và cholesterol.
2. Chế phẩm điều biến miễn dịch theo điểm 1, trong đó chế phẩm điều biến miễn dịch này còn chứa chất mang được dụng.
3. Chế phẩm điều biến miễn dịch theo điểm 1, trong đó chế phẩm điều biến miễn dịch này chứa trình tự axit nucleic kích thích miễn dịch có mức đồng nhất về trình tự ít nhất là 90% với trình tự được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, và SEQ ID NO: 4.
4. Chế phẩm điều biến miễn dịch theo điểm 1, trong đó chế phẩm điều biến miễn dịch này chứa trình tự axit nucleic kích thích miễn dịch có mức đồng nhất về trình tự ít nhất là 95% với trình tự được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, và SEQ ID NO: 4.
5. Chế phẩm điều biến miễn dịch theo điểm 1, trong đó chế phẩm điều biến miễn dịch này chứa trình tự axit nucleic kích thích miễn dịch có mức đồng nhất về trình tự ít nhất là 98% với trình tự được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, và SEQ ID NO: 4.
6. Chế phẩm điều biến miễn dịch theo điểm 1, trong đó chế phẩm điều biến miễn dịch này chứa trình tự axit nucleic kích thích miễn dịch có mức đồng nhất về trình tự ít nhất là 99% với trình tự được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2,

SEQ ID NO: 3, và SEQ ID NO: 4.

7. Chế phẩm điều biến miễn dịch theo điểm 6, trong đó trình tự axit nucleic kích thích miễn dịch chứa SEQ ID NO: 1.

8. Chế phẩm điều biến miễn dịch theo điểm 6, trong đó trình tự axit nucleic kích thích miễn dịch chứa SEQ ID NO: 2.

9. Chế phẩm điều biến miễn dịch theo điểm 6, trong đó trình tự axit nucleic kích thích miễn dịch chứa SEQ ID NO: 3.

10. Chế phẩm điều biến miễn dịch theo điểm 6, trong đó trình tự axit nucleic kích thích miễn dịch chứa SEQ ID NO: 4.

11. Chế phẩm điều biến miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, trong đó chất dẫn cấp liposom chứa N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimetylamoni clorua (DOTMA) và cholesterol.

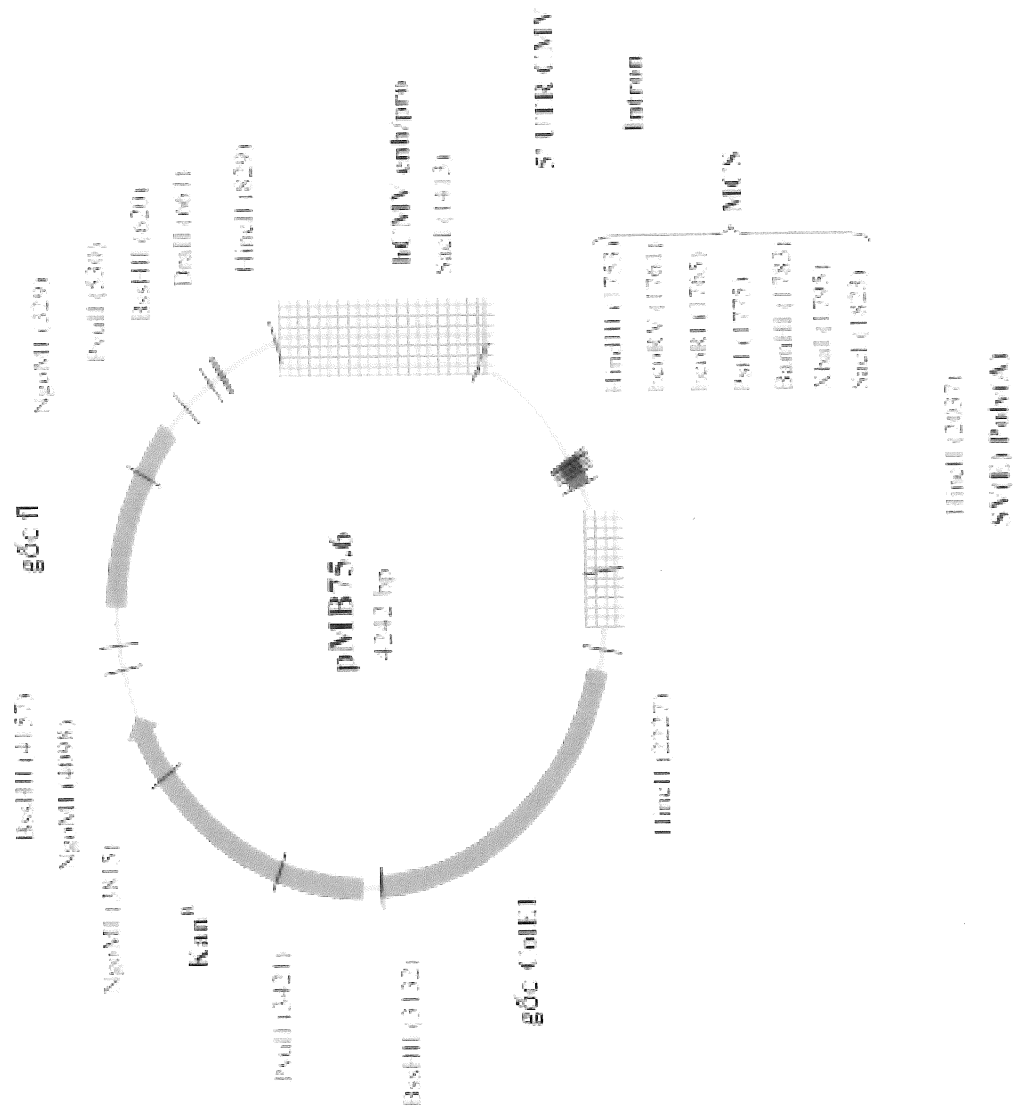
12. Chế phẩm điều biến miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, trong đó chất dẫn cấp liposom chứa N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimetylamoni clorua (DOTAP) và cholesterol.

13. Chế phẩm điều biến miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, trong đó chất dẫn cấp liposom chứa 1-[2-(oleoyloxy)ethyl]-2-oleyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolini clorua (DOTIM) và cholesterol.

14. Chế phẩm điều biến miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, trong đó chất dẫn cấp liposom chứa dimetyldioctadecylamoni bromua (DDAB) và cholesterol.

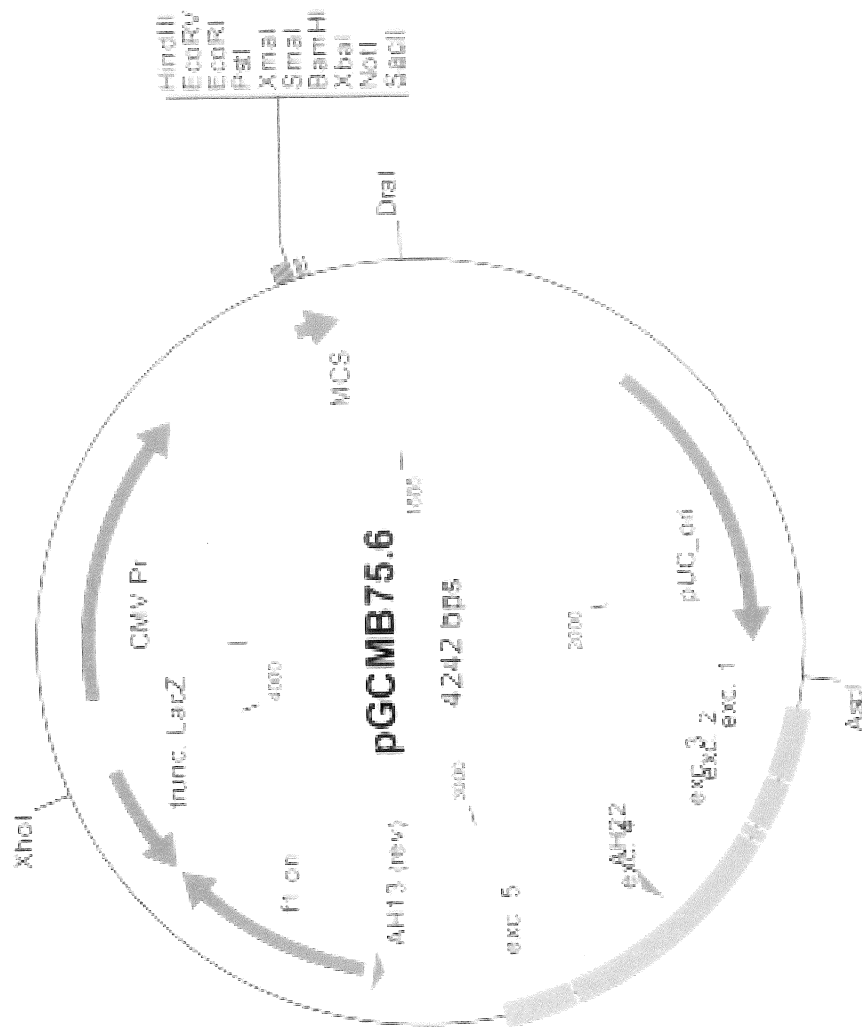
1/8

FIG. 1



2/8

FIG. 2



3/8

FIG. 3

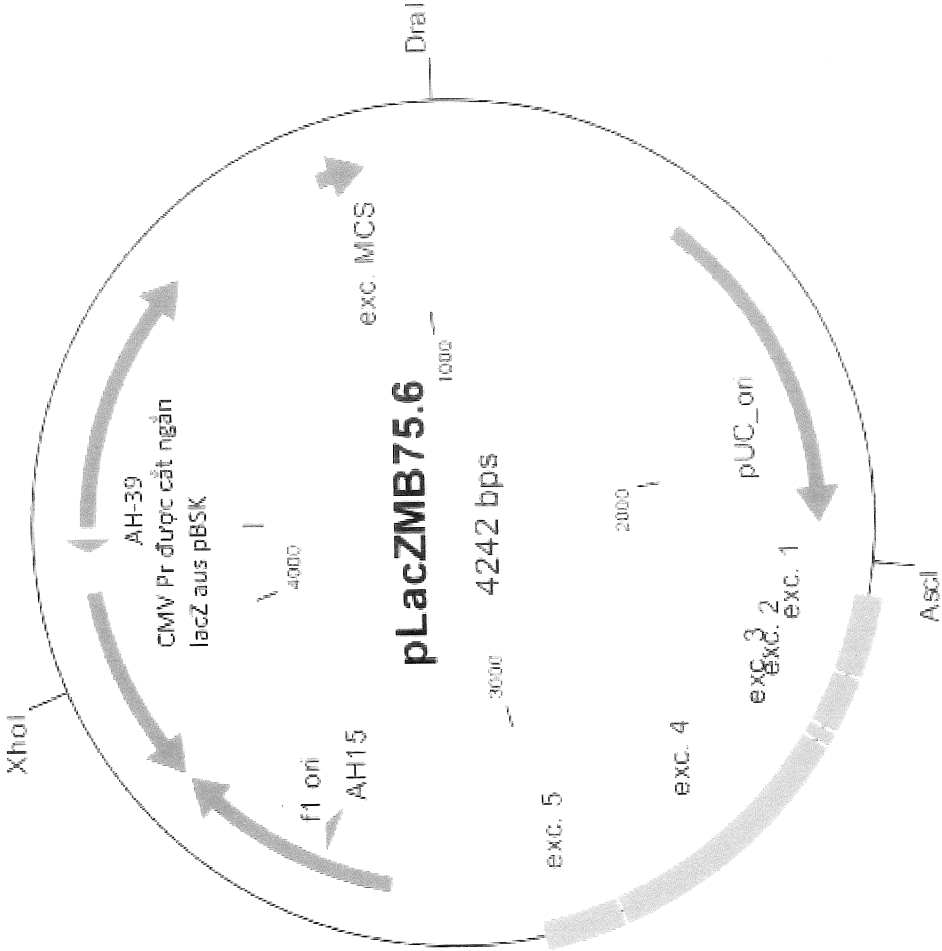


FIG. 4

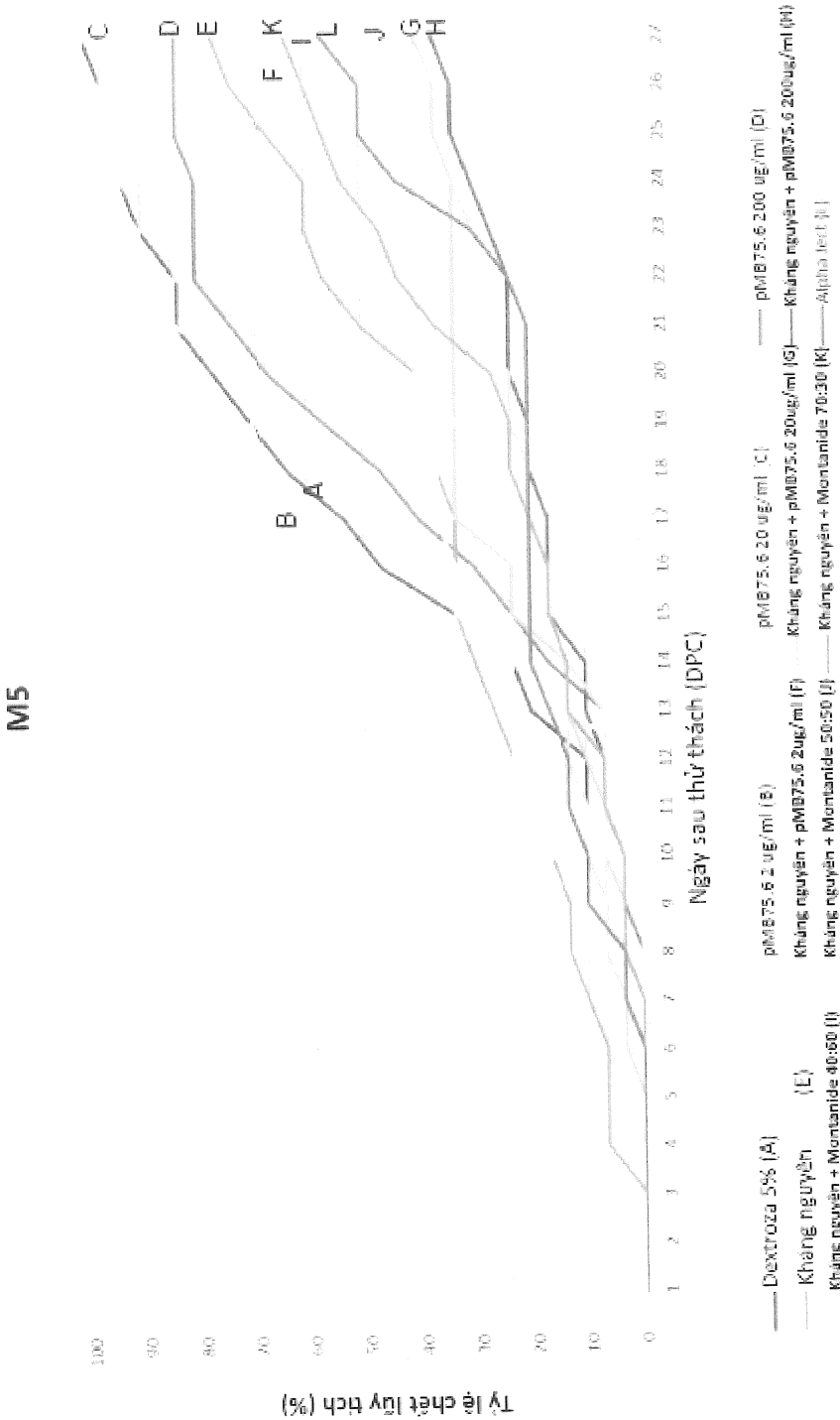
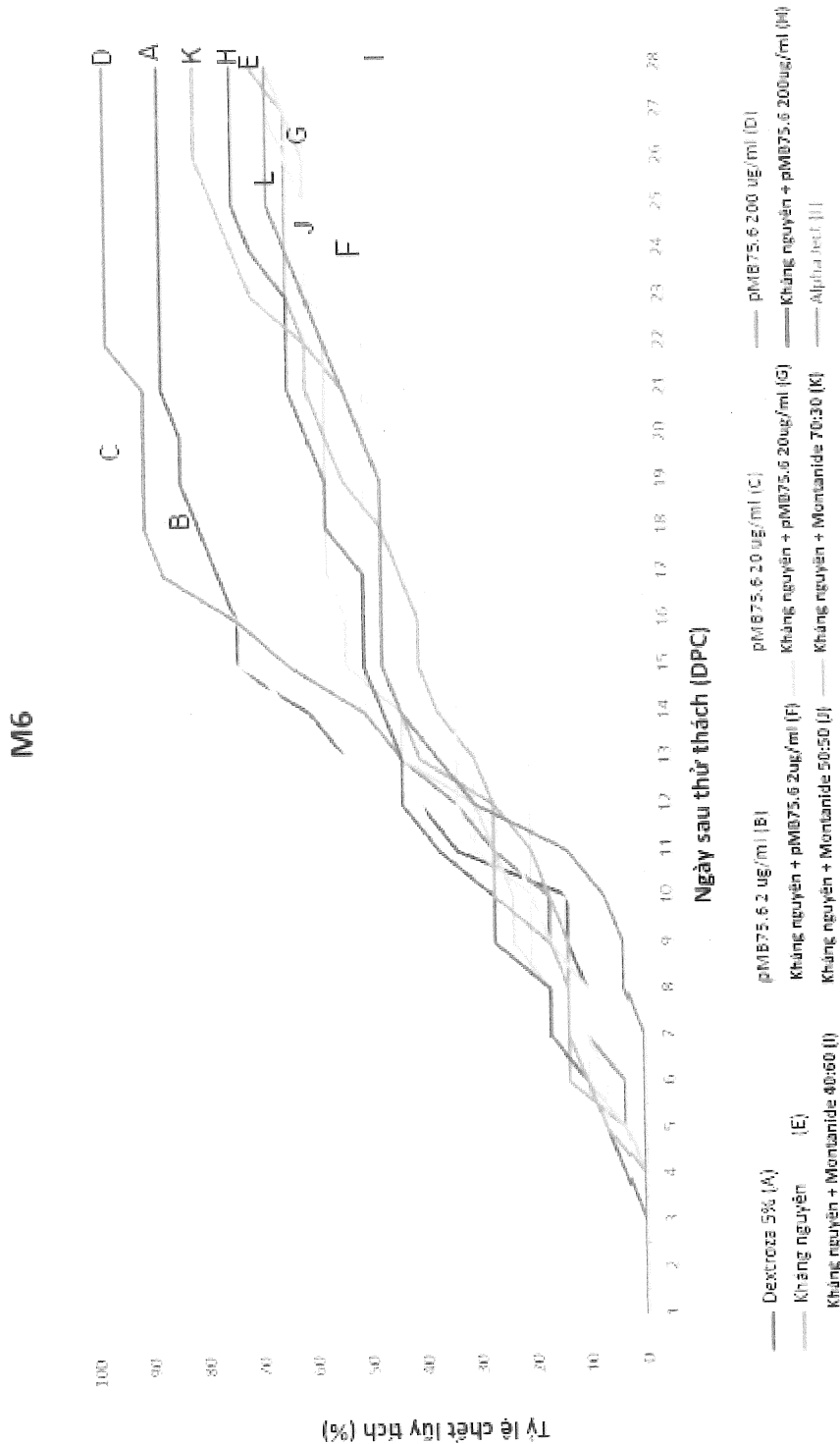


FIG. 5



7/8

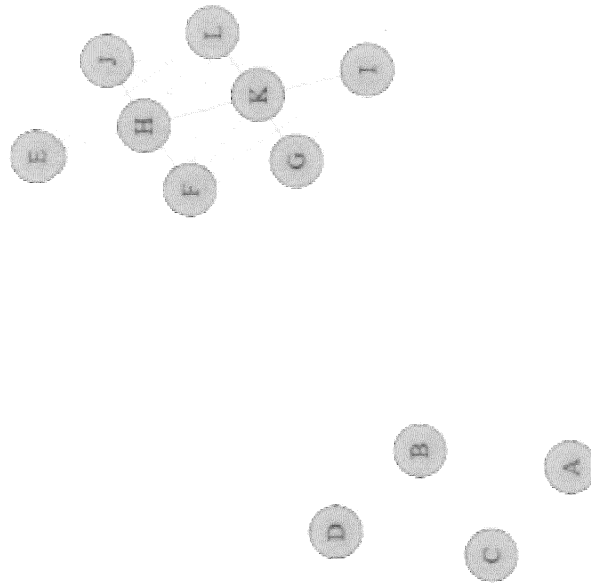
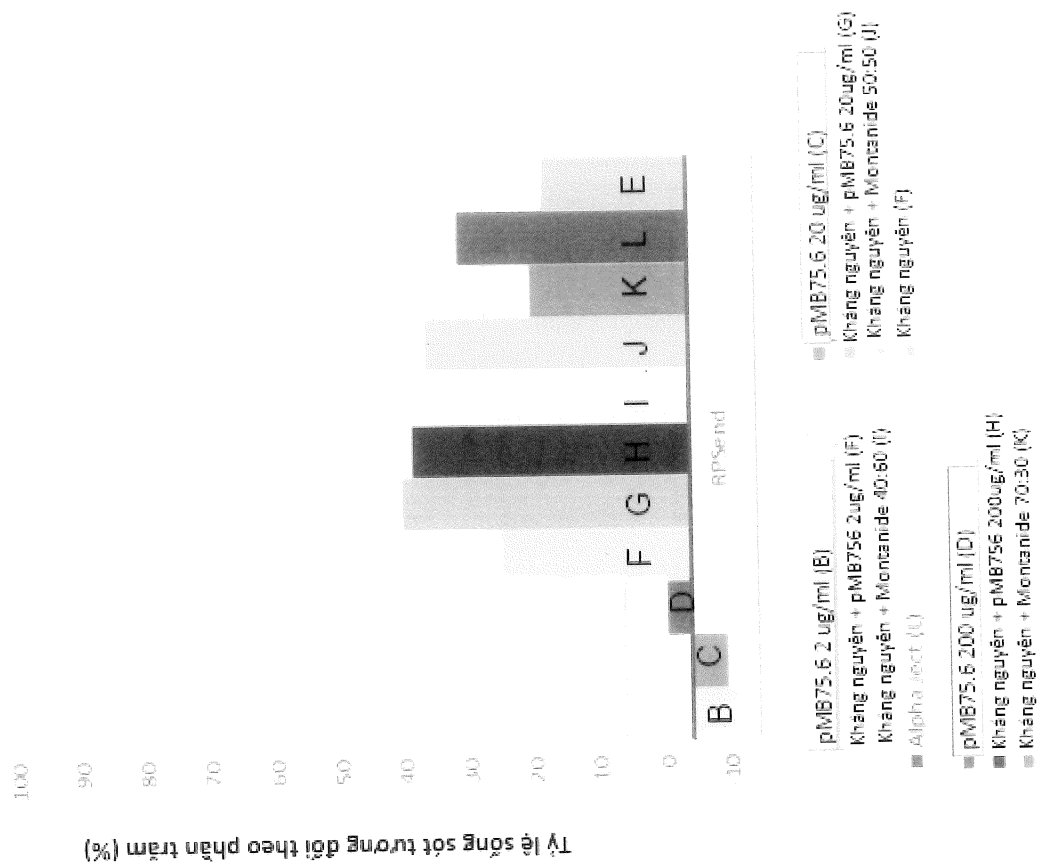
**FIG. 7**

FIG. 8



Danh mục trình tự

<110>

<120> CHẾ PHẨM ĐIỀU BIẾN MIỄN DỊCH ĐỂ ĐIỀU TRỊ HOẶC NGĂN NGỪA SỰ LÂY NHIỄM Ở CÁ

<130> BAYR

<160> 17

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 4242

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nucleotit của plasmit pGCMB75.6

<400> 1

tgaccgcca acgaccccg cccattgacg tcaataatga cgtatgttcc catagtaacg	60
ccaataggga ctttccattg acgtcaatgg gtggagtatt tacggtaaac tgcccacttg	120
gcagtacatc aagtgtatca tatgccaaagt ccgcccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa	180
tggcccgctt ggccattatgc ccagtacatg accttacggg actttcctac ttggcagtac	240
atctacgtat tagtcatcgc tattaccatg gtgatgcggt tttggcagta catcaatggg	300
cgtggatagc ggtttgactc acggggatgt ccaagtctcc accccattga cgtcaatggg	360
agtttggtttt ggcaccaaaa tcaacgggac tttccaaaat gtcgtaacaa ctccgcccc	420
ttgacgcaaa tgggcggtag gcgtgtacgg tgggaggtct atataagcag agctcgttta	480
gtgaaccgtc agatcgctg gagacgccat ccacgctgtt ttgacctcca tagaagacac	540
cgggaccgat ccagcctccc ctggaagccg atctgataac ggtaccgata agctggcggc	600
cgattaagct acagaagttg gtcgtgaggc actgggcagg taagtatcaa ggttacaaga	660
caggtttaag gagaccaata gaaactgggc ttgtcgagac agagaagact cttgcgtttc	720
tgataggcac ctattggtct tactgacatc cactttgcct ttctctccac aggtgtccac	780
tcccaggttc aattacagct cttaaagcagc cgcaagcttg atatcgaatt cctgcagccc	840
gggggatcca ctagttctag agcggccgcc accgcggtgg agctcgaatt atcagatcga	900
ttaataacta tgctcaaaaa ttgtgtacct ttagcttttt aatttgtaaa ggggttaata	960

aggaatatatt gatgtatagt gccttgacta gagatcataa tcagccatac cacattttgta	1020
gagggttttac ttgctttaaa aaacctccca cacctcccc tgaacctgaa acataaaatg	1080
aatgcaattg ttgttggttaa cttgtttatt gcagcttata atgggttacia ataaagcaat	1140
agcatcacaa atttcacaaa taaagcattt ttttcaactgc attctagtgtg tggtttgtcc	1200
aaactcatca atgtatctta tcatgtctgg atcatcagat ctgccggtct ccctatagtgt	1260
agtcgtatta atttcgataa gccagggttaa cctgcattaa tgaatcggcc aacgcgcggg	1320
gagaggcggg ttgctgattg ggcgctcttc cgcttcctcg ctcaactgact cgctgcgctc	1380
ggtcgttcgg ctgcggcgag cggatcagc tcaactcaaag gcggtaatac ggttatccac	1440
agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa	1500
ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc cgccccctg acgagcatca	1560
caaaaatcga cgctcaagtc agagggtggcg aaacccgaca ggactataaa gataccaggc	1620
gtttccccct ggaagctccc tcgtgcgctc tcctgttccg accctgccgc ttaccggata	1680
cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct catagctcac gctgtaggta	1740
tctcagttcg gtgtaggtcg ttcgctccaa gctgggctgt gtgcacgaac ccccgttca	1800
gcccgaccgc tgcgccttat ccggttaacta tcgtcttgag tccaaccgg taagacacga	1860
cttatcgcca ctggcagcag ccaactggtaa caggattagc agagcgagg atgtaggcgg	1920
tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagaa cagtatttgg	1980
tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct cttgatccgg	2040
caaacaaacc accgctggta gcggtgggtt ttttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag	2100
aaaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctacg gggctctgacg ctcagtggaa	2160
cgaaaactca cgtaaggga ttttgggtcat gggcgcgctt aggccttttgc aaagatcgat	2220
caagagacag gatgaggatc gtttcgcagc ttttcattct gactgcaacg ggcaataagt	2280
ctctgtgtgg attaaaaaaa gagtgtctga tagcagcttc tgaactgggtt acctgccgtg	2340
agtaaattaa aattttattg acttaggtca ctaaggcgcc ttgcgctgag gttgcgctgt	2400
gatatcatca gggcagaccg gttacatccc cctaacaagc tgtataaaga gaaatactat	2460
ctcattggcg ttgcccgcac ctgacagtgc gacgttgggc tgcgtccgtc gaccaacggt	2520

accgaggttaa cagcccaatc tatccatgat ctcgccagg cggggtcggc cgttatgcag	2580
cccggctcgg gtatgaagcc attaaggagc cgaccagcg cgaccgggcg gccggtcacg	2640
ctgcctctgc tgaagcctgc ctgtcactcc ctgcgcggcg taccgcgct tctcatcgag	2700
taggctccgg atcgcgaccc cggacgggccc ctgggcccag gagcggccta tgacaaatgc	2760
cgggtagcga tccggcattc agcattgact gcgcacggat ccagtccttg caggagcctt	2820
atgccgaccg tagcaaaaaa tgagcccag ccatcgcgga gttgtgatcc ggtcccgcg	2880
attgccggtc gcgatgacgg tcctgtgtaa gcgttatcgt taccaattgt ttaagaagta	2940
tatacgctac gaggtacttg ataacttctg cgtagcatac atgaggtttt gtataaaaat	3000
ggcggggcgat atcaacgcag tgtcagaaat ccgaaacagt ctgcgggact ctgggggttcg	3060
aaatgaccga ccaagcgacg cccaacctgc catcacgaga ttctgattcc accgccgcct	3120
tctatgaaag gttgggcttc ggaatcgttt tccgggacgc cggctggatg atcctccagc	3180
gcgggggatct catgctggag ttcttcgccc accctaggcg cgctcatgag cggatacata	3240
tttgaatgta tttagaaaaa taaacaaata ggggttccgc gcacatttcc ccgaaaagtg	3300
ccacctaaat tgtaagcggt aatattttgt taaaattcgc gttaaatttt tgttaaataca	3360
gctcattttt taaccaatag gccgaaatcg gcaaaatccc ttataaatca aaagaataga	3420
ccgagatagg gttgagtgtt gttccagttt ggaacaagag tccactatta aagaacgtgg	3480
actccaacgt caaagggcga aaaaccgtct atcagggcga tggcccacta cgtgaaccat	3540
caccctaate aagttttttg gggtcgaggt gccgtaaagc actaaatcgg aaccctaaag	3600
ggagcccccg atttagagct tgacggggaa agccggcgaa cgtggcgaga aaggaaggga	3660
agaaagcgaa aggagcgggc gctagggcgc tggcaagtgt agcggtcacg ctgcgcgtaa	3720
ccaccacacc cgccgcgctt aatgcgccgc tacagggcgc gtcccattcg ccattcaggc	3780
tgcgcaactg ttgggaaggg cgatcgggtgc gggcctcttc gctattacgc cagctggcga	3840
aaggggggatg tgctgcaagg cgattaagtt gggtaacgcc agggttttcc cagtcacgac	3900
gttgtaaaac gacggccagt gagcgcgcgt aatacgactc actatagggc gaattgggta	3960
ccgggcccc cctcgagcag gatctataca ttgaatcaat attggcaatt agccatatta	4020
gtcattgggtt atatagcata aatcaatatt ggctattggc cattgcatac gttgtatcta	4080

tatcataata tgtacattta tattggctca tgtccaatat gaccgccatg ttgacattga	4140
ttattgacta gttattaata gtaatcaatt acgggggtcat tagttcatag cccatatatg	4200
gagttccgcg ttacataact tacggtaaatt ggcccgcctg gc	4242

<210> 2
 <211> 4242
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nucleotit của plasmit pMB75.6

<400> 2	
ctaaattgta agcgttaata ttttggtaaa attcgcgtta aatttttgtt aaatcagctc	60
attttttaac caataggccg aaatcggcaa aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga	120
gataggggtg agtgttggtc cagtttgga caagagtcca ctattaaaga acgtggactc	180
caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca gggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc	240
ctaatacaagt tttttggggg cgaggtgccg taaagcacta aatcggaacc ctaaaggagg	300
cccccgattt agagcttgac ggggaaagcc ggcgaacgtg gcgagaaagg aagggaagaa	360
agcgaaagga gcgggcgcta gggcgctggc aagtgtagcg gtcacgctgc gcgtaaccac	420
cacacccgcc gcgcttaatg cgccgctaca gggcgcgctc cattcgccat tcaggctgcg	480
caactgttgga gaagggcgat cgggtgcgggc ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg	540
gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt aacgccaggg ttttcccagt cacgacgttg	600
taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata cgactcacta tagggcgaaat tgggtaccgg	660
gccccccctc gagcaggatc tatacattga atcaatattg gcaattagcc atattagtca	720
ttgggttatat agcataaatc aatattgggt attggccatt gcatacgttg tatctatatc	780
ataatatgta catttatatt ggctcatgtc caatatgacc gccatgttga cattgattat	840
tgactagtta ttaatagtaa tcaattacgg ggtcattagt tcatagccca tatatggagt	900
tccgcgttac ataacttacg gtaaattggc cgccctggctg accgcccaac gacccccgcc	960
cattgacgtc aataatgacg tatgttccca tagtaacgcc aatagggact ttccattgac	1020
gtcaatgggt ggagtattta cggtaaactg ccacttggc agtacatcaa gtgtatcata	1080

tgccaagtcc gccccctatt gacgtcaatg acggtaaagt gcccgccctgg cattatgccc	1140
agtacatgac cttacgggac tttcctactt ggcagtacat ctacgtatta gtcacgccta	1200
ttaccatggt gatgcgggtt tggcagtaca tcaatgggag tggatagcgg tttgactcac	1260
ggggatttcc aagtctccac cccattgacg tcaatgggag tttgttttgg caccaaaatc	1320
aacgggactt tccaaaatgt cgtaacaact ccgccccatt gacgcaaagt ggcggtaggc	1380
gtgtacgggtg ggaggtctat ataagcagag ctcgtttagt gaaccgtcag atcgccctgga	1440
gacgccatcc acgctgtttt gacctccata gaagacaccg ggaccgatcc agcctcccct	1500
cgaagccgat ctgataacgg taccgataag ctggcggccg attaagctac agaagttggt	1560
cgtgaggcac tgggcaggta agtatcaagg ttacaagaca ggtttaagga gaccaataga	1620
aactgggctt gtcgagacag agaagactct tgcgtttctg ataggcacct attggtctta	1680
ctgacatcca ctttgccttt ctctccacag gtgtccactc ccaggttcaa ttacagctct	1740
taagcagccg caagcttgat atcgaattcc tgcagcccgg gggatccact agttctagag	1800
cggccgccac cgcggtggag ctcgaattat cagatcgatt aataactatg ctcaaaaatt	1860
gtgtaccttt agctttttta tttgtaaagg ggttaataag gaatatttga tgtatagtgc	1920
cttgactaga gatcataatc agccatacca catttgtaga ggttttactt gctttaaaaa	1980
acctcccaca cctccccctg aacctgaaac ataaaatgaa tgcaattggt gttgttaact	2040
tgtttattgc agcttataat ggttacaaat aaagcaatag catcacaat ttcacaaata	2100
aagcattttt ttcactgcat tctagttgtg gtttgtccaa actcatcaat gtatcttata	2160
atgtctggat catcagatct gccggtctcc ctatagttag tcgatttaat ttcgataagc	2220
caggttaacc tgcattaatg aatcggccaa cgcgcgggga gaggcgggtt gcgtattggg	2280
cgctcttccg cttcctcgct cactgactcg ctgcgctcgg tcgttcggct gcggcgagcg	2340
gtatcagctc actcaaaggc ggtaatacgg ttatccacag aatcagggga taacgcagga	2400
aagaacatgt gagcaaaagg ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg	2460
gcgtttttcc ataggctccg cccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag	2520
aggtggcgaa acccgacagg actataaaga taccaggcgt tccccctgg aagctccctc	2580
gtgcgctctc ctgttccgac cctgccgctt accggatacc tgtccgcctt tctcccttcg	2640

ggaagcgtgg cgctttctca tagctcacgc tgtaggtatc tcagttcggg gtaggtcggt	2700
cgctccaagc tgggctgtgt gcacgaaccc cccgttcagc ccgaccgctg cgccttatcc	2760
ggtaactatc gtcttgagtc caaccggta agacacgact tatcgccact ggcagcagcc	2820
actggtaaca ggattagcag agcgaggtat gtaggcgggtg ctacagagtt cttgaagtgg	2880
tggcctaact acggctacac tagaagaaca gtatttggtg tctgcgctct gctgaagcca	2940
gttaccttcg gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca aacaaaccac cgctggtagc	3000
ggtgggtttt ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat	3060
cctttgatct tttctacggg gtctgacgct cagtggaaacg aaaactcacg ttaagggatt	3120
ttggatcatga gcgcgcctag gcttttgcaa agatcgatca agagacagga tgaggatcgt	3180
ttcgcatgat tgaacaagat ggattgcacg caggttctcc ggccgcttgg gtggagagggc	3240
tattcggcta tgactgggca caacagacaa tcggctgctc tgatgccgcc gtgttcgggc	3300
tgtcagcgca ggggcgccc gttctttttg tcaagaccga cctgtccggg gccctgaatg	3360
aactgcaaga cgaggcagcg cggctatcgt ggctggccac gacgggctt ccttgccgag	3420
ctgtgctcga cgttgctact gaagcgggaa gggactggct gctattgggc gaagtgccgg	3480
ggcaggatct cctgtcatct caccttgctc ctgccgagaa agtatccatc atggctgatg	3540
caatgcggcg gctgcatacg cttgatccgg ctacctgcc attcgaccac caagcgaaac	3600
atcgcatcga gcgagcacgt actcggatgg aagccgggtc tgtcgatcag gatgatctgg	3660
acgaagagca tcaggggctc gcgccagccg aactgttcgc caggctcaag gcgagcatgc	3720
ccgacggcga ggatctcgtc gtgacctatg gcgatgcctg cttgccgaat atcatggtgg	3780
aaaatggccg cttttctgga ttcacgact gtggccgggt ggggtgtggcg gaccgctatc	3840
aggacatagc gttggctacc cgtgatattg ctgaagagct tggcggcgaa tgggctgacc	3900
gcttcctcgt gctttacggg atcgccgctc ccgattcgca gcgcatcgcc ttctatcgcc	3960
ttcttgacga gttcttctga gcgggactct ggggttcgaa atgaccgacc aagcgacgcc	4020
caacctgcca tcacgagatt tcgattccac cgccgccttc tatgaaagggt tgggcttcgg	4080
aatcgttttc cgggacgccg gctggatgat cctccagcgc ggggatctca tgctggagtt	4140
cttcgcccac cctagggcgcg ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata	4200

aacaaatagg ggttccgcgc acatttcccc gaaaagtgcc ac

4242

<210> 3

<211> 4242

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nucleotit của plasmit pMB75.6_AscI

<400> 3

tgaccgcca acgacccccg ccattgacg tcaataatga cgtatgttcc catagtaacg	60
ccaataggga ctttccattg acgtcaatgg gtggagtatt tacggtaaac tgcccacttg	120
gcagtacatc aagtgtatca tatgccaaagt ccgcccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa	180
tggcccgctt ggcattatgc ccagtacatg accttacggg actttcctac ttggcagtac	240
atctacgtat tagtcatcgc tattaccatg gtgatgcggt tttggcagta catcaatggg	300
cgtggatagc ggtttgactc acggggatth ccaagtctcc accccattga cgtcaatggg	360
agtttgthttt ggcacaaaaa tcaacgggac tttccaaaat gtcgtaacaa ctccgcccc	420
ttgacgcaaa tgggcggtag gcgtgtacgg tgggaggtct atataagcag agctcgthta	480
gtgaaccgtc agatcgcttg gagacgccat ccacgtgtt ttgacctcca tagaagacac	540
cgggaccgat ccagcctccc ctggaagccg atctgataac ggtaccgata agctggcggc	600
cgattaagct acagaagttg gtcgtgaggc actgggcagg taagtatcaa gggtacaaga	660
caggthtaag gagaccaata gaaactgggc ttgtcgagac agagaagact cttgcgthtt	720
tgataggcac ctattggtct tactgacatc cactthgcct ttctctccac aggtgtccac	780
tcccaggtht aattacagct cthaagcagc cgcaagcttg atatcgaatt cctgcagccc	840
gggggatcca ctagthctag agcggccgcc accgcggtgg agctcgaatt atcagatcga	900
thtaataacta tgctcaaaaa ttgtgtacct ttagctthttt aatttgtaaa ggggthta	960
aggaatthtt gatgtatagt gccttgacta gagatcataa tcagccatac cacattthgt	1020
gaggthttac ttgctthtaa aaacctccca cacctcccc tgaacctgaa acataaaatg	1080
aatgcaattg ttgttgthta cttgthttatt gcagcttata atggthtaaa ataaagcaat	1140
agcatcacia atthcacaaa taaagcattt thttcactgc attctagtht tggtthgtcc	1200

aaactcatca atgtatctta tcatgtctgg atcatcagat ctgccggtct ccctatagtg	1260
agtcgtatta atttcgataa gccagggttaa cctgcattaa tgaatcggcc aacgcgcggg	1320
gagaggcggt ttgcgtattg ggcgctcttc cgcttcctcg ctactgact cgctgcgctc	1380
ggtcgttcgg ctgcggcgag cggtatcagc tcactcaaag gcggtaatac ggttatccac	1440
agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa	1500
ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc cgccccctg acgagcatca	1560
caaaaatcga cgctcaagtc agagggtggcg aaacccgaca ggactataaa gataccaggc	1620
gtttccccct ggaagctccc tcgtgcgctc tcctgttccg accctgccgc ttaccggata	1680
cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct catagctcac gctgtaggta	1740
tctcagttcg gtgtaggtcg ttcgctccaa gctgggctgt gtgcacgaac cccccgttca	1800
gcccgaccgc tgcgccttat ccggtaaacta tcgtcttgag tccaaccggt taagacacga	1860
cttatcgcca ctggcagcag ccactggtaa caggattagc agagcgaggt atgtaggcgg	1920
tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagaa cagtatttgg	1980
tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct cttgatccgg	2040
caaacaaacc accgctggta gcggtggttt ttttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag	2100
aaaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctacg gggctctgacg ctcagtggaa	2160
cgaaaactca cgttaaggga ttttggtcac gggcgcgcct aggccttttg c aaagatcgat	2220
caagagacag gatgaggatc gtttcgcatg attgaacaag atggattgca cgcaggttct	2280
ccggccgctt ggggtggagag gctattcggc tatgactggg cacaacagac aatcggctgc	2340
tctgatgccg ccgtgttccg gctgtcagcg caggggcgcc cggttctttt tgtcaagacc	2400
gacctgtccg gtgccctgaa tgaactgcaa gacgaggcag cgcggctatc gtggctggcc	2460
acgacgggcg ttccttgccg agctgtgctc gacgttgta ctgaagcggg aagggactgg	2520
ctgctattgg gcgaagtgcc ggggcaggat ctctgtcat ctacacctgc tcctgccgag	2580
aaagtatcca tcatggctga tgcaatgcgg cggctgcata cgcttgatcc ggctacctgc	2640
ccattcgacc accaagcgaa acatcgcac gagcgagcac gtactcggat ggaagccggt	2700
cttgtcgatc aggatgatct ggacgaagag catcaggggc tcgcgccagc cgaactgttc	2760

gccaggctca aggcgagcat gcccgacggc gaggatctcg tcgtgacca tggcgatgcc 2820
tgcttgccga atatcatggg ggaatatggc cgcttttctg gattcatcga ctgtggccgg 2880
ctgggtgtgg cggaccgcta tcaggacata gcgttggcta cccgtgatat tgctgaagag 2940
cttggcggcg aatgggctga ccgcttcctc gtgctttacg gtatcgccgc tcccgattcg 3000
cagcgcatcg ctttctatcg ctttcttgac gagttcttct gagcgggact ctggggttcg 3060
aatgaccga ccaagcgacg cccaacctgc catcacgaga ttctgattcc accgccgcct 3120
tctatgaaag gttgggcttc ggaatcgttt tccgggacgc cggctggatg atcctccagc 3180
gcggggatct catgctggag ttcttcgccc accctaggcg cgctcatgag cggatacata 3240
tttgaatgta tttagaaaaa taaacaaata ggggttccgc gcacatttcc ccgaaaagtg 3300
ccacctaaat tgtaagcggt aatattttgt taaaattcgc gttaaatttt tgttaaatca 3360
gctcattttt taaccaatag gccgaaatcg gcaaaatccc ttataaatca aaagaataga 3420
ccgagatagg gttgagtgtt gttccagttt ggaacaagag tccactatta aagaacgtgg 3480
actccaacgt caaagggcga aaaaccgtct atcagggcga tggcccacta cgtgaaccat 3540
caccctaatac aagttttttg gggtcgaggt gccgtaaagc actaaatcgg aaccctaaag 3600
ggagcccccg atttagagct tgacggggaa agccggcgaa cgtggcgaga aaggaaggga 3660
agaaagcgaa aggagcgggc gctagggcgc tggcaagtgt agcggtcacg ctgcgcgtaa 3720
ccaccacacc cgccgcgctt aatgcgccgc tacagggcgc gtcccattcg ccattcaggc 3780
tgcgcaactg ttgggaaggg cgatcggtgc gggcctcttc gctattacgc cagctggcga 3840
aagggggatg tgctgcaagg cgattaagtt gggtaacgcc agggttttcc cagtcacgac 3900
gttgtaaaac gacggccagt gagcgcgct aatacgactc actatagggc gaattgggta 3960
ccgggcccc cctcgagcag gatctataca ttgaatcaat attggcaatt agccatatta 4020
gtcattgggt atatagcata aatcaatatt ggctattggc cattgcatac gttgtatcta 4080
tatcataata tgtacattta tattggctca tgtccaatat gaccgccatg ttgacattga 4140
ttattgacta gttattaata gtaatcaatt acgggggtcat tagttcatag cccatatatg 4200
gagttccgcg ttacataact tacggtaaatt ggcccgcctg gc 4242

<210> 4
 <211> 4242

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nucleotit của plasmit pLacZMB75.6

<400> 4

tgaccgcccc acgacccccg ccattgacg tcaataatga cgtatgttcc catagtaacg	60
ccaatagggga ctttccattg acgtcaatgg gtggagtatt tacggtaaac tgcccacttg	120
gcagtacatc aagtgtatca tatgccaagt ccgcccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa	180
tggcccgccct ggcattatgc ccagtacatg accttacggg actttcctac ttggcagtac	240
atctacgtat tagtcatcgc tattaccatg gtgatgcggg tttggcagta catcaatggg	300
cgtggatagc ggtttgactc acggggattt ccaagtctcc accccattga cgtcaatggg	360
agtttgtttt ggcacaaaaa tcaacgggac tttccaaaat gtcgtaacaa ctccgcccc	420
ttgacgcaaa tgggcggtag gcgtgtacgg tgggaggtct atataagcag agctcgttta	480
gtgaaccgctc agatcgccctg gagacgccat ccacgctgtt ttgacctcca tagaagacac	540
cgggaccgat ccagcctccc ctccaagccg atctgataac ggtaccgata agctggcggc	600
cgattaagct acagaagttg gtcgtgaggc actgggcagg taagtatcaa gggtacaaga	660
caggtttaag gagaccaata gaaactgggc ttgtcgagac agagaagact cttgcgtttc	720
tgataggcac ctattggtct tactgacatc cactttgcct ttctctccac aggtgtccac	780
tcccagggttc aattacagct cttaagcagc cgccaaaaca aaattcctca aaaatcatca	840
tcgaatgaat ggtgaaataa tttccctgaa taactgtagt gttttcaggg cgcggcataa	900
taattaacta tgctcaaaaa ttgtgtacct ttagcttttt aatttgtaaa ggggttaata	960
aggaatatatt gatgtatagt gccttgacta gagatcataa tcagccatac cacatttgta	1020
gaggtttttac ttgcttttaa aaacctccca cacctcccc tgaacctgaa acataaaatg	1080
aatgcaattg ttgttggtta cttgtttatt gcagcttata atgggttaca ataaagcaat	1140
agcatcacaa atttcacaaa taaagcattt ttttcaactgc attctagttg tggtttgtcc	1200
aaactcatca atgtatctta tcatgtctgg atcatcagat ctgccggtct ccctatagtg	1260
agtcgtatta atttcgataa gccagggtta cctgcattaa tgaatcggcc aacgcgcggg	1320

gagaggcggt ttgcgtattg ggcgctcttc cgcttcctcg ctcactgact cgctgcgctc	1380
ggtcgttcgg ctgcggcgag cggtatcagc tcactcaaag gcggtataac ggttatccac	1440
agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa	1500
ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc cgccccctg acgagcatca	1560
caaaaatcga cgctcaagtc agaggtggcg aaacccgaca ggactataaa gataccaggc	1620
gtttccccct ggaagctccc tcgtgcgctc tctgttccg accctgcgc ttaccggata	1680
cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct catagctcac gctgtaggta	1740
tctcagttcg gtgtaggtcg ttcgctccaa gctgggctgt gtgcacgaac cccccgttca	1800
gcccgaaccgc tgcgccttat ccggtacta tcgtcttgag tccaaccgcg taagacacga	1860
cttatcgcca ctggcagcag cactggtaa caggattagc agagcgaggt atgtaggcg	1920
tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagaa cagtatttgg	1980
tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct cttgatccg	2040
caaacaaacc accgctggta gcggtggttt ttttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag	2100
aaaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctacg gggctcgacg ctcagtggaa	2160
cgaaaactca cgtaaggga ttttggtcat ggcgcgcct aggccttttgc aaagatcgat	2220
caagagacag gatgaggatc gtttcgcagc ttttcattct gactgcaacg ggcaataagt	2280
ctctgtgtgg attaaaaaaa gagtgtctga tagcagcttc tgaactgggt acctgccgtg	2340
agtaaattaa aattttattg acttaggtca ctaaggcgcc ttgcgctgag gttgcgctg	2400
gatatcatca ggcagaccg gttacatccc cctaacaagc tgtataaaga gaaatactat	2460
ctcattggcg ttgcccgcac ctgacagtgc gacgttgggc tgcgtccgct gaccaacggt	2520
accgaggtaa cagcccaatc tatccatgat ctcggccagg ccgggtcggc cgttatgcag	2580
ccgggctcgg gtatgaagcc attaaggagc cgaccagcg cgaccgggcg gccggtcacg	2640
ctgcctctgc tgaagcctgc ctgtcactcc ctgcgcggcg taccgcgct tctcatcgag	2700
taggctccgg atcgcgaccc cggacgggccc ctgggcccag gagcggccta tgacaaatgc	2760
cgggtagcga tccggcattc agcattgact gcgcacggat ccagtccttg caggagcctt	2820
atgccgaccg tagcaaaaaa tgagcccag ccgatcgca gttgtgatcc ggtcccgcg	2880

attgccggtc gcgatgacgg tcctgtgtaa gcgttatcgt taccaattgt ttaagaagta 2940
 tatacgctac gaggtacttg ataacttctg cgtagcatac atgagggttt gtataaaaat 3000
 ggcgggcgat atcaacgcag tgtcagaaat ccgaaacagt ctgcgggact ctgggggttcg 3060
 aaatgaccga ccaagcgacg cccaacctgc catcacgaga tttcgattcc accgccgcct 3120
 tctatgaaag gttgggcttc ggaatcgttt tccgggacgc cggtcggatg atcctccagc 3180
 gcgggggatct catgctggag ttcttcgccc accctaggcg cgctcatgag cggatacata 3240
 tttgaatgta tttagaaaaa taaacaaata ggggttcgc gcacatttcc ccgaaaagtg 3300
 ccacctaaat tgtaagcggt aatattttgt taaaattcgc gttaaatttt tgtaaataca 3360
 gctcattttt taaccaatag gccgaaatcg gcaaaatccc ttataaatca aaagaataga 3420
 ccgagatagg gttgagtgtt gttccagttt ggaacaagag tccactatta aagaacgtgg 3480
 actccaacgt caaagggcga aaaaccgtct atcagggcga tggcccacta cgtgaaccat 3540
 caccctaate aagttttttg gggtcgaggt gccgtaaagc actaaatcgg aaccctaaag 3600
 ggagcccccg atttagagct tgacggggaa agccggcgaa cgtggcgaga aaggaaggga 3660
 agaaagcgaa aggagcgggc gctagggcgc tggcaagtgt agcggtcacg ctgcgcgtaa 3720
 ccaccacacc cgccgcgctt aatgcgcgcg tacagggcgc gtcccattcg ccattcaggc 3780
 tgcgcaactg ttgggaaggg cgatcgggtgc gggcctcttc gctattacgc cagctggcga 3840
 aaggggggatg tgctgcaagg cgattaagtt gggtaacgcc agggttttcc cagtcacgac 3900
 gttgtaaaac gacggccagt gagcgcgcgt aatacgactc actatagggc gaattgggta 3960
 ccgggcccc cctcgaggtc gacggtatcg ataagcttga tatcgaattc ctgcagcccc 4020
 ggggatccac tagttctaga gcggccgcca ccgcggtgga gctccagctt ttgttccctt 4080
 tagtgagggg taattgcgcg cttggcgtaa tcatgggtcat agctgtttcc tgtgtgaaat 4140
 tgttatccgc tcacaattcc acacaacata cgagccggaa gcataaagtg taaagcctgg 4200
 ggtgcctaata gaggtagcta actcacatta attgcgttgc gc 4242

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

<220>
<223> Đoạn mỗi

<400> 5
gtgcgcgga cccctatttg 20

<210> 6
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mỗi

<400> 6
gcgtacccgc cgttctcatc 20

<210> 7
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mỗi

<400> 7
gtctgacgct cagtggaacg 20

<210> 8
<211> 22
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mỗi

<400> 8
gttccagttt ggaacaagag tc 22

<210> 9
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mỗi

<400> 9 ggcaattagc catattagtc	20
<210> 10 <211> 22 <212> ADN <213> Trình tự nhân tạo	
<220> <223> Đoạn mỗi	
<400> 10 gcagagctcg tttagtgaac cg	22
<210> 11 <211> 21 <212> ADN <213> Trình tự nhân tạo	
<220> <223> Đoạn mỗi	
<400> 11 gatcataatc agccatacca c	21
<210> 12 <211> 27 <212> ADN <213> Trình tự nhân tạo	
<220> <223> Đoạn mỗi	
<400> 12 cgtcttgagt ccaacccggt aagacac	27
<210> 13 <211> 24 <212> ADN <213> Trình tự nhân tạo	
<220> <223> Đoạn mỗi	
<400> 13 ccacaggtgt ccactcccag gttc	24

<210> 14
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi

<400> 14
 ctagtcaagg cactatacat c

21

<210> 15
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi

<400> 15
 tccacagaat caggggataa cg

22

<210> 16
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi

<400> 16
 gctcactcat taggcacccc agg

23

<210> 17
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi

<400> 17
 cgcgtaatac gactcactat ag

22