



(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) 
1-0021689

(51)⁷ **C12N 15/00, A61K 39/12, A61P 31/14,** (13) **B**
A61K 35/76

(21) 1-2013-03831

(22) 07.05.2011

(86) PCT/IB2011/000977 07.05.2011

(87) WO2012/153160 15.11.2012

(45) 25.09.2019 378

(43) 25.04.2014 313

(73) LABORATORIO AVI-MEX, S.A. DE C.V. (MX)

Maíz No. 18, Col. Granjas Esmeralda, Del. Iztapalapa, México, D.F. 09810, México

(72) LOZANO-DUBERNARD, Bernardo (MX), SOTO-PRIANTE, Ernesto (MX),
SARFATI-MIZRAHI, David (MX), LARA-PUENTE, Jesus, Horacio (MX)

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) **VECTƠ VIRUT CÓ KHẢ NĂNG TẠO RA ĐÁP ỨNG MIỄN DỊCH CỦA TẾ BÀO
Ở LỢN VÀ VACXIN KHÁNG HỘI CHỨNG RỐI LOẠN SINH SẢN VÀ HÔ HẤP
Ở LỢN (PRRS) TÁI TỔ HỢP**

(57) Sáng chế đề cập đến vacxin tái tổ hợp sống hoặc được làm bất hoạt, bao gồm vectơ virus và tá dược dạng lỏng, chất bổ trợ và/hoặc tá dược được dùng, trong đó vectơ virus này là virus có khả năng tạo ra đáp ứng miễn dịch của tế bào do sự tạo ra alpha và/hoặc gama interferon được gia tăng và có khả năng sao chép một cách nhanh chóng và trình tự nucleotit ORF 5 và ORF 6 của PRRS được xen vào.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các kỹ thuật được sử dụng để ngăn ngừa và kiểm soát hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome-PRRS) và cụ thể hơn là, sáng chế đề cập đến vacxin tái tổ hợp chứa vector virut có trình tự nucleotit ngoại sinh được xen vào mã hóa đối với protein có hoạt tính kháng nguyên kháng virut PRRS và tá dược dạng lỏng, chất bổ trợ và/hoặc tá dược được dùng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Virut gây ra hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus-vPRRS) là virut được bao màng thuộc nhóm ARN, họ *Arteriviridae*, chi *Arterivirus*. Kích thước của nó khoảng gần 460nm và hệ gen virut của nó bao gồm bởi sợi ARN theo nghĩa dương tính, mà dẫn đến 7 khung đọc mở (ORF), ORF1a, ORF1b, ORF2-ORF7, mà lần lượt dẫn đến sự lắp ráp của 7 protein cấu trúc (gp 2a, 2b – 5, M và N) và ít nhất 13 protein không có cấu trúc (nsp 1a, nsp 1b- nsp 12), mỗi protein có chức năng đặc hiệu tạo ra vPRRS. Virut này thể hiện tập tính điều biến miễn dịch khi nhiễm một cách chọn lọc dòng tế bào bạch cầu đơn nhân/đại thực bào chịu trách nhiệm bắt đầu đáp ứng miễn dịch và tham gia vào việc định hướng đáp ứng miễn dịch, không kể các yếu tố khác. Virut này đã chứng minh có khả năng làm thay đổi đáp ứng miễn dịch bằng cách làm giảm sự tạo ra gamma interferon (IFN γ) và sau cùng tạo ra các kháng thể trung tính và tạo ra các bẫy miễn dịch (Yoo et al., 2009; Sang et al., 2009; Patel et al., 2009; Chen et al., 2009; Lalit, 2009). Do vPRRS có sự biến đổi kháng nguyên ở mức cao, nên khó sử dụng phương pháp truyền thống dựa trên các chiến lược tiêm chủng khác nhau để chống lại nó. Bởi vì điều này, những nỗ lực trên toàn thế giới đã được thực hiện để phát triển khả năng sinh học nhằm chống lại sự lan tỏa của lây nhiễm và các tác dụng của nó, các sản phẩm của công nghệ di truyền của virut, là sự lựa chọn tốt nhất để đạt được điều này (Lara, 2010). Trong trường hợp này, các cấu trúc dưới phân tử virut mà có thể tạo ra

loại bảo vệ bất kỳ cũng được nghiên cứu, việc sử dụng ORF 5 và ORF 6 đã thể hiện các mong đợi tốt bởi vì chúng có thể đáp ứng, ít nhất một phần, đối với tính độc virus (Kim et al., 2009; Zuckerman et al., 2007), với điều kiện rằng miễn dịch đạt được với các sản phẩm sống (sao chép) do chỉ có miễn dịch tạo ra sự bảo vệ theo thử thách miễn dịch, sự bảo vệ này được xác định bởi mức độ giảm sự nhiễm virus huyết sau thử thách. Vào năm 2005, các đột biến ORF 5 đã được phát triển bằng cách làm biến đổi sự glycosil hóa của chúng và chúng được thử nghiệm như chất kháng nguyên, cho biết rằng sự glycosil hóa thấp GP5 làm tăng khả năng của vPRRS để cảm ứng kháng thể trung tính *in vivo* (Ansari et al., 2005).

Trong trường hợp cụ thể của ORF 5, vùng nằm trong khoảng các gốc axit amin từ 1 đến 25 có tính thay đổi ở mức cao trong số các thể phân lập ở Mỹ và Châu Âu, trong khi vùng siêu biến của các vùng của chúng ở mỗi lục địa được phân nhóm nằm trong khoảng các axit amin từ 26 đến 39, gần với trình tự đầu cuối của axit amin.

Sự thay đổi trong trình tự ORF 5 có thể dẫn đến sự bùng nổ bệnh không điển hình như hội chứng sảy thai và tử vong ở lợn (swine abortion and mortality syndrome (SAMS)), hoặc hội chứng “sốt cao” được nhận thấy ở Trung Quốc (Ferrari et al., 2003; Martelli, 2003).

Hiện nay, vắc xin kháng PRRS được thương mại hóa chứa virus bị giảm độc lực, tuy nhiên, có bất lợi là có khả năng lây nhiễm cho lợn, dẫn đến sự phát triển bệnh và tổn hại miễn dịch, chủ yếu là ở các động vật non (naive) (dễ bị nhiễm ở mức cao mà không cần sự phơi nhiễm trước); ngoài ra, đã thể hiện rằng virus vắc xin này bị đột biến và tự bản thân nó có thể tái tổ hợp với các virus có trên cánh đồng, do đó tạo ra các biến thể di truyền mới của virus. Tương tự, các nghiên cứu đã được thực hiện chỉ ra rằng vắc xin bị giảm độc lực sống là hoàn toàn không có hiệu quả để ngăn ngừa bệnh, ngoài ra, trước đây đã chỉ ra rằng các kháng thể kháng vPRRS có liên quan đến các cơ chế khuếch đại của sự tăng cường phụ thuộc kháng thể (ADE) và/hoặc trong sự phát sinh bệnh miễn dịch do vPRRS gây ra (Thanawongnuwech and Suradhat, 2010), mà có thể gây ra rằng, trái với sự mong đợi, động vật được tiêm chủng trở nên dễ bị ảnh hưởng bởi bệnh PRRS hơn.

Do các vấn đề trên đây, có vài patent đã đề cập đến vaccin tái tổ hợp kháng bệnh này.

Patent Mỹ số 7,722,878 bộc lộ vaccin tái tổ hợp kháng PRRS, gồm có vector bao gồm phần ORF 1 của vPRRS, đơn lẻ hoặc tổ hợp với ORF khác. Các vaccin này là hữu ích để cảm ứng đáp ứng miễn dịch ở động vật và ngăn ngừa và làm giảm tính nguy kịch và triệu chứng của tình trạng bệnh do sự nhiễm vPRRS gây ra. Để xác định hiệu quả của các vaccin này, nhiều tương tổn phổi, đặc trưng của vPRRS, được đo, đạt được sự giảm thương tổn phổi đến 47%.

Trong patent Mỹ số 5,888,513, protein tái tổ hợp tương ứng với ORF2 – ORF7 của vPRRS được phân lập ở Tây Ban Nha là được bộc lộ, mà được tạo ra trong hệ biểu hiện baculovirut và có thể được sử dụng trong chế phẩm vaccin.

Các công bố đơn yêu cầu cấp patent Trung Quốc số CN1554766A và CN1800375A mô tả vaccin tái tổ hợp kháng PRRS, mà sử dụng adenovirut làm vector. Tương tự, công bố đơn yêu cầu cấp patent Trung Quốc số CN1778926A mô tả gen được biến đổi ORF 5 của vPRRS, mà có thể được sử dụng trong sản xuất vaccin kháng bệnh này.

Trong patent Mỹ số 7,041,443, virut, polynucleotit và polypeptit của PRRS kiểu châu Âu được mô tả, mà có thể được sử dụng trong sản xuất chế phẩm gây miễn dịch, mà bao gồm trong vPRRS được giảm độc lực hoặc được làm bất hoạt bao gồm polynucleotit được chọn từ vài trình tự.

Mặt khác, patent Mỹ số 6,207,165 bộc lộ công thức vaccin đa hóa trị để tiêm chủng cho lợn kháng các chất mầm bệnh có liên quan đến các bệnh sinh sản và/hoặc hô hấp, một trong số chúng là PRRS. Vaccin này bao gồm ít nhất ba loại vaccin, mỗi loại bao gồm plasmit và gen với hóa trị mầm bệnh cho lợn, mà trong trường hợp của PRRS có thể là các gen E, ORF 3 hoặc M.

Sau cùng, patent Mỹ số 5,998,601 bộc lộ trình tự nucleotit của chủng VR-2332 của vPRRS, mà có thể mã hóa đối với ORF hoặc đoạn của nó, cũng như các vaccin thu được từ đó.

Không kể đến những vấn đề trên đây, mặc dù vacxin được mô tả trong lĩnh vực này có tác dụng làm giảm tác dụng của bệnh, đến nay mức bảo vệ kháng vPRRS mà là đủ để kiểm soát bệnh có hiệu quả vẫn chưa đạt được.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Để khắc phục các hạn chế của kỹ thuật hiện nay, mục đích của sáng chế là đề xuất vacxin tái tổ hợp chứa vector virus có hiệu quả kháng hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn (PRRS).

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất vacxin tái tổ hợp chứa vector virus kháng PRRS, tạo ra đáp ứng miễn dịch nhanh hơn so với vacxin chủ yếu tạo thành từ virus PRRS toàn phần.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất việc sử dụng vacxin tái tổ hợp chứa vector virus để kiểm soát PRRS.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất cấu trúc của vector virus có trình tự nucleotit ngoại sinh được xen vào mã hóa protein có hoạt tính kháng nguyên kháng virus PRRS.

Tóm lại, vacxin tái tổ hợp được tạo ra bao gồm vector virus có khả năng tạo ra đáp ứng miễn dịch của tế bào do sự sản xuất của alpha và/hoặc gama interferon được gia tăng và có khả năng sao chép nhanh chóng, tốt hơn là dựa trên virus gây bệnh Newcastle, có trình tự nucleotit của PRRS được xen vào được chọn từ ORF 5, ORF 6 và các tổ hợp của chúng và tá được dạng lỏng, chất bổ trợ và/hoặc tá được được dùng.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các khía cạnh mới xét đến các đặc điểm của sáng chế sẽ được thiết lập một cách đặc biệt trong các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo. Tuy nhiên, một số phương án, dấu hiệu và một số mục đích và thuận lợi của nó, sẽ được hiểu tốt hơn trong phần mô tả chi tiết sáng chế, khi mô tả kèm tham chiếu đến các hình vẽ kèm theo, trong đó:

Fig.1 thể hiện thể trọng đạt được ở lợn được gây miễn dịch bằng vacxin được làm bất hoạt kháng PRRS theo sáng chế so với vacxin có bán trên thị trường.

Fig.2 thể hiện thể trọng đạt được ở lợn được gây miễn dịch bằng vaccin sống kháng PRRS theo sáng chế so với vaccin có bán trên thị trường.

Mô tả chi tiết sáng chế

Trong khi phát triển sáng chế, ngạc nhiên là, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng vaccin tái tổ hợp bao gồm vector virus có khả năng tạo ra đáp ứng miễn dịch của tế bào do sự sản xuất của alpha và/hoặc gama interferon được gia tăng và có khả năng sao chép nhanh chóng, có trình tự nucleotit ngoại sinh được xen vào mã hóa đối với các vị trí kháng nguyên của virus PRRS (vPRRS) và tá được dạng lỏng, chất bổ trợ và/hoặc tá được được dùng, tạo ra sự bảo vệ thích hợp kháng hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn.

Vector virus này được sử dụng có thể là sống (hoạt động) hoặc được làm bất hoạt (chết). Sự làm bất hoạt cần được hiểu rằng virus tái tổ hợp có tác dụng như vector virus và có trình tự nucleotit mã hóa các vị trí kháng nguyên của vPRRS đã bị mất khả năng sao chép. Sự làm bất hoạt đạt được bằng quy trình vật lý hoặc hóa học đã được biết đến trong lĩnh vực này, tốt hơn là bằng cách làm bất hoạt hóa học bằng formaldehyt hoặc beta-propiolacton (Office International des Epizooties 2008). Newcastle Disease. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Office International des Epizooties. France, p. 576-589). Trái lại, “virus hoạt động hoặc sống” cần được hiểu rằng nó vẫn giữ lại khả năng sao chép của nó.

Tốt hơn là, vector virus được sử dụng là paramyxovirus, được chọn từ paramyxovirus bất kỳ, bao gồm kiểu huyết thanh, kiểu gen hoặc kiểu di truyền bất kỳ, bao gồm các virus thể độc lực thấp, trung bình và cao. Tương tự, có thể sử dụng paramyxovirus mà các kỹ thuật di truyền ngược có thể được thực hiện để loại bỏ phenylalanin ra khỏi vị trí 117, và axit amin bazơ ra khỏi vị trí gần với vị trí Q114, mà tạo ra khả năng gây bệnh đối với paramyxovirus, hoặc paramyxovirus bao gồm ở chim bị nhiễm chi *Avulavirus*, như virus gây bệnh Newcastle hoặc virus Sendai. Tốt hơn nữa là, vector virus là virus gây bệnh Newcastle, tốt hơn là vector virus này được chọn từ các chủng thể độc lực thấp hoặc độc lực trung bình, như các chủng LaSota, B1, QV4, Ulster, Roakin, Komarov. Tốt hơn, virus tái tổ hợp là từ chủng LaSota.

Đối với trình tự nucleotit mã hóa các vị trí kháng nguyên của vPRRS, theo kỹ thuật hiện nay, vài trình tự ORF đã được mô tả, như các trình tự của ORF 5 và ORF 6, mà có thể được sử dụng để tạo ra các vacxin kháng PRRS, như các vacxin được mô tả trong các patent Mỹ số 5,885,513 và 7,041,443, và trong công bố đơn yêu cầu cấp patent Trung Quốc số CN1778926A. Trong trường hợp của sáng chế, các trình tự nucleotit được sử dụng là được chọn từ các trình tự được mô tả trong SEQ ID NO:1 (ORF 5), SEQ ID NO:2 (ORF 6), và các tổ hợp của chúng.

Vector virus của vacxin của sáng chế có thể được tạo ra bằng cách khuếch đại bởi PCR trình tự nucleotit quan tâm mà sẽ được xen vào sau đó, khi được khuếch đại, vào vector virus paramyxovirus. Việc xen vào này được thực hiện bằng cách sử dụng các kỹ thuật tách dòng chuẩn của sinh học phân tử. Do đó, dòng bị lây nhiễm thu được được lây truyền vào trong môi trường nuôi cấy tế bào để tạo ra virus tái tổ hợp.

Virus sao chép trong hệ bất kỳ thích hợp đối với sự phát triển của nó, như phôi gà SPF hoặc các dòng tế bào có bán trên thị trường hoặc các dòng tế bào được thiết kế riêng để phát triển virus, cho đến khi đạt đến nồng độ virus cần thiết để đạt được đáp ứng kháng nguyên, tốt hơn là nằm trong khoảng từ $10^{6,0}$ đến $10^{10,0}$ DIEP50%/mL, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ $10^{8,0}$ đến $10^{9,5}$ DIEP50%/mL. Theo phương án về vacxin sống, nó được sử dụng một cách tự nhiên virus hoạt động vacxin thể độc lực thấp hoặc được làm giảm độc lực bằng các quy trình đã được biết đến trong lĩnh vực này. Mặt khác, khi vacxin được làm bất hoạt, khi đạt đến nồng độ virus cần thiết để đạt được đáp ứng kháng nguyên, thì virus được làm bất hoạt. Tốt hơn là, việc làm bất hoạt này được thực hiện bằng các quy trình vật lý hoặc hóa học đã được biết đến trong lĩnh vực này, tốt hơn là bằng cách làm bất hoạt hóa học bằng formaldehyt, beta-propiolacton hoặc etylenamin nhị phân (B.E.I.).

Tốt hơn là, tá dược dạng lỏng được dùng dùng cho vacxin của sáng chế là dung dịch trong nước hoặc nhũ tương. Tốt hơn nữa là, được ưu tiên rằng tá dược dạng lỏng được sử dụng là nhũ tương nước-dầu, dầu-nước hoặc nước-dầu-nước (WOW), tốt hơn là nhũ tương nước-dầu-nước. Đối với việc sử dụng vacxin, việc này có thể được thực hiện qua đường trong cơ, trong mũi, dưới da, bằng cách nhỏ giọt, phun hoặc trong nước uống, trong mỗi trường hợp bằng cách sử dụng các phương tiện và dạng thích

hợp đối với lợn và phụ thuộc nếu nó là vaccin sống hoặc vaccin được làm bất hoạt; tốt hơn là được dùng qua đường trong cơ hoặc trong mũi, tốt hơn nữa là qua đường trong cơ.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được hiểu tốt hơn dựa trên các ví dụ sau đây, các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa và cho phép việc hiểu tốt hơn các phương án được ưu tiên của sáng chế, mà không có nghĩa rằng các phương án đang tồn tại không được minh họa khác có thể được thực hiện dựa trên phần mô tả chi tiết trên đây.

Ví dụ 1

Sản xuất vector Newcastle LaSota

Để tạo dòng, hệ gen của virus Newcastle, chủng LaSota, và để tạo ra vector virus như vậy, đầu tiên vector trung gian được tạo ra, được gọi là “pSL1180NDV/LS”. Sau đó, tiến hành tách ARN toàn phần của virus của chủng Newcastle LaSota bằng phương pháp triazol. Từ ARN được tinh chế, việc tổng hợp ADN bổ trợ (ADN bổ trợ) của hệ gen virus được thực hiện, bằng cách sử dụng ARN toàn phần đã tinh chế trước làm khuôn mẫu. Với mục đích tạo dòng tất cả gen từ hệ gen Newcastle (15, 183 cặp bazơ (bp)), 7 đoạn với các đầu cuối “chồng lên nhau” và các vị trí giới hạn cổ kết được khuếch đại bằng PCR. Đoạn 1 (F1) bao gồm các nucleotit (nt) từ 1 đến 1755, F2 bắt đầu từ nt từ 1 đến 3321, F3 bao gồm nt từ 1755 đến 6580, F4 bắt đầu từ 6,151 đến 10,210, F5 bao gồm từ nt từ 7,381 đến 11,351, F6 bắt đầu từ 11,351 đến 14,995 và F7 bao gồm từ nt từ 14,701 đến 15,186. Tập hợp gồm 7 đoạn được tạo ra bên trong vector tạo dòng được gọi là pGEM-pSL1180 bằng cách sử dụng các kỹ thuật liên kết chuẩn, mà cho phép xây dựng lại hệ gen Newcastle LaSota, mà sau khi tạo dòng có vị trí giới hạn đơn SacII, nằm trong khoảng từ các gen P đến M và là hữu ích để tạo dòng gen quan tâm bất kỳ trong vùng vector virus này.

Ví dụ 2

Tạo dòng gen ORF 5 và ORF 6 từ vPRRS

Để tạo dòng các gen ORF 5 và ORF 6 từ vPRRS, dịch chiết ARN toàn phần của virus được thực hiện bằng phương pháp Triazol. Sau đó, ARN toàn phần được tinh chế

này được sử dụng để tổng hợp ADN bổ trợ (ADN bổ trợ) và bằng kỹ thuật PCR, các gen từ PRRS virus được khuếch đại bằng cách sử dụng các oligonucleotit đặc hiệu. Các gen ORF 5 và ORF 6 được xen sau đó vào vector pJET fermentas bằng cách sử dụng các kỹ thuật tạo dòng chuẩn, do đó thu được plasmit: pJETORF5/ORF6.

Ví dụ 3

Tạo dòng các gen ORF 5 và ORF 6 từ vPRRS trong vị trí SacII của vector pSL1180 NDV/LS để tạo ra plasmit pNDV-LS(wt)Orf5/6

A: Sản xuất vector trung gian plntNhe

Với mục đích đưa vào các trình tự phiên mã từ Newcastle được gọi là GE/GS ở đầu cuối 5' của các gen ORF 5 và ORF 6, vector trung gian mới được xây dựng, được gọi là plntNhe, bằng sự khuếch đại ban đầu PCR các trình tự GE/GS, lấy hệ gen Newcastle làm khuôn mẫu và sau đó xen trình tự này vào pGEM-T.

B: Tạo dòng phụ của các gen ORF 5 và ORF 6 vào vector plntNhe

plntNhe plasmit được phân cắt bằng SpeI-HpaI và sau đó được tạo dòng thành plntNhe, thu được plasmit plntNhe 56.

C: Tạo dòng phụ của GE/GS-ORF5/6 vào vector pSL1180NDV/LS

Plasmit pINTNhe 56 được phân cắt bằng các enzym NheI và PSL1180 NDV/LS plasmit được phân cắt bằng SacII; các sản phẩm phân cắt được cạo bỏ để để lại vị trí liên kết tương thích và vùng GE/GS-ORF5/6 được tinh chế và được xen vào vị trí SacII của pNDV/LS, do đó thu được dòng lây nhiễm được gọi là pNDV-LS(wt) Orf5/6.

Ví dụ 4

Sản xuất virus tái tổ hợp rNDV-LS(wt)Orf5/6 trong môi trường nuôi cấy tế bào

Các tế bào Hep-2 và A-549 đầu tiên được gây nhiễm với virus MAV-7 với số lần gây nhiễm (MOI) là 1. Sau khi ủ trong 1 giờ ở 37°C trong khí CO₂ 5%, tế bào được lây truyền với 1 microgam (μg) ADN từ dòng pNDV-LS(wt) Orf5/6, cùng với 0,2μg ADN từ các plasmit biểu hiện pNP, pP và pL, mà mã hóa các protein của virus P, NP và L, cần thiết đối với quá trình sản xuất tái tổ hợp trong cả hai loại tế bào. Bốn

mười giờ sau khi lây truyền, virus tái tổ hợp thu được ở cả hai loại tế bào được thu hoạch và được tiêm vào phôi gà SPF 10 ngày tuổi để khuếch đại virus được tạo ra. Chất lỏng dạng niêu nang được thu hoạch được chuẩn độ bằng thử nghiệm đĩa trong tế bào Vero, do đó tạo ra virus tái tổ hợp cuối cùng, được sử dụng để tạo ra vaccin.

Ví dụ 5

Phương pháp sản xuất vaccin với virus tái tổ hợp Newcastle LaSota có đoạn xen vào ORF 5 và ORF 6 từ vPRRS: pNDV-LS(wt)Orf5/6vac

Bắt đầu từ các giống sản xuất, trứng có phôi của gà, không chứa mầm bệnh đặc hiệu (SPF), được tiêm truyền với liều lây nhiễm được xác định trước. Ủ phôi ở 37°C trong 72 giờ, sự tử vong được kiểm tra hằng ngày. Sau thời gian này, phôi sống được làm lạnh từ một ngày đến ngày tiếp theo, tốt hơn là 24 giờ, chất lỏng dạng niêu nang chứa amino (FAA, theo chữ viết tắt tiếng Tây Ban Nha của nó) được thu hoạch trong các điều kiện vô trùng và được gạn bằng cách ly tâm. FAA được thử nghiệm để xác định độ tinh khiết, tính bất thụ và độ chuẩn DIEP của nó.

Các vaccin hoạt động và bất hoạt được tạo ra trong nhũ tương loại nước-dầu-nước. Để tạo ra pha dầu, muối khoáng và chất hoạt động bề mặt thuộc loại Span 80 và Tween 80 được sử dụng. Để tạo ra pha nước, FAA được trộn với dung dịch bảo quản (thimerosal). Để tạo ra nhũ tương, pha nước được bổ sung một cách từ từ vào pha dầu kèm khuấy cố định. Thiết bị đồng nhất hoặc máy xay dạng keo được sử dụng để đạt đến kích cỡ hạt được xác định.

Các vaccin trên đây được bào chế để thu được tối thiểu $10^{8,0}$ DIEP50%/0,5mL, để sử dụng liều 2,0mL/lợn.

Theo quy trình được mô tả trên đây, vaccin thử nghiệm tái tổ hợp được tạo ra trong vector (pSL1180 NDV/LS) với các gen ORF 5 và ORF 6, được gọi là pNDV-LS(wt)/Orf5/6 vac, mà được thử nghiệm ở dạng sống mà không cần chất bổ trợ (Ví dụ 5A), ở dạng sống với chất bổ trợ nước-dầu-nước (Ví dụ 5B), và ở dạng bất hoạt với chất bổ trợ nước-dầu-nước (Ví dụ 5C), được áp dụng theo hai liều trong tất cả các trường hợp.

Ví dụ 6

Đánh giá hiệu lực của vacxin tái tổ hợp pNDV-LS(wt)/Orf5/6 vac *in vivo*

Để xác định hiệu quả của vacxin của sáng chế và để xác định rằng vacxin này có thể có hiệu quả hơn so với vacxin có bán trên thị trường (được áp dụng theo 1 liều), hiệu quả của nó được thử nghiệm.

Virus hoạt động chứa mầm bệnh của PRRS được sử dụng, với liều $10^{6,0}$ DIC₅₀%mL/45 phút, để thử thách trong các thử nghiệm khác nhau để xác định hiệu quả của vacxin.

Cuối cùng, 104 con lợn SPF, từ 3 đến 5 tuần tuổi, được sử dụng, mà được đánh dấu ở tai hai lần với số lượng riêng rẽ, được xác định trọng lượng và được chia một cách ngẫu nhiên thành 9 nhóm điều trị, theo Bảng 1.

Bảng 1. Các nhóm điều trị

	E5A (vacxin sống), 2 liều		E5B vacxin sống với chất bổ trợ, 2 liều		E5C vacxin được làm bất hoạt với chất bổ trợ, 2 liều		Đối chứng âm tính	Không được tiêm chủng tạo thử thách (đối chứng dương tính)	Tổng số
	Ký hiệu báo	Thử nghiệm	Ký hiệu báo	Thử nghiệm	Ký hiệu báo	Thử nghiệm			
Đối chứng âm tính	NA	NA	NA	NA	NA	NA	10	NA	10
pNDV- LS(wt)Orf5/6 vac	3	10	3	10	0	10	0	3	39
Ingelvac® PRRS MLV (1 liều đơn lẻ)	3	10	NA	NA	NA	NA	0	3	16
Tổng số	6	20	3	10	0	10	10	6	65

Các con lợn được thả vào các phòng tách biệt với áp suất âm và được cho thích nghi trong 3 ngày trước khi điều trị. Đối với tất cả các nhóm, các con lợn này được cho ăn với thức ăn có bán trên thị trường và nước uống dùng trong gia đình được cung cấp tự do; cả thức ăn và nước uống không chứa chất phụ gia và/hoặc chất kháng sinh. Tương tự, các hệ thống lọc không khí và bịt kín không khí được đặt vào trong mỗi phòng. Các con lợn được gây miễn dịch vào ngày 0 và ngày 14 bằng vacxin của sáng chế, thu được theo các Ví dụ từ 5A đến 5C (pNDV-LS(wt)/Orf5/6 vac), và bằng cách sử dụng 2,0mL/liều dùng cho lợn. Nhằm mục đích so sánh, nhóm khác được gây miễn

dịch bằng 2,0mL liều đơn lẻ (đề xuất của nhà sản xuất)/lợn với vacxin có bán trên thị trường thường được sử dụng để kháng PRRS (Ingelvac® PRRS MLV).

Ngày tiêm chủng được xác định là “ngày 0 sau tiêm chủng” (DPV 0). Tương tự, các mẫu máu được lấy từ các động vật trong tất cả các nhóm bằng cách chích thủng tĩnh mạch chủ, vào các ngày sau đây: DPV 0, DPV 7, DPV 14, DPV 21, DPV 28, DPV 35, DPV 42, và DPV 49 (bị giết chết).

Thử thách được tạo ra đối với DPV 35 (DPDF 0) ở tất cả các con lợn của tất cả các nhóm, ngoại trừ nhóm đối chứng âm tính; virus tạo ra thử thách miễn dịch được dùng bằng cách phun trong buồng được thiết kế một cách đặc hiệu đối với lợn. Vào ngày DPV 49 hoặc DPDF 14, tất cả lợn trong tất cả các nhóm bị giết chết và được cho vào thử nghiệm sau chết. Để chứng minh hiệu quả của vacxin, khả năng phát triển và tỷ lệ phần trăm thương tổn phổi ở lợn được gây miễn dịch được đánh giá.

Tỷ lệ phần trăm thương tổn phổi

Lợn từ các nhóm khác nhau bị giết vào ngày DPDF 14, bằng cách sốc điện và chích máu, tiếp theo mổ. Phổi được thổi, vẫn được gắn vào khí quản, được loại bỏ. Việc đánh giá bao gồm các thùy đỉnh bên phải và bên trái, các thùy tim bên phải và bên trái, cạnh sọ bên trái và thùy cơ hoành bên phải và thùy giữa. Phụ thuộc vào sự có mặt hoặc không có mặt của các tổn thương, các mẫu mô được gom lại từ các cơ quan bị tác động. Các tổn thương vĩ mô gợi ý sự lây nhiễm bởi vPRRS (được xác định là các vùng bị viêm phổi khe có thể có), được xác định bằng phương pháp đo diện tích (Ciprián et al., 1988, Lara et al, 2008); các kết quả được thể hiện trong Bảng 2.

Bảng 2. Tỷ lệ giảm tổn thương phổi ở lợn được tiêm chủng kháng PRRS

Điều trị	Tỷ lệ thương tổn phổi %	Tỷ lệ giảm thương tổn phổi %
Đối chứng âm tính	0,07	NA
E5A (pNDV-LS(wt)/Orf5/6 vac sống), 2 liều	3,92	67,30
E5B (pNDV-LS(wt)/Orf5/6 vac sống + chất bổ trợ), 2 liều	7,27	39,36
E5C (pNDV-LS(wt)/Orf5/6 vac được làm bất hoạt + chất bổ trợ), 2 liều	5,20	56,63
Ingelvac PRRS MLV	15,54	-129,60
Đối chứng dương tính	11,99	0

Như có thể được nhìn thấy, với việc dùng vaccin pNDV-LS(wt)Orf5/6 vac ở các dạng biến thể khác nhau của nó (sống, sống với chất bổ trợ và được làm bất hoạt với chất bổ trợ), nó có thể làm giảm tỷ lệ phần trăm thương tổn phổi đến 67%, khi được so với đối chứng dương tính, trong khi tỷ lệ phần trăm thương tổn phổi bị tăng khoảng 30% so với đối chứng dương tính bằng cách sử dụng vaccin có bán trên thị trường. Điều này phù hợp thương tổn được báo cáo trước đây (Thanawongnuwech and Suradhat, 2010).

Huyết thanh học

Các mẫu máu thu được từ các động vật ở tất cả các nhóm được sử dụng để tiến hành các thử nghiệm huyết thanh, bằng cách lựa chọn các mẫu tương ứng với việc lấy mẫu cơ bản, vào ngày trước thử thách và vào ngày bị giết. Các thử nghiệm chuyển hóa huyết thanh được thực hiện bằng cách sử dụng ELISA Herd Check PRRS 2XR của IDEXX theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các kết quả phát hiện được thể hiện dưới đây:

Bảng 3. Tỷ lệ phần trăm chuyển hóa huyết thanh

Điều trị	Cơ bản	Trước thử thách	Khi bị giết chết
Đối chứng âm tính	0%	0%	0%
E5A (pNDV-LS(wt)/Orf5/6 vac sống), 2 liều	0%		0%
E5B (pNDV-LS(wt)/Orf5/6 vac sống + chất bổ trợ), 2 liều	0%	0%	0%
E5C (pNDV-LS(wt)/Orf5/6 vac được làm bất hoạt + chất bổ trợ), 2 liều	0%	0%	0%
Ingelvac PRRS MLV	0%	80%	100%
Đối chứng dương tính	0%	0%	0%

Các kết quả trên đây thể hiện rằng, theo các kết quả được mong đợi, trong việc lấy mẫu cơ bản, tất cả các con lợn SPF là âm tính. Vào lúc thử thách, chỉ nhóm được chuyển hóa huyết thanh là nhóm được gây miễn dịch bằng vaccin Ingelvac PRRS MLV, trong khi không có sự chuyển hóa huyết thanh nào được phát hiện ở bất kỳ trong số các nhóm được gây miễn dịch bằng vaccin của sáng chế. Kết quả này có được là bởi vì kit ELISA có bán sẵn trên thị trường chỉ phát hiện đáp ứng kháng thể kháng nucleocapsit protein được mã hóa bởi ORF 7, mà không có mặt trong bất kỳ vaccin nào trong số vaccin của các Ví dụ từ 5A đến 5C.

Đối với thời gian giết, có thể nhìn thấy rằng nhóm được tiêm chủng bằng vaccin có bán trên thị trường giữ lại huyết thanh dương tính và phần còn lại của các nhóm huyết thanh âm tính, điều này có thể là do thời gian ngắn trôi qua giữa thử thách và bị giết và thời gian chuyển hóa huyết thanh của virus tạo ra thử thách miễn dịch được sử dụng là không đủ. Tuy nhiên, sự có mặt của virus ở tất cả các nhóm được thử thách được xác nhận bởi các thử nghiệm PCR.

Tương tự, với mục đích phát hiện sự chuyển hóa huyết thanh đối với pNDV-LS(wt)Orf5/6 vac theo các phương án khác nhau của nó và bằng cách sử dụng các mẫu huyết thanh được kể đến trên đây, thử nghiệm HI được chạy bằng cách sử dụng phương pháp được mô tả trước đây. Các kết quả thu được được thể hiện trong Bảng 4.

Bảng 4. Tỷ lệ phần trăm của sự chuyển hóa huyết thanh bởi thử nghiệm HI đối với pNDV-LS(wt)Orf5/6 vac

Điều trị	Cơ bản	Trước thử thách	Khi bị giết chết
Đối chứng âm tính	0	0	0
E5A (pNDV-LS(wt)/Orf5/6 vac sống), 2 liều		100 (1:146)	100 (1:272)
E5B (pNDV-LS(wt)/Orf5/6 vac sống + chất bổ trợ), 2 liều	0	100 (1:162)	100 (1:182)
E5C (pNDV-LS(wt)/Orf5/6 vac được làm bất hoạt + chất bổ trợ), 2 liều	0	100 (1:514)	100 (1:58)
Ingelvac PRRS MLV	0	0	0
Đối chứng dương tính	0	0	0

Như có thể thấy, vào lúc bắt đầu thử nghiệm, lợn SPF là âm tính hoàn toàn đối với vacxin pNDV-LS(wt)Orf5/6 vac trong các phương án khác nhau của nó (E5A-E5C). Tuy nhiên, vào lúc trước thử thách, sự chuyển hóa huyết thanh hoàn toàn được tìm thấy ở các nhóm được tiêm chủng bằng vacxin của sáng chế, là 100% động vật được tiêm chủng huyết thanh dương tính với các độ chuẩn kháng thể khác nhau theo điều trị được sử dụng, trong khi đối chứng âm tính, đối chứng dương tính và được gây miễn dịch bằng các nhóm vacxin có bán trên thị trường còn lại huyết thanh âm tính. Ở lúc bị giết, xu hướng tương tự được nhìn thấy, cụ thể là, các nhóm được tiêm chủng bằng pNDV-LS(wt)Orf5/6 vac duy trì 100% sự chuyển hóa huyết thanh ở 100% động vật và phần còn lại của nhóm còn lại âm tính.

Phần mô tả trên đây thể hiện hiệu quả của sự lựa chọn vectơ virus có khả năng tạo ra đáp ứng miễn dịch của tế bào do sự sản xuất interferon alpha và/hoặc gama gia tăng và có khả năng sao chép nhanh chóng, do dung dịch tạo ra vacxin có hiệu quả.

Khả năng phát triển

Với mục đích chứng minh sự phát triển đạt được, lợn được xác định trọng lượng một cách riêng rẽ vào lúc bắt đầu, trong thời gian và khi kết thúc nghiên cứu trên xác. Như có thể được nhìn thấy trong Fig.1, có sự gia tăng không đáng kể về trọng lượng đạt được (w) của lợn khi sử dụng vacxin của Ví dụ 5C (pNDV-LS(wt)Orf5/6 vac được làm bất hoạt bằng chất bổ trợ), được so với vacxin có bán trên thị trường.

Mặt khác, đối với lợn được gây miễn dịch bằng vacxin sống (Fig.2), được nhìn thấy rằng trọng lượng đạt được của động vật được tiêm chủng bằng pNDV-LS(wt)Orf5/6 vac, có và không có chất bổ trợ, là cao hơn một cách đáng kể so với vacxin có bán trên thị trường.

Các thử nghiệm này xác nhận sự thành công của sáng chế, do nó đã chứng minh được rằng vacxin của sáng chế thể hiện sự tốt hơn rõ ràng ở thời gian chuyển hóa so với vacxin có bán trên thị trường, nhờ đó đạt được mức bảo vệ tốt hơn, quan sát được tỷ lệ các thương tổn phổi ở lợn giảm đáng kể. Về vấn đề này, sự cải thiện về các tham biến năng xuất đạt được được so với các động vật không được tiêm chủng. Tương tự, đáp ứng huyết thanh có thể đo khác với đáp ứng được tạo ra bởi virus gây bệnh ở cánh đồng hoặc vacxin hoạt động có bán trên thị trường đang tồn tại được cảm ứng, mà có nghĩa rằng vacxin tái tổ hợp của sáng chế đáp ứng tham biến là DIVA (Sự phân hóa được lây nhiễm từ các động vật được tiêm chủng).

Mặc dù các phương án cụ thể của sáng chế đã được minh họa và được mô tả, nhưng cần nhấn mạnh rằng có thể có nhiều cải biến xảy ra, như có thể là virus được sử dụng làm vectơ virus và loại nhũ tương hoặc tá dược dạng lỏng được sử dụng. Do đó, sáng chế sẽ không được cho là bị giới hạn ngoại trừ bởi tình trạng kỹ thuật và bởi các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Vector virus có khả năng tạo ra đáp ứng miễn dịch của tế bào ở lợn, trong đó vector virus này là paramyxovirus bao gồm trình tự nucleotit ngoại sinh chứa ORF 5 và ORF 6 của virus PRSS.
2. Vector virus theo điểm 1, trong đó paramyxovirus được chọn từ paramyxovirus bất kỳ bao gồm kiểu huyết thanh, kiểu gen hoặc kiểu di truyền bất kỳ, bao gồm các virus thể độc lực thấp, trung bình và cao; paramyxovirus mà các kỹ thuật di truyền ngược có thể được thực hiện để loại bỏ phenylalanin ra khỏi vị trí 117, và axit amin bazơ ra khỏi vị trí gần với vị trí Q114 mà tạo ra khả năng gây bệnh đối với paramyxovirus; hoặc paramyxovirus bao gồm chi *Avulavirus* ở chim bị nhiễm.
3. Vector virus theo điểm 2, trong đó paramyxovirus được chọn từ virus gây bệnh Newcastle và virus Sendai.
4. Vector virus theo điểm 3, trong đó paramyxovirus là virus gây bệnh Newcastle.
5. Vector virus theo điểm 4, trong đó virus gây bệnh Newcastle được chọn từ các chủng LaSota, B1, QV4, Ulster, Roakin và Komarov.
6. Vector virus theo điểm 1, trong đó ORF 5 có trình tự SEQ ID NO:1 và ORF 6 có trình tự SEQ ID NO:2.
7. Vaccine kháng PRRS tái tổ hợp, trong đó vaccine này bao gồm vector virus chứa paramyxovirus bao gồm trình tự nucleotit ngoại sinh chứa ORF 5 và ORF 6 của virus PRSS và tá dược dạng lỏng, chất bổ trợ và/hoặc tá dược được dùng, trong đó vector virus paramyxovirus này có khả năng tạo ra đáp ứng miễn dịch của tế bào ở lợn.
8. Vaccine theo điểm 7, trong đó paramyxovirus là sống hoặc được làm bất hoạt.
9. Vaccine theo điểm 8, trong đó paramyxovirus được chọn từ paramyxovirus bất kỳ bao gồm kiểu huyết thanh, kiểu gen hoặc kiểu di truyền bất kỳ, bao gồm các virus thể độc lực thấp, trung bình và cao; paramyxovirus mà các kỹ thuật di truyền ngược có thể được thực hiện để loại bỏ phenylalanin ra khỏi vị trí 117, và axit amin bazơ ra khỏi vị

trí gần với vị trí Q114 mà tạo ra khả năng gây bệnh đối với paramyxovirut; hoặc paramyxovirut bao gồm chi *Avulavirus* ở chim bị nhiễm.

10. Vacxin theo điểm 9, trong đó paramyxovirut được chọn từ virut gây bệnh Newcastle và virut Sendai.

11. Vacxin theo điểm 10, trong đó paramyxovirut là virut gây bệnh Newcastle.

12. Vacxin theo điểm 11, trong đó virut gây bệnh Newcastle được chọn từ các chủng LaSota, B1, QV4, Ulster, Roakin và Komarov.

13. Vacxin theo điểm 7, trong đó ORF 5 có trình tự SEQ ID NO:1 và ORF 6 có trình tự SEQ ID NO:2.

14. Vacxin theo điểm 7, trong đó tốt hơn là, tá dược dạng lỏng được dụng là dung dịch trong nước hoặc nhũ tương.

15. Vacxin theo điểm 14, trong đó tá dược dạng lỏng được dụng được chọn từ nhũ tương nước-dầu, dầu-nước hoặc nước-dầu-nước.

16. Vacxin theo điểm 15, trong đó tá dược dạng lỏng được dụng là nhũ tương nước-dầu-nước.

17. Vacxin theo điểm 7, trong đó nồng độ virut cần thiết để đạt được đáp ứng kháng nguyên nằm trong khoảng từ $10^{6,0}$ đến $10^{10,0}$ DIEP50%/mL.

18. Vacxin theo điểm 17, trong đó nồng độ virut cần thiết để đạt được đáp ứng kháng nguyên nằm trong khoảng từ $10^{8,0}$ đến $10^{9,5}$ DIEP50%/mL.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> NGƯỜI NỘP ĐƠN: LABORATORIO AVI-MEX, S.A. DE C.V.

<120> TÊN SÁNG CHẾ: VECTO VIRUT CÓ KHẢ NĂNG TẠO RA ĐÁP ỨNG MIỄN DỊCH CỦA TẾ BÀO Ở LỢN VÀ VACCIN KHÁNG PRRS TÁI TỔ HỢP

<160> SỐ TRÌNH TỰ SEQ ID NOS: 2

<170> PHẦN MỀM: PATENT-IN 3.5

<210> THÔNG TIN ĐỐI VỚI SEQ ID NO: 1

<211> CHIỀU DÀI: 600

<212> KIỂU: ADN

<213> SINH VẬT: Virut gây ra hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn

<400> SEQ ID NO: 1

atgttgagaga aatgcttgac cgcgggctgt tgctogcgat tgctttcttt gtggtgtatc	60
gtgcggttct gttttgctgt gctcgccaac gccagcaacg acagcagctc ccatctacag	120
ctgatttaca acttgacgct atgtgagctg aatggcacag attggctagc taacaaattt	180
gattgggcag tggagagttt tgtcatcttt ccggttttga ctcacattgt ctcctatggt	240
gccctcacta ccagccattt ccttgacaca gtcgcttttag tctgtgtgtc taccgcccgg	300
tttgttcacg ggcggtatgt cctaagtagc atctacgcgg tctgtgccct ggctgcgttg	360
acttgcttcg tcattaggtt tgcaaagaat tgcattgtcct ggcgctacgc gtgtaccaga	420
tataccaact ttcttctgga cactaagggc agactctatc gttggcgggc gcctgtcatc	480
atagagaaaa ggggcaaatg tgaggtcgaa ggtcatctga tcgacctcaa aagagttgtg	540
cttgatgggt ccgtggcaac ccctataacc agagtttcag cggaacaatg gggtcgtcct	600

<210> THÔNG TIN ĐỐI VỚI SEQ ID NO: 2

<211> CHIỀU DÀI: 420

<212> KIỂU: ADN

<213> SINH VẬT: Virut gây ra hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn

<400> SEQ ID NO: 2

accatggggt cgtccttaga tgactttctgt catgatagca cggctccaca aaaggtgctt	60
ttggcgtttt ctattaccta caogccagtg atgatatatg ccctaaaggt gagtcgcggc	120
cgactgctag ggctttctgca ctttttgatc ttctgaatt gtgctttcac cttcgggtac	180
atgactttcg cgcactttca gagtaciaat aaggtcgcgc tcactatggg agcagtagtt	240
gcactccttt ggggggtgta ctcagccata gaaacctgga aattcatcac ctccagatgc	300
cgtttgtgct tgctaggccg caagtacatt ctggcccctg ccaccacgt tgaaagtgcc	360
gcacggtttc atccgattgc ggcaaatgat aaccacgcat ttgtcgtccg gcgtcccggc	420
tcactacgg tcaacggcac attggtgcc gggttaaaaa gcctcgtgtt ggggtggcaga	480
aaagctgtta aacaggaggt ggtaaacctt gtcaaatatg ccaaataa	528

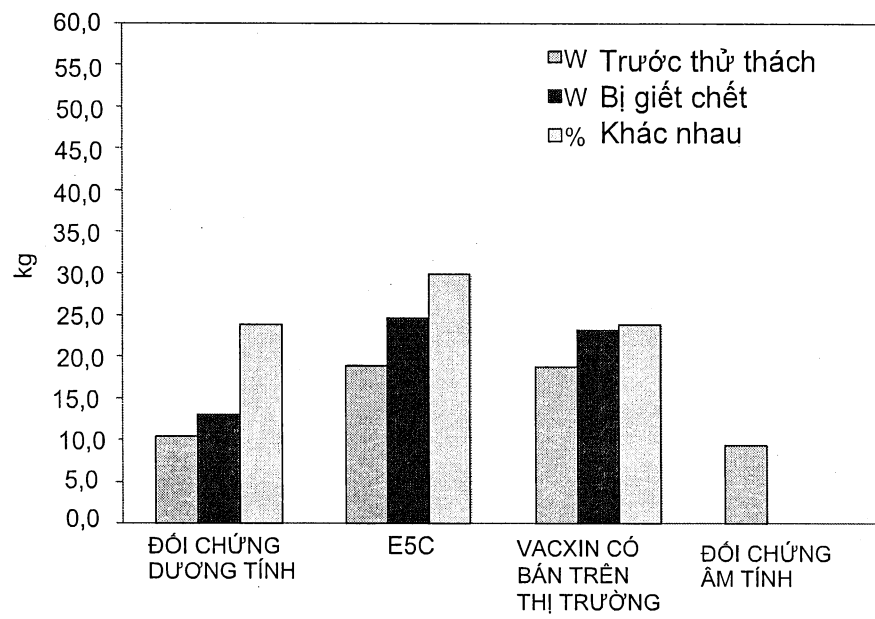


FIG. 1

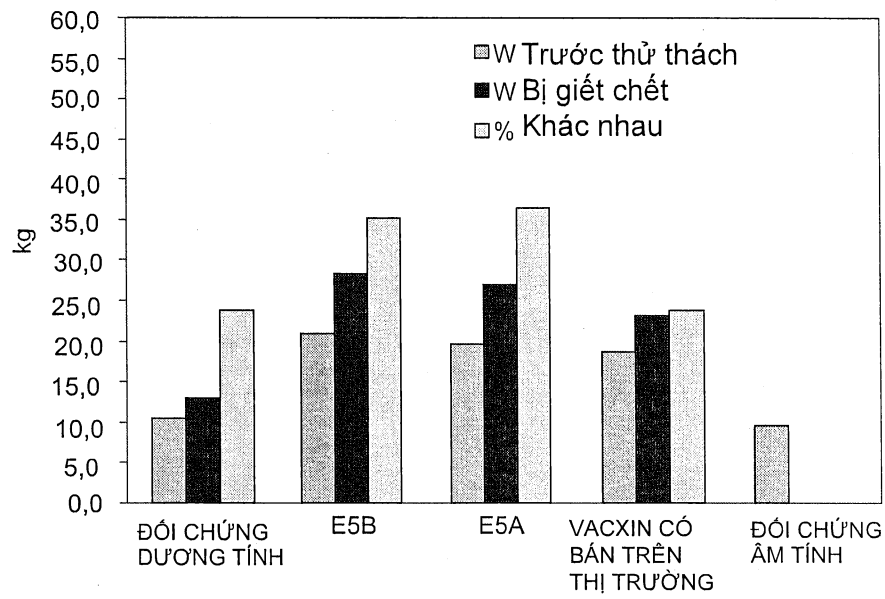


FIG. 2