



(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) 
1-0022636

(51)⁷ **A61K 39/145, C07K 14/11, C12N**
15/869

(13) **B**

(21)	1-2013-01255	(22)	17.10.2011
(86)	PCT/EP2011/068073 17.10.2011	(87)	WO2012/052384 26.04.2012
(30)	10187948.4 18.10.2010 EP		
	61/407,724 28.10.2010 US		
(45)	27.01.2020 382	(43)	25.11.2013 308
(73)	INTERVET INTERNATIONAL B.V. (NL) Wim de Koerverstraat 35, NL-5831 AN Boxmeer, Netherlands		
(72)	SONDERMEIJER, Paulus Jacobus Antonius (NL), VERSTEGEN, Iwan (NL)		
(74)	Công ty TNHH Tâm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)		

(54) **VECTƠ VIRUT ECPET Ở GÀ TÂY, VACXIN CHỨA VECTƠ NÀY VÀ PHƯƠNG PHÁP BÀO CHẾ VACXIN NÀY**

(57) Sáng chế đề cập đến lĩnh vực vacxin thú y, cụ thể là vacxin cho gia cầm kháng cúm gia cầm. Vacxin này dựa trên virus vectơ tái tổ hợp biểu hiện protein haemagglutinin của virus cúm, trong đó vectơ là virus ecpet ở gà tây (HVT) và gen haemagglutinin được điều khiển bằng trình tự khởi động gen glycoprotein B từ virus ecpet của động vật có vú. Vacxin bao gồm vectơ HVT+HA có thể được sử dụng để gây ra đáp ứng miễn dịch bảo vệ kháng cúm gia cầm ở gia cầm, và để giảm sự lây lan AIV. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp, ứng dụng và vacxin chứa vectơ HVT+HA.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực vaccin thú y, cụ thể vaccin kháng cúm gia cầm ở gia cầm. Vaccin này được dựa trên vector virus tái tổ hợp biểu hiện protein haemagglutinin của virus cúm, trong đó vector là virus ecpet ở gà tây (herpes virus of turkey - HVT) và gen haemagglutinin được điều khiển bởi trình tự khởi động gen glycoprotein B từ virus ecpet của động vật có vú. Vaccin chứa vector HVT+HA này có thể được sử dụng để gây ra đáp ứng miễn dịch bảo vệ kháng cúm gia cầm ở gia cầm, và để làm giảm sự lây lan AIV. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp, việc sử dụng, và vaccin chứa vector HVT+HA.

Tình trạng kỹ thuật được đề cập

Virus ecpet ở gà tây (HVT) được mô tả vào khoảng năm 1970 là virus ecpet gây nhiễm bệnh cho gà tây, và có các đặc tính kháng nguyên giống với virus gây bệnh Marek (Marek's disease virus - MDV). Trong khi MDV có khả năng gây bệnh cao cho gà con, HVT không gây bệnh cho gà con và có thể được sử dụng để chủng ngừa có hiệu quả kháng lại sự lây nhiễm và bệnh gây ra bởi MDV (Okazaki et al., 1970, Avian Diseases, vol. 14, p. 413-429). Sau đó, việc tiêm chủng cho gà con kháng MDV bằng cách sử dụng HVT đã trở thành một phần của chương trình tiêm chủng chuẩn cho hàng tỷ con gà con được nuôi trên toàn thế giới mỗi năm. Liên quan đến vấn đề này, rất hữu ích khi phát hiện ra rằng HVT, không giống MDV, có thể được tinh chế từ các tế bào chủ mà trong đó nó được sản sinh, ví dụ bằng cách dùng siêu âm phá tế bào (sonication), và có thể được bán ra thị trường dưới dạng vaccin ổn định đông khô.

HVT sao chép trong lympho bào của chim, cụ thể trong lympho bào máu ngoại vi (PBL), do đó nó là virus huyết toàn thân. Nó gây ra đáp ứng miễn dịch trong thời gian dài, chủ yếu nhằm vào hệ miễn dịch tế bào, không phải hệ miễn dịch thể dịch.

Vaccin HVT có thể được sử dụng cho gà con ở giai đoạn sớm, là kết quả kết hợp của bản chất không gây bệnh của HVT, cũng như sự không nhạy cảm tương đối của nó với kháng thể nhận được từ mẹ kháng MDV hoặc HVT. Do đó, vaccin HVT có thể được tiêm chủng cho gà con vào ngày mới nở khỏi trứng của nó (ngày một), hoặc

ngay cả trước khi nở, trong khi vẫn còn trong trứng. Phương pháp sau này, tiêm chủng trong trứng, thường được áp dụng vào ngày 18 của quá trình phát triển phôi (ED), là khoảng 3 ngày trước khi nở.

Hiện nay HVT được phân typ vào phân họ của alphaherpesvirinae, và cũng được biết là:

Virut ecpet Meleagrid 1, virut ecpet gà tây, hoặc virut bệnh Marek typ huyết thanh 3.

Virion HVT có tất cả các đặc tính của virut ecpet điển hình, và có kích thước khoảng 160nm ở dạng được bao của nó. Trong capsit nó bao gồm bộ gen lớn là ADN thẳng chuỗi kép. Trình tự hoàn chỉnh của bộ gen virut dài khoảng 159kb đã được biết từ năm 2001 (số truy cập Ngân hàng gen AF291866).

Tuy nhiên, trước đây rất lâu, bộ gen HVT đã được nghiên cứu và được xử lý; cụ thể là đặc tính không gây bệnh của nó đã hướng tới nghiên cứu việc sử dụng HVT làm virut vector để biểu hiện và phân phối các protein khác nhau vào vật chủ là gà con mà đã được tiêm chủng bằng thể tái tổ hợp HVT. Các ví dụ là sự biểu hiện của gen mã hóa kháng nguyên từ mầm bệnh gia cầm khác như: virut gây bệnh Gumboro ở gà (infectious bursal disease virus - IBDV) (Darteil et al., 1995, Virology, vol. 21 1, p. 481-490), và virut gây bệnh Newcastle (Newcastle disease virus - NDV) (Sondermeijer et al., 1993, Vaccin, vol. 11, p. 349-358). Nhưng ngoài ra sự biểu hiện này đã được mô tả cho kháng nguyên ký sinh trùng (Cronenberg et al., 1999, Acta Virol., vol. 43, p. 192-197), hoặc xytokin, để điều khiển đáp ứng miễn dịch ở gà con (WO 2009/156,367; Tarpey et al., 2007, Vaccine, vol. 25, p. 8529-8535).

Nhiều vị trí để gắn chèn gen khác loại vào trong bộ gen HVT ở locut không thiết yếu thích hợp đã được nghiên cứu, ví dụ trong vùng ngắn duy nhất của bộ gen HVT (EP 431,668); hoặc trong vùng dài duy nhất (EP 794,257).

Một số phương pháp đã được mô tả để gắn chèn axit nucleic khác loại vào HVT: bằng cách sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng (Sondermeijer et al., supra), tái tạo cosmid (US 5,961,982), hoặc Bacmid (nhiễm sắc thể nhân tạo của vi khuẩn) (Baigent et al., 2006, J. of Gen. Virol., vol. 87, p. 769-776).

Để sản xuất ở quy mô lớn HVT thường được sản sinh *in vitro*, trong môi trường

nuôi cấy của tế bào nguyên bào sợi phôi gà con (CEF). Đây là các tế bào sơ cấp được tạo ra bằng cách trypsin hóa phôi gà. CEF được dát mỏng thành các lớp đơn và được gây nhiễm bằng HVT. Sau đó virus này sao chép trong tế bào nguyên bào sợi, mặc dù trên *in vivo* HVT sao chép trong lymphô bào.

Hiện nay, nhiều sản phẩm vacxin có bán trên thị trường hữu dụng mà chứa vectơ HVT biểu hiện kháng nguyên khác loại. Ví dụ: kháng nguyên NDV F: Innovax®-ND-SB (MSD Animal Health), và Vectormune® HVT-NDV (Ceva); kháng nguyên IBDV VP2: Vaxxitek® HVT+IBD (Merial), và Vectormune® HVT-IBD (Ceva); hoặc kháng nguyên từ virus gây bệnh viêm thanh khí quản lây nhiễm: Innovax®-ILT (MSD Animal Health).

Việc sử dụng vacxin vectơ HVT này cho gia cầm sẽ tạo ra đáp ứng miễn dịch kháng gen khác loại được biểu hiện, đồng thời kháng HVT/MDV. Do độc lực của các chủng MDV tăng lên qua thời gian, việc tiêm chủng điển hình kháng MDV hiện nay đưa vào thành phần vacxin MDV khác ngoài virus hoặc vectơ HVT, như chủng vacxin MDV typ huyết thanh 1 hoặc 2, ví dụ chủng MDV Rispens hoặc MDV SB1 tương ứng.

Virus cúm (IV) là orthomyxovirus mà lây nhiễm cho nhiều loại vật chủ. Từ chính hạt virus cúm không thể hoàn toàn xác định loại vật chủ bị lây nhiễm, hoặc sẽ lây nhiễm trong tương lai. Do đó, trên thực tế, virus cúm mà có thể gây nhiễm và sao chép trong một loài thường được gọi là thuộc về loài đó, mặc dù việc gây nhiễm chéo cho các loài khác thường xuyên xảy ra, ví dụ: từ chim nước sang gà; từ gà sang lợn, mèo, hoặc người; từ người sang ngựa, v.v.. Do đó, virus cúm gia cầm (AIV) đề cập đến virus mà có thể gây nhiễm cho gia cầm. AIV có thể gây ra các bệnh: Cúm gia cầm (AI), mà còn được biết là “bệnh toi gà”, hoặc “cúm gà”, và là bệnh phải khai báo ở nhiều quốc gia. Tùy theo kiểu bệnh của AIV gây nhiễm và tình trạng miễn dịch của chim bị nhiễm bệnh, mà bệnh có thể khác nhau từ bệnh không biểu hiện triệu chứng, đến bệnh đường hô hấp nhẹ, đến hậu quả gây chết cao.

Cúm gia cầm ở gia cầm thương mại thường được đề kháng bằng cách tiêm chủng ở nhiều vùng trên thế giới nơi có dịch AIV, ví dụ ở châu Á và Trung Đông. Ở các khu vực khác, như châu Âu và Bắc Mỹ, tiêm chủng được quy định bởi Chính phủ

và chỉ được cho phép trong các trường hợp bùng phát và kết hợp với các biện pháp cách ly và tiêu diệt bệnh.

Được quan tâm đặc biệt là virus AIV loại gây bệnh cao (HP) là do chúng có nguy cơ lây nhiễm cao từ chim sang các loài khác, kể cả người. HP AIV có protein HA chứa nhiều axit amin bazơ ở vị trí phân cắt của các phần HA1 và HA2 của protein HA. Sự có mặt của các axit amin bazơ này khiến cho việc hoạt hóa protein HA bằng cách phân cắt có thể được thực hiện bằng proteaza mà cũng xảy ra trong các cơ quan khác với đường hô hấp, nơi AIV có khả năng gây bệnh thấp sao chép. Điều này dẫn đến sự nhiễm virus huyết toàn thân và độ nghiêm trọng của bệnh nhiễm HP AIV.

Virion cúm typ A, như AIV, bao gồm bộ gen chứa ARN mạch đơn có tính phân cực âm, được chia thành 8 đoạn, mã hóa 10 protein. Protein virus hầu hết phù hợp với mục đích miễn dịch là haemagglutinin (HA) và neuraminidaza (N). HA là kháng nguyên chính, có thể gây ra đáp ứng miễn dịch dịch thể bảo vệ. AIV được phân typ theo biến thể typ huyết thanh của protein HA và N của chúng: H1-H16 và N1-N9 đã được mô tả cho đến nay. HP AIV luôn thuộc phân typ H5 hoặc H7.

Mặc dù hạt virus cúm không bị giới hạn ở việc gây nhiễm loài cụ thể, nhưng dường như có sự phổ biến của các typ huyết thanh IV ở một số loài: các typ huyết thanh IV H1 và H3 ở lợn; H3 và H7 ở ngựa; H3 ở chó; H5 ở mèo; H 7 và H9 ở gà tây; và H5, H7, và H9 ở gà con.

Do đáp ứng miễn dịch kháng bệnh cúm là đặc hiệu typ huyết thanh, vaccin kháng bệnh cúm thường phù hợp với phân typ miễn dịch của chủng IV lưu hành trong lĩnh vực. Vaccin AI có bán trên thị trường chứa AIV bất hoạt nguyên vẹn trong nhũ tương có tá chất dầu, hoặc chủng vaccin AIV sống nhược độc.

Tuy nhiên, các thay đổi của virus IV theo thời gian, được biết là “biến động di truyền” diễn ra. Trên thực tế, chủng IV mà khác với các chủng hiện có bởi độ tương đồng trình tự axit amin của protein HA nhiều hơn 90% sẽ được chỉ định là nhóm kháng nguyên mới, và sẽ có số “nhóm” mới. Hiện tượng này có thể làm cho quần thể đích phải đối mặt với chủng IV mà đã thay đổi profil miễn dịch ít hay nhiều hơn từ lần gây nhiễm hoặc tiêm chủng cuối cùng. Điều này có thể làm cho các vaccin hiện có, ngay cả khi chứa phân typ chính xác, trở nên kém hiệu quả qua thời gian, vì thế cần phải cập nhật virus vaccin. Trong số các lý do khác, vaccin cúm dựa trên kỹ thuật

ADN tái tổ hợp đã được phát triển để tạo điều kiện thuận lợi cho việc cập nhật này. Ví dụ, vaccin chứa tiểu đơn vị IV-HA mà được biểu hiện qua hệ vector biểu hiện baculovirut. Bằng kỹ thuật sinh học phân tử thông thường, gen H5 HA được biểu hiện có thể được trao đổi với một gen gần đây hơn, khi cần.

Tương tự, vaccin vector của AI đã được phát triển để biểu hiện protein HA trong vi sinh vật vận chuyển còn sống. Các ví dụ về các vector này là các virus như: virus gây bệnh viêm thanh khí quản lây nhiễm (ILTV) (Liischow et al., 2001, Vaccin, vol. 19, p. 4249-59); virus Rinderpest (Walsh et al., 2000, J. Virol., vol. 74, p. 10165-10175); virus gây bệnh viêm miệng mụn nước (Roberts et al., 1998, J. Virol., vol. 247, p. 4704-4711); virus gây bệnh đậu gà (Swayne et al., 2000, Vaccin, vol. 18, p. 1088-1095); Adenovirut (Toro et al., 2010, Avian Diseases, vol. 54, p. 224-231); và NDV (Veits et al., 2006, PNAS USA, vol. 103, p. 8197-8202).

Trong số này, vector bệnh đậu gà dựa trên Trovac® vaccin AIV-H5 (Merial), có bán trên thị trường.

Vaccin AI cho gia cầm được dự định để bảo vệ động vật đã tiêm chủng kháng các triệu chứng của bệnh cúm gia cầm, và kháng tái nhiễm trong tương lai. Tuy nhiên, vaccin có khả năng làm giảm sự lây lan của virus kiểu đại trong môi trường, ví dụ sang các đàn khác, sang chim đại di trú hoặc bản địa, hoặc sang các loài động vật khác gần như thích hợp tương đương với bệnh do virus có khả năng truyền từ động vật sang người và gây dịch lớn như AIV. Tác dụng làm giảm sự lây lan của virus có thể đạt được bằng cách gây đáp ứng miễn dịch rất hữu hiệu ở chim đã tiêm chủng.

Vaccin AI mà là vaccin tiểu đơn vị hoặc vector có ưu điểm là chúng có thể được sử dụng trong phương pháp DIVA: “phân biệt động vật bị nhiễm và động vật được tiêm chủng”, cũng được biết là: “vaccin đánh dấu”. Việc ứng dụng này là do vaccin tái tổ hợp chỉ cảm ứng kháng thể kháng protein virus đã được biểu hiện, mà không kháng các protein virus khác như sẽ xảy ra trong trường hợp gây nhiễm bằng virus nguyên vẹn. DIVA là quan trọng đối với nhiều quốc gia hoặc khu vực kinh tế mà muốn duy trì và xác nhận tình trạng không có AIV, ví dụ, để nhằm mục đích xuất khẩu.

Các vaccin hiện nay mà được dựa trên AIV bất hoạt nguyên vẹn trong nhũ tương dầu có tá chất không cho phép phân biệt bằng phương pháp DIVA. Trong trường hợp xấu nhất, gia cầm đã tiêm chủng bằng vaccin này sẽ mang kháng thể có

phổ rộng kháng AIV, nhưng nếu các kháng thể này không có tác dụng bảo vệ hoàn toàn, chim sẽ vẫn mang AIV lây nhiễm còn sống, mặc dù chúng sẽ không bị chú ý.

Vectơ virus tái tổ hợp còn sống để biểu hiện và phân phối kháng nguyên khác loại phải có thể vượt qua được nhiều áp lực sinh học lên độ ổn định và hiệu quả của nó: trước hết là khả năng tạo ra dòng con sau khi chuyển nhiễm. Điều này cho thấy rằng virus tái tổ hợp có thể sống được. Tiếp theo, khả năng sao chép *in vitro* trong dòng tế bào chủ qua nhiều chu trình trong khi duy trì sự biểu hiện của gen khác loại. Điều này cho thấy rằng virus tái tổ hợp không bị nhược độc bằng cách gắn chèn, và đột biến gắn chèn được sao chép và được biểu hiện ổn định. Sau đó là việc sao chép và biểu hiện *in vivo*. Điều này cho thấy virus tái tổ hợp có thể vượt qua được áp lực chọn lọc một cách đáng kể ở động vật sống, như được đặt ra bởi hệ miễn dịch. Thông thường, việc mất sự biểu hiện của các gen ngoại lai giúp sao chép nhanh hơn ở động vật; “thể đột biến lẫn trốn” chứa các đột biến thu được, hoặc đột biến mất đoạn chính ở gen ngoại lai, và chúng phát triển quá mức vectơ nguyên vẹn. Cuối cùng, sự sao chép ở động vật cần có khả năng tạo ra đáp ứng miễn dịch hiệu quả sao cho động vật được tiêm chủng được bảo vệ.

Mối quan tâm đặc biệt liên quan đến tính hiệu quả *in vivo*, là tác động của vacxin vectơ virus ở động vật đã có kháng thể; kháng vectơ và/hoặc gen khác loại mà nó biểu hiện. Đối với động vật non, các kháng thể này chủ yếu thu được từ mẹ của chúng là cá thể đã được tiêm chủng đầy đủ kháng lại các mầm bệnh thông thường; do đó tên của chúng là kháng thể nhận được từ mẹ (MDA). Kháng thể như vậy có thể gây rối loạn sự sao chép của vectơ và/hoặc sự biểu hiện của gen ngoại lai, do chúng có thể kích thích hệ miễn dịch của động vật (không dự định) thanh thải vacxin vectơ.

Các cấu trúc virus vectơ tái tổ hợp của vectơ HVT có đột biến gắn chèn gen IV-HA đã được mô tả: công ty CEVA đã thông báo sản phẩm “VECTORMUNE HVT-AI” trên trang web (<http://www.ceva.com/en/Responsibility/Contributions>), nhưng chưa có thông báo chi tiết.

Lan et al. (2009, *Acta Microbiologica Sinica*, vol. 49, p. 78-84) mô tả vectơ HVT có đột biến gắn chèn gen H5 IV-HA, được tạo ra bằng cách sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp Bacmid được cải tiến. Cả từ bản dịch của bài báo (bằng tiếng Trung Quốc), và từ bài báo tương ứng về kỹ thuật tái tổ hợp được sử dụng cho MDV (Cui et al., 2009,

J. of Virol. Meth., vol. 156, p. 66-72), rõ ràng là Lan et al. đã tạo ra HVT tái tổ hợp của chúng bằng cách gắn chèn catxet biểu hiện trong gen Us2 của HVT; catxet biểu hiện chứa gen IV H5 HA dưới sự kiểm soát của trình tự khởi động gen sớm tức thì của cytomegalovirus của người (IE-hCMV). Catxet này chứa các yếu tố bổ sung cần cho quy trình tách dòng và chọn lọc. Bài báo của Lan et al. chỉ mô tả việc tách dòng và giải phóng thể tái tổ hợp HVT+H5; không có thử nghiệm trên động vật được báo cáo, cũng như không có dữ liệu về hiệu quả hoặc độ ổn định từ các thử nghiệm *in vitro* hoặc *in vivo*.

Theo cách khác, Zhou et al. (2010, Vaccin, vol. 28, p. 3990-3996), mô tả việc sử dụng trình tự khởi động gB để biểu hiện IBVD VP2, từ locus Us10 của MDV1. Đáng lưu ý là dấu hiệu này được đề cập vắn tắt trong phần tóm tắt, nhưng phần còn lại của bài báo này mô tả việc tạo ra và sử dụng vector MDV1 mà biểu hiện lacZ và VP2 được điều khiển bởi trình tự khởi động hCMV-IE từ locus Us2?

Sonoda et al. (2000, J. of Virol., vol. 74, p. 3217-3226) mô tả việc sử dụng trình tự khởi động MDV1 gB để điều khiển sự biểu hiện của gen NDV F, từ locus Us10 của MDV1.

Takekoshi et al. (1998, Tokai J. Exp. Clin. Med., vol. 23, p. 39-44) mô tả việc sử dụng trình tự khởi động gen gB từ hCMV để biểu hiện các gen khác loại trong hCMV.

US2008/0241188 mô tả việc sử dụng trình tự khởi động gen CMV IE để điều khiển gen AIV HA trong vector HVT.

WO2007/022151 mô tả việc sử dụng trình tự khởi động gen sớm hCMV để điều khiển gen AIV HA trong vector adenovirus người.

WO01/05988 mô tả việc sử dụng trình tự khởi động gen mCMV IE và trình tự khởi động SV40 để điều khiển các gen từ virus gây bệnh bạch cầu ở gia cầm, trong vector HVT.

Sonoda et al. (J. of Virol., vol. 74, p. 3217) mô tả việc sử dụng trình tự khởi động gen MDV1 gB để điều khiển gen NDV F trong vector MDV1.

WO2010/119112 mô tả (trong các ví dụ 23-25) việc sử dụng trình tự khởi động gen CMV IE để điều khiển sự biểu hiện của gen HA typ H5 từ AIV trong vector HVT.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là tạo ra vaccin AI được dựa trên vector HVT; vaccin vector này nên gây ra tác dụng bảo vệ miễn dịch hiệu quả kháng sự lây nhiễm và bệnh gây ra bởi AIV ở gia cầm.

Yêu cầu chính đối với sản phẩm vaccin vector khả thi về tính miễn dịch và kinh tế là ổn định, cả về khả năng sao chép vector lẫn sự biểu hiện của gen khác loại được gắn chèn. Sự kết hợp này cho phép chu trình sao chép *in vitro* rộng mà cần thiết để sản xuất trên quy mô lớn, cũng như cho phép biểu hiện và trình diện liên tục với hệ miễn dịch của vật chủ của gen ngoại lai được gắn chèn, khi vaccin vector đang sao chép trong động vật chủ đã tiêm chủng. Ngoài ra, tính ổn định này sẽ cho phép vaccin vector phù hợp với tiêu chuẩn rất cao về độ an toàn và tính ổn định sinh học mà phải đáp ứng được bởi virus tái tổ hợp được đưa vào thị trường, để được cấp phép thương mại từ cơ quan nhà nước có thẩm quyền.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1: Gà con MDA-+ được tiêm chủng ở các ngày tuổi và tiếp đó được gây nhiễm. Sự giảm giải phóng virus như được gây ra bởi vaccin vector HVP310, so với chim được tiêm chủng dạng nhũ tương, và được tiêm chủng đối chứng, được phát hiện là hệ số 250 ở ngày 2 sau khi thử nghiệm.

Mô tả chi tiết sáng chế

Tác giả sáng chế đã bất ngờ phát hiện ra rằng các trình tự khởi động đã được sử dụng trong giải pháp đã biết để điều khiển sự biểu hiện của gen khác loại ở HVT, không thể được sử dụng để biểu hiện gen IV HA trong vector HVT.

Một số trình tự khởi động được kiểm tra: trình tự khởi động lặp đoạn cuối dài - virus Rous Sarcoma (RSV LTR) (như được mô tả trong EP 431, 668: thu được pRSVcat (Gorman et al., 1982, PNAS USA, vol. 79, p. 6777-6781)); và trình tự khởi động gen hCMV IE (thu được từ p117: Cox et al., 2002, Scand. J. Immunol., vol. 55, p. 14-23), để điều khiển sự biểu hiện của gen IV H5 HA, ở locut Us10 của bộ gen HVT.

Vector có trình tự khởi động hCMV IE đã tạo ra các mảng sau khi gây nhiễm, tuy nhiên các mảng này không thể được khuếch đại qua nhiều chu trình; vector HVT có trình tự khởi động LTR đã tạo ra các mảng có thể được khuếch đại, tuy nhiên các

màng này chỉ thể hiện sự biểu hiện HA rất yếu, và khi được thử nghiệm ở động vật dưới dạng virus tái tổ hợp HVP142, không tạo ra tác dụng bảo vệ hiệu quả trong thời gian từ 2 đến 3 tuần (xem các ví dụ).

Trong trường hợp này, bất ngờ là trình tự khởi động gen gB từ virus ecpet của động vật có vú, mà chưa được mô tả trước đó để điều khiển sự biểu hiện gen khác loại trong HVT, cũng như để biểu hiện gen IV HA, có thể được sử dụng để tạo ra vaccine vector HVT biểu hiện đột biến gắn xen gen IV HA, mà thể hiện một cách thuận lợi tính ổn định trong việc sao chép vector và hiệu quả miễn dịch khi biểu hiện gen ngoại lai.

Không mong muốn bị ràng buộc bởi lý thuyết, tác giả sáng chế cho rằng trình tự khởi động gen gB từ virus ecpet của động vật có vú, khi được sử dụng để biểu hiện gen IV HA trong vector HVT, tạo sự cân bằng thích hợp giữa cường độ biểu hiện của gen khác loại, và chúng có được khả năng sao chép của HVT tái tổ hợp.

Do đó, sáng chế đề cập đến vector HVT bao gồm axit nucleic khác loại mà bao gồm trình tự nucleotit có khả năng mã hóa protein IV HA, khác biệt ở chỗ, trình tự nucleotit này được liên kết chức năng với trình tự khởi động gen glycoprotein B (gB) từ virus ecpet của động vật có vú.

Vector HVT theo sáng chế là ổn định khi sao chép, và tạo ra sự biểu hiện liên tục của gen IV HA được gắn chèn, cả *in vitro* và *in vivo*. Vector HVT+HA, khi được sử dụng trong vaccine cho gia cầm, gây ra đáp ứng miễn dịch mạnh có thể bảo vệ chim kháng lại bệnh gây ra bởi việc gây nhiễm AIV nghiêm trọng, và có thể làm giảm đáng kể sự lây lan của virus gây nhiễm ra môi trường.

“Vector” theo sáng chế là vi sinh vật mang thể tái tổ hợp còn sống, ở đây là HVT.

“Axit nucleic khác loại” theo sáng chế, là axit nucleic không xuất hiện ở HVT mẹ mà được sử dụng để tạo ra vector HVT tái tổ hợp theo sáng chế.

“Protein” theo sáng chế là mạch phân tử chứa các axit amin. Protein này có thể, nếu cần, được biến đổi *in vivo* hoặc *in vitro*, bằng, ví dụ phản ứng glycosyl hóa, amit hóa, carboxyl hóa, phosphoryl hóa, peg hóa hoặc sự thay đổi về cấu trúc xoắn cuộn trong không gian. Protein này có thể có nguồn gốc sinh học hoặc tổng hợp. Protein này có thể là protein tự nhiên hoặc thành thực, tiền protein, hoặc mảnh chức năng của

protein. Không kể những cái khác, peptit, oligopeptit và polypeptit có hoạt tính miễn dịch được bao gồm trong phần định nghĩa về protein.

“Trình tự khởi động” được biết là vùng chức năng trên bộ gen của sinh vật mà điều khiển sự phiên mã của vùng mã hóa xuôi dòng. Vì thế, trình tự khởi động là mảnh ADN, được đặt ngược dòng, tức là về phía 5', của khung đọc mở, thường là gen.

Như đã biết, trình tự khởi động bắt đầu tổng hợp mARN của gen mà nó kiểm soát, bắt đầu từ “vị trí khởi đầu phiên mã” (TSS). mARN đã tạo ra lại được dịch mã thành protein bắt đầu từ codon khởi đầu của gen, là trình tự ATG đầu tiên trong khung đọc mở (AUG đầu tiên trong mARN). Thông thường, TSS được đặt ở nucleotit thứ 30-40 ngược dòng của codon khởi đầu. TSS có thể được xác định bằng cách giải trình tự đầu 5' của mARN của gen, ví dụ bằng kỹ thuật RACE.

Trình tự khởi động không có chiều dài cụ thể, tuy nhiên trình tự khởi động thông thường bao gồm trong khoảng 1000 nucleotit ngược dòng vị trí A của codon khởi đầu, thường được chỉ ra là A+1; hầu hết các trình tự khởi động nằm ở vị trí giữa -500 và A+1, thường là nằm giữa nucleotit -250 và A+1.

Ngoài ra, các trình tự khởi động không có trình tự nucleotit cố định, mà chúng có chứa nhiều yếu tố trình tự bảo toàn, có thể nhận diện; các yếu tố này tham gia vào việc gắn kết các yếu tố phiên mã, và điều khiển ARN polymeraza, và cũng tham gia vào việc điều hòa theo thời gian, khoảng thời gian, điều kiện và mức phiên mã mà cần tuân theo. Theo cách này, trình tự khởi động phản ứng với tín hiệu từ các yếu tố điều hòa như yếu tố tăng cường, hoặc yếu tố gắn kết ADN như thuốc, hormon, chất chuyển hóa, v.v.. Các yếu tố trình tự khởi động được bảo toàn đã biết là khuôn TATA, thường được trong khoảng 50 nucleotit ngược dòng TSS, thường là khoảng 30 nucleotit ngược dòng TSS. Các ví dụ khác về các yếu tố trình tự khởi động được bảo toàn là khuôn CAAT, thường nằm ở khoảng 75 nucleotit ngược dòng TSS, và khuôn GC thường ở khoảng 90 nucleotit ngược dòng TSS.

Vị trí và kích thước của trình tự khởi động có thể được xác định một cách thuận lợi bằng cách sử dụng các thử nghiệm chuẩn, như phương pháp biểu hiện gen đánh dấu bằng các phần lớn hơn hoặc nhỏ hơn được tách dòng phụ của trình tự khởi động nghi ngờ. Theo cách tương tự, bằng cách thử nghiệm sự biểu hiện của gen đánh dấu

(bằng cách phát hiện việc sản xuất ARN hoặc protein), cường độ tương đối của các trình tự khởi động khác nhau có thể được xác định hoặc được so sánh.

Trên thực tế, trình tự khởi động có thể được chọn lọc một cách đơn giản bằng cách tách dòng phụ vùng nằm giữa hai gen liên tiếp ví dụ từ tín hiệu poly A của gen ngược dòng đến TSS của gen xuôi dòng, sau đó cắt vùng đã tách dòng khi thích hợp.

Do trình tự khởi động liên kết với gen mà nó kiểm soát sự biểu hiện trong trường hợp tự nhiên, việc biết được vị trí của gen, hoặc điểm bắt đầu sao chép của mARN của nó, vốn đã bộc lộ vị trí của trình tự khởi động đi kèm của nó. Điều này cũng có thể áp dụng cho sáng chế, trong đó “trình tự khởi động gen gB từ virus ecpet của động vật có vú” để chỉ trình tự khởi động điều khiển sự biểu hiện của gen gB virus ecpet, và được đặt ngay phía trên gen gB. Protein gB trong sao chép virus ecpet thông thường tham gia vào sự nhập bào và lan truyền từ tế bào sang tế bào. Do gen gB là gen đã được bộc lộ trong nhiều tài liệu và có thể được nhận diện một cách rõ ràng, và do bộ gen của nhiều herpesviridae đã được giải trình tự (toàn bộ hoặc một phần), người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể dễ dàng xác định và thu được trình tự khởi động này bằng kỹ thuật thông thường.

Bài viết về protein gB virus ecpet được trình bày bởi Perreira (1994, *Infect. Agents Dis.*, vol. 3, p. 9-28). Trình tự khởi động của gen gB HSV1 được nghiên cứu cụ thể bởi Pederson et al. (1992, *J. of Virol.*, vol. 66, p. 6226-6232). Tuy nhiên cả hai tài liệu này chưa mô tả hoặc đề xuất việc sử dụng trình tự khởi động gB virus ecpet để điều khiển sự biểu hiện gen khác loại, trong HVT hoặc trong hệ vector biểu hiện khác bất kỳ.

Trong sáng chế, trình tự khởi động gen gB từ virus ecpet của động vật có vú cần phải điều khiển sự biểu hiện của gen HA. Điều này thường được gọi là trình tự khởi động được “liên kết chức năng” với gen, hoặc: gen nằm dưới sự kiểm soát của trình tự khởi động. Điều này có nghĩa là trong cấu trúc vector HVT cuối cùng, trình tự khởi động gen gB và gen HA được liên kết trên cùng một ADN, với khoảng cách hữu hiệu, và không có tín hiệu hoặc trình tự giữa chúng mà sẽ cản trở sự phiên mã và dịch mã hiệu quả.

Trong cấu trúc vector theo sáng chế, codon khởi đầu được cung cấp bởi gen HA. Ngoài ra, các cấu trúc vector được tạo là tinh khiết tối đa, cho thấy rằng ngoại trừ một

số vị trí enzym giới hạn, không thấy có các yếu tố ngoại lai đáng kể trong cấu trúc vectơ tái tổ hợp như catxet biểu hiện với các yếu tố khác loại cần thiết để tách dòng hoặc chọn lọc thể tái tổ hợp.

Mặc dù không bắt buộc, trong một phương án được ưu tiên gen HA được tạo cấu trúc để chứa tín hiệu poly A xuôi dòng, ví dụ từ SV40. Tín hiệu này có thể tạo ra sự kết thúc phiên mã hoàn toàn hơn, và gây ra sự polyadenyl hóa bản sao để dịch mã.

Sự tạo thành cấu trúc vectơ HVT+HA có thể được thực hiện bằng kỹ thuật sinh học phân tử đã biết, bao gồm việc tách dòng, chuyển nhiễm, tái tổ hợp, chọn lọc, và khuếch đại.

“Virus ecpet của động vật có vú” theo sáng chế đề cập đến virus ecpet thường gây nhiễm và sao chép ở loài động vật có vú. Tốt hơn là virus này thuộc phân họ của Alphaherpesvirinae. Ví dụ: virus ecpet người 1 (herpes simplex virus), virus ecpet bò 1, virus ecpet mèo 1, virus ecpet ngựa 1 (EHV), virus gây bệnh giả dại ở lợn (PRV, còn gọi là virus ecpet suid 1).

Các trình tự khởi động gen gB từ virus ecpet của động vật có vú được sử dụng một cách thuận lợi trong sáng chế.

Do đó, trong một phương án được ưu tiên trình tự khởi động gen gB từ virus ecpet của động vật có vú theo sáng chế là từ PRV, hoặc EHV.

Vectơ HVT bao gồm các trình tự khởi động gen gB này được chứng minh là ổn định thích hợp ở cả *in vitro* và *in vivo*, và khi được sử dụng trong vaccin cho gia cầm có hiệu quả cao về mặt miễn dịch để bảo vệ gia cầm khỏi AI và làm giảm sự lây lan AIV.

Các trình tự khởi động này có thể thu được một cách thuận lợi từ giải pháp kỹ thuật đã biết, như từ Ngân hàng gen, ví dụ:

- PRV, từ Ngân hàng gen acc.nr: BK001744, vùng 20139 - 19596 (gen PRV gB là UI 27 hoặc gII), hoặc

- EHV, từ Ngân hàng gen acc.nr: AY665713, vùng 60709 - 61570 (gen EHV1 gB là ORF 33).

Ngoài ra, số truy nhập Ngân hàng gen pfam00606 đại diện cho một nhóm protein gB của virus ecpet một cách thuận tiện.

Cấu trúc vector HVP311 như được mô tả trong các ví dụ có chứa trình tự khởi động gen EHV gB (SEQ ID NO: 1), và được chứng minh có độ ổn định *in vitro* và *in vivo*. Khi được sử dụng làm vacxin, cấu trúc này đã thể hiện tác dụng bảo vệ miễn dịch tốt và làm giảm sự lây lan virus, xem các ví dụ.

Để cải thiện thêm hiệu quả của trình tự khởi động gen gB từ virus ecpet của động vật có vú theo sáng chế, đồng thời duy trì độ ổn định của nó, trình tự khởi động được làm thích nghi. Việc làm thích nghi là việc kéo dài trình tự khởi động, sao cho nó không kết thúc trước A+1, mà kéo dài xuôi dòng A+1 của codon khởi đầu của gen gB, vào vùng mã hóa của gen gB mà thường được dịch mã thành protein.

Kết quả là trình tự khởi động được kéo dài bây giờ bao gồm một hoặc nhiều codon ATG, cụ thể là codon khởi đầu ban đầu và các codon mã hóa methionin có thể khác. Codon ATG này, ở vị trí xuôi dòng khuôn TATA trong trình tự khởi động có thể được dịch bằng bộ máy phiên mã tế bào như codon khởi đầu, dẫn tới sự khởi động dịch mã chưa thành thực không mong muốn. Do đó codon ATG xuôi dòng khuôn TATA của trình tự khởi động gen gB, mà bây giờ nằm trong trình tự khởi động kéo dài được biến đổi bằng cách gây đột biến khiến cho ATG không có chức năng làm codon khởi đầu tiềm năng. Điều này cho phép trình tự khởi động gB theo sáng chế đưa vào các nucleotit mà mở rộng codon khởi đầu gB tự nhiên và kéo dài vào trong vùng được dịch mã của gen gB, tuy nhiên các nucleotit bổ sung này không được dịch mã, mà hoạt động như trình tự dẫn đầu được kéo dài.

Do đó, trình tự khởi động được tạo cấu trúc chứa nucleotit từ vùng mã hóa gB nằm xuôi dòng A+1 gốc.

Do đó, trong phương án được ưu tiên hơn, trình tự khởi động gen gB từ virus ecpet của động vật có vú bao gồm trình tự nucleotit từ vùng được dịch mã của gen gB này, trong đó trình tự nucleotit ATG bất kỳ đã được thay đổi.

“Sự thay đổi” trình tự nucleotit ATG trong trình tự khởi động được kéo dài theo sáng chế, tốt hơn là được tạo ra bằng cách gây đột biến. Trình tự nucleotit ATG nói chung có thể được thay thế thành codon bất kỳ khác, miễn là sự thay đổi này không làm giảm sự ổn định của việc sao chép, hoặc sự biểu hiện của cấu trúc vector.

Tốt hơn là thay đổi này là bởi một nucleotit duy nhất, tốt hơn là từ ATG thành

TTG.

Số lượng nucleotit xuôi dòng ATG được bao gồm trong trình tự khởi động gB được kéo dài theo sáng chế ít nhất bằng 10, tốt hơn nếu ít nhất bằng 20, 30, 50, 75 hoặc 100, theo thứ tự ưu tiên. Trên thực tế, số lượng của nucleotit xuôi dòng A+1 mà cần được đưa vào trong trình tự khởi động kéo dài theo sáng chế, có thể được lấy làm trình tự từ A+1 đến - nhưng không bao gồm - codon ATG xuôi dòng tiếp theo một cách thuận lợi. Trong trường hợp đó chỉ một trình tự ATG (của codon khởi đầu) cần được thay đổi bằng cách gây đột biến.

Cấu trúc vector HVP310 như được mô tả trong các ví dụ chứa trình tự khởi động gen PRV gB được kéo dài 129 nucleotit qua A+1. Chỉ có trình tự ATG được bao gồm trong trình tự kéo dài là từ codon khởi đầu ban đầu, trình tự này đã được thay đổi thành TTG bằng cách gây đột biến. Vector này đã thể hiện hiệu quả và tính ổn định *in vitro* tương tự như trình tự khởi động gen EHV gB không được làm thích nghi, tuy nhiên có hiệu quả *in vivo* được cải thiện đáng kể, xem các ví dụ.

Trình tự khởi động gen PRV gB kéo dài được thể hiện trong SEQ ID NO: 2.

Do đó, theo một phương án được ưu tiên hơn của trình tự khởi động gen gB từ virus ecpet của động vật có vú theo sáng chế, trình tự khởi động này có trình tự nucleotit như trong SEQ ID NO: 2, hoặc dạng tương đương của nó.

Gen HA mà được bao gồm trong vector HVT theo sáng chế, nói chung có thể là gen HA virus cúm bất kỳ, vì thế nói chung là từ IV bất kỳ, và thuộc typ huyết thanh bất kỳ H1 - H16, hoặc các gen HA tương tự được mô tả trong tương lai.

Để tối ưu hóa hiệu quả của vacxin cho gia cầm kháng AI dựa trên vector HVT theo sáng chế, gen HA được gắn chèn tốt hơn là gen HA typ gây bệnh cao (=HP), vì thế bao gồm axit amin bazơ ở vị trí phân cắt HA1-HA2. Sự biểu hiện của gen HP HA giúp tiêm chủng gia cầm một cách hiệu quả để kháng lại việc lây nhiễm AIV typ HP, và làm giảm sự lây lan thêm vào trong môi trường.

Do đó, theo một phương án được ưu tiên của vector HVT theo sáng chế, trình tự nucleotit có khả năng mã hóa protein IV HA thu được từ HP IV.

Đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, IV được xem là HP, và nhiều trình tự đã được công bố. Đồng thời, gen HP HA để sử dụng trong sáng chế có thể dễ dàng thu được từ

các thể phân lập của HP IV, từ các loài vật chủ khác nhau, bằng cách sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử thông thường như RT-PCR.

Tốt hơn là HA typ HP theo sáng chế thu được từ HP AIV.

NB: thao tác với thể phân lập HP AIV sống sẽ cần phòng thí nghiệm có các thiết bị với mức độ kiểm soát thích hợp.

Để cải thiện thêm hiệu quả của vacxin cho gia cầm chứa vector HVT theo sáng chế, gen HA được bao gồm trong vector này được tối ưu hóa codon. Quy trình tối ưu hóa codon là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, và bao gồm việc làm thích nghi trình tự nucleotit mã hóa protein để mã hóa các axit amin giống như trình tự mã hóa ban đầu, dù có các nucleotit khác hay không; tức là các đột biến hầu như câm. Điều này cải thiện mức độ mà trình tự mã hóa được biểu hiện trong trường hợp khác với gốc của gen đã được biểu hiện. Ví dụ khi biểu hiện gen này trong hệ biểu hiện tái tổ hợp, việc sử dụng codon đã thích nghi cung cấp sự ưu tiên codon của hệ mới. Trên thực tế điều này có nghĩa là mặc dù hầu hết các axit amin sẽ giữ nguyên, trình tự nucleotit mã hóa này có thể khác biệt đáng kể (độ tương đồng đến 25%) với trình tự ban đầu.

Theo sáng chế, trình tự mã hóa của cADN của gen IV HA được sử dụng trong sáng chế được tối ưu hóa để biểu hiện trong vector virus nhân chuẩn, như HVT.

Các ví dụ về trình tự gen HA từ AIV typ HP, mà được tối ưu hóa codon theo sáng chế là: các SEQ ID NO: 3 và 3, từ các gen H5 và H7 HA tương ứng, và protein HA được mã hóa tương ứng trong SEQ ID NO: 4 và 6. Như đã biết, protein HA có độ tương đồng trình tự axit amin của các gen này nằm trong khoảng 90% thường được xem là thuộc cùng nhóm kháng nguyên.

Do đó trong phương án được ưu tiên hơn của trình tự nucleotit có khả năng mã hóa protein IV HA cho vector HVT theo sáng chế, protein AIV HA được mã hóa có độ tương đồng trình tự axit amin ít nhất bằng 90% với trình tự axit amin như trong SEQ ID NO 4, hoặc 6. Độ tương đồng 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% được ưu tiên hơn, theo thứ tự ưu tiên.

Theo một phương án được ưu tiên hơn, trình tự nucleotit có khả năng mã hóa protein IV HA theo sáng chế có trình tự nucleotit có độ tương đồng trình tự nucleotit ít

nhất bằng 90% với trình tự nucleotit như trong SEQ ID NO: 3 hoặc 5. Độ tương đồng bằng 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% được ưu tiên hơn, theo thứ tự ưu tiên.

Vectơ HVT được ưu tiên nhất theo sáng chế bao gồm axit nucleic khác loại mà bao gồm trình tự khởi động gen gB kéo dài, từ PRV (ví dụ SEQ ID NO: 2) và gen AIV HA được tối ưu hóa codon, thuộc typ H5 (ví dụ SEQ ID NO: 3), nhờ đó axit nucleic khác loại được gắn chèn vào trong bộ gen HVT trong locut Us2.

Ví dụ về virus vectơ HVT+HA này được thể hiện bằng cấu trúc vectơ HVP310 (xem các ví dụ), đã tạo ra hiệu quả cao nhất về miễn dịch và làm giảm sự lây lan virus đo được.

Trình tự nucleotit của axit nucleic khác loại mà có thể được sử dụng để lắp ráp vectơ virus HVT+HA tái tổ hợp này bằng kỹ thuật thông thường là như được thể hiện trong SEQ ID NO: 7. Trình tự này có thể dễ dàng được kết hợp vào plasmit mang chuẩn như có bán trên thị trường từ chuỗi pUC. Sau đó, plasmit thu được được gọi là “vectơ truyền”, và thích hợp để sử dụng trong quy trình chuyển nhiễm.

Như đã mô tả, cấu trúc vectơ HVT+HA theo sáng chế có thể được tạo ra bằng kỹ thuật chuẩn đã biết trong lĩnh vực. Trọng tâm của các kỹ thuật này là sự kết hợp vào trong bộ gen của HVT, axit nucleic khác loại bao gồm trình tự khởi động gen gB từ virus ecpet của động vật có vú và gen IV HA, đều theo sáng chế.

Do đó, một khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra vectơ HVT theo sáng chế, bao gồm kết hợp vào trong bộ gen của HVT axit nucleic khác loại mà bao gồm trình tự nucleotit có khả năng mã hóa protein IV HA, trong đó trình tự nucleotit này được liên kết chức năng với trình tự khởi động gen gB từ virus ecpet của động vật có vú.

Ứng dụng có lợi của vectơ HVT +HA theo sáng chế là trong vacxin cho gia cầm kháng AI; bảo vệ chim và môi trường xung quanh chúng khỏi việc lây nhiễm và bệnh gây ra bởi AIV.

Do đó, theo một khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến vectơ HVT theo sáng chế, hoặc vectơ HVT có thể thu được bằng phương pháp theo sáng chế, để sử dụng trong chủng ngừa gia cầm kháng lại AI.

Ứng dụng trong việc chủng ngừa theo sáng chế này, được thực hiện một cách

thuận lợi bằng cách sử dụng chế phẩm vaccin bao gồm vectơ HVT theo sáng chế.

Do đó, theo một khía cạnh khác sáng chế đề cập đến vectơ HVT theo sáng chế, hoặc vectơ HVT có thể thu được bằng phương pháp theo sáng chế, để sử dụng trong vaccin kháng AI ở gia cầm.

Ứng dụng của vectơ theo sáng chế được bao gồm trong vaccin cho gia cầm.

Do đó theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến vaccin kháng AI ở gia cầm, bao gồm vectơ HVT theo sáng chế, hoặc có thể thu được bằng phương pháp theo sáng chế, và chất mang được dụng.

Vaccin được biết là chế phẩm bao gồm hợp chất có hoạt tính miễn dịch, trong chất mang được dụng. “Hợp chất có hoạt tính miễn dịch”, hoặc “kháng nguyên” là phân tử mà được nhận diện bởi hệ miễn dịch của đích và gây ra đáp ứng miễn dịch. Đáp ứng này có thể có nguồn gốc từ hệ miễn dịch bẩm sinh hoặc mắc phải, và có thể là kiểu tế bào và/hoặc dịch thể. Trong sáng chế, kháng nguyên là protein.

Thông thường, vaccin gây ra đáp ứng miễn dịch mà hỗ trợ việc ngăn ngừa, cải thiện, làm giảm độ nhạy đề, hoặc điều trị bệnh hoặc rối loạn do nhiễm vi sinh vật. Tác dụng bảo vệ này đạt được nhờ việc dùng ít nhất một kháng nguyên thu được từ vi sinh vật này. Điều này sẽ khiến cho động vật đích thể hiện sự giảm số lượng, hoặc cường độ của các dấu hiệu lâm sàng gây ra bởi vi sinh vật. Đây có thể là kết quả của sự giảm xâm lấn, lấn chiếm, hoặc tốc độ lây nhiễm bởi vi sinh vật, dẫn đến sự giảm số lượng hoặc mức độ nghiêm trọng của tổn thương và ảnh hưởng gây ra bởi vi sinh vật hoặc đáp ứng của động vật đích với nó.

“Chất mang được dụng” được dự định để hỗ trợ việc sử dụng hiệu quả của một hợp chất, mà không gây ra tác dụng bất lợi (nghiêm trọng) cho sức khỏe của động vật được dùng nó. Chất mang này có thể, ví dụ, là nước vô trùng hoặc dung dịch nước muối sinh lý vô trùng. Ở dạng phức tạp hơn, chất mang có thể, ví dụ, là chất đệm, có thể bao gồm nhiều chất phụ gia khác như chất ổn định hoặc chất bảo quản. Chi tiết và các ví dụ, được mô tả, ví dụ, trong các sổ tay thông dụng như: “Remington: the science and practice of pharmacy” (2000, Lippincot, USA, ISBN: 683306472), và: “Veterinary vaccinology” (P. Pastoret et al. ed., 1997, Elsevier, Amsterdam, ISBN 0444819681).

Vaccin theo sáng chế được bào chế từ các hạt vectơ virus sống HVT+HA theo

sáng chế bởi phương pháp như đã mô tả trong bản mô tả này mà, có thể dễ dàng được ứng dụng bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, vector HVT+HA theo sáng chế được tạo cấu trúc bằng cách chuyển nhiễm và tái tổ hợp và vector HVT tái tổ hợp mong muốn được chọn lọc như đã mô tả trong bản mô tả này. Tiếp theo, các virus vector HVT được sản xuất công nghiệp với quy mô nhỏ hơn hoặc lớn hơn. Mặc dù việc sản xuất trong động vật chủ có thể xảy ra, nhưng việc tăng sinh trong môi trường *in vitro*, ví dụ trong môi trường CEF, được ưu tiên. Sau khi thu hoạch thể huyền phù chứa virus, các tế bào nguyên vẹn hoặc tế bào bị phá vỡ bằng sóng siêu âm, thể huyền phù này được bào chế thành vaccin và sản phẩm cuối cùng được đóng gói. Sau khi kiểm định chuyên sâu về chất lượng, số lượng và độ vô trùng, sản phẩm vaccin này được đưa ra thị trường.

Các kỹ thuật và các cân nhắc thông thường mà áp dụng cho ngành vaccin học là đã biết trong lĩnh vực và được mô tả ví dụ trong các quy định của nhà nước (Dược điển) và trong các sổ tay như: “Veterinary vaccinology” và: “Remington” (đã được nêu trên).

Vaccin vector HVT+HA theo sáng chế nói chung có thể được đưa vào gia cầm đích bằng các đường dùng khác nhau, và ở các thời điểm khác nhau trong đời sống của nó, với điều kiện là virus vector HVT+HA đã chủng ngừa có thể có thể thiết lập cơ chế gây nhiễm bảo vệ.

Tuy nhiên, do việc gây nhiễm bằng AIV có thể được tạo ra ở lứa tuổi còn rất non, nên thuận lợi là sử dụng vaccin theo sáng chế ở giai đoạn càng sớm càng tốt. Do đó, vaccin theo sáng chế tốt hơn là được sử dụng vào ngày nở trứng (“ngày 1”), hoặc trong trứng, ví dụ vào ngày 18 ED. Ngoài ra, tốt hơn là việc sử dụng được thực hiện bằng phương pháp tiêm chủng đại trà. Phương pháp này cung cấp tác dụng bảo vệ sớm nhất, đồng thời giảm thiểu chi phí lao động.

Các phương pháp đã được biết rõ cho các đường sử dụng đại trà ở giai đoạn sớm là: bằng cách phun thô ở ngày 1, hoặc bằng cách tiêm tự động vào trứng. Thiết bị thích hợp để sử dụng ở quy mô công nghiệp có bán trên thị trường.

Do đó, theo một phương án được ưu tiên, vaccin theo sáng chế có thể được sử dụng trong trứng.

Các con đường tiêm chủng trong trứng khác đã biết, ví dụ trong túi noãn hoàng,

phôi, hoặc túi dịch niệu; các con đường này có thể được tối ưu hóa nếu cần. Tốt hơn là tiêm chủng vào trong túi dịch niệu.

Theo cách khác, khi vaccin theo sáng chế được kết hợp với thành phần kháng nguyên khác, việc dùng ngoài đường tiêu hóa có thể cần thiết, ví dụ bằng cách tiêm vào da hoặc qua da: ví dụ trong cơ, trong màng bụng, dưới da, v.v..

Các dạng bào chế của vaccin theo sáng chế thích hợp để tiêm, là ví dụ huyền phù, dung dịch, thể phân tán, hoặc dạng nhũ tương.

Khi được sử dụng bằng cách chủng ngừa phun, cỡ giọt được sử dụng rất quan trọng; thông thường phun thô được áp dụng (cỡ giọt trên 50 μ m), hữu hiệu là sử dụng bằng đường miệng, mũi, và/hoặc mắt.

Tùy theo đường dùng vaccin theo sáng chế, có thể cần phải biến đổi chế phẩm vaccin cho phù hợp. Điều này là nằm trong khả năng của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, và thường bao gồm bước tinh chỉnh tính hiệu quả hoặc độ an toàn của vaccin. Việc này có thể được thực hiện bằng cách điều chỉnh cho phù hợp về liều, khối lượng, tần suất, đường dùng vaccin, bằng cách sử dụng vaccin ở dạng hoặc chế phẩm khác, hoặc bằng cách điều chỉnh các thành phần khác của vaccin (ví dụ, chất ổn định hoặc chất bổ trợ).

Ví dụ, để thích hợp dùng trong trứng, chế phẩm vaccin cần phải rất dịu nhẹ, để không làm giảm khả năng nở của trứng. Việc làm giảm khả năng nở ở mức độ nhất định có thể được chấp nhận, ví dụ 10%, tốt hơn nữa là 5%, 4%, 3%, 2%, 1% hoặc 0% theo thứ tự ưu tiên.

Thông thường, độ an toàn của vaccin theo sáng chế được tạo ra bằng cách sử dụng làm virus HVT mẹ cho cấu trúc vector theo sáng chế, chủng vaccin HVT an toàn đã được chứng minh, như chủng PB1 hoặc FC126 HVT. Các chủng này thường sẵn có và được biết là thích hợp để tiêm chủng trong trứng. Việc kết hợp axit nucleic khác loại có thể không làm tăng độc lực hoặc khả năng gây bệnh của nó (ngược lại), và không gây độc lực trở lại có thể ứng dụng.

Lượng chính xác của virus vector HVT theo sáng chế ở liều vaccin không quan trọng bằng việc nó được sử dụng cho vaccin loại nhũ tương bất hoạt, do virus vector HVT sẽ tự sao chép và vì thế nhân lên trong vật chủ đến nồng độ của virus huyết mà

bền vững về mặt sinh học. Liều vaccin chỉ cần đủ để gây ra sự lây nhiễm hữu hiệu. Liều chất tiêm chủng cao hơn hầu như không rút ngắn thời gian cần thiết để đạt được nồng độ virus huyết tối ưu trong vật chủ; các liều rất cao là không hữu hiệu ở chỗ nồng độ virus huyết tạo ra không thể cao hơn điều kiện tối ưu tự nhiên, ngoài ra liều chất tiêm chủng rất cao này không thu hút vì các lý do kinh tế.

Do đó, liều chất tiêm chủng được ưu tiên nằm trong khoảng từ 1×10^0 đến 1×10^6 đơn vị tạo mảng (pfu) của virus vector HVT trong mỗi liều cho động vật, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 1×10^1 đến 1×10^5 /pfu liều, còn tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 1×10^2 đến 1×10^4 /pfu liều; tốt nhất là nằm trong khoảng từ 500 đến 5000 pfu/liều.

Việc xác định lượng có tác dụng gây miễn dịch của vaccin theo sáng chế nằm trong hiểu biết của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ bằng cách theo dõi đáp ứng miễn dịch sau khi tiêm chủng, hoặc sau khi gây nhiễm, ví dụ bằng cách tái phân lập tác nhân gây bệnh, hoặc theo dõi dấu hiệu lâm sàng của bệnh trên đối tượng, hoặc các tham số huyết thanh, và so sánh các kết quả này với đáp ứng được quan sát thấy ở động vật không được tiêm chủng.

Lịch sử dụng liều để sử dụng vaccin theo sáng chế cho sinh vật đích có thể là một liều hoặc nhiều liều, mà có thể được đưa vào tại cùng thời điểm hoặc lần lượt, theo cách phù hợp với dạng bào chế của vaccin, và với lượng sẽ có tác dụng gây miễn dịch.

Vaccin theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị dự phòng và trị liệu, và nhờ đó cản trở sự thiết lập và/hoặc sự phát triển của bệnh nhiễm trùng hoặc các triệu chứng lâm sàng của bệnh.

Vaccin theo sáng chế có thể được sử dụng một cách hiệu quả làm phương pháp tiêm chủng môi, mà sau đó có thể được kế tiếp và được khuếch đại bằng tiêm chủng tăng cường, ví dụ với vaccin có chất bổ trợ chứa virus nguyên vẹn bị bất hoạt thông thường.

Quy trình để sử dụng vaccin theo sáng chế lý tưởng là được kết hợp với các lịch tiêm chủng hiện nay của các vaccin khác.

Tốt hơn là vaccin theo sáng chế chỉ được sử dụng một lần, vào ngày trứng nở, hoặc trong trứng.

Thể tích cho mỗi liều động vật của vaccin vectơ HVT+HA theo sáng chế có thể được tối ưu hóa theo đường dùng được dự định: tiêm chủng trong trứng thường được sử dụng với thể tích nằm trong khoảng từ 0,05 đến 0,5ml/trứng, và tiêm ngoài đường tiêu hóa thường được thực hiện với thể tích nằm trong khoảng từ 0,1 đến 1 ml/con chim.

Việc xác định, và việc tối ưu hóa thể tích liều nằm trong khả năng của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Là hiệu quả cao khi bào chế vaccin theo sáng chế thành dạng kết hợp vaccin, vì theo cách này nhiều chất gây miễn dịch có thể được dùng một lần, làm giảm thời gian và chi phí nhân công, cũng như giảm sự không thoải mái cho động vật đích được tiêm chủng. Vaccin kết hợp bao gồm ngoài vaccin theo sáng chế, còn có một hợp chất có tính kháng nguyên khác. Nói chung, chất có tính kháng nguyên này có thể là vi sinh vật sống hoặc chết hoặc sản phẩm tiểu đơn vị, miễn là nó không làm giảm độ ổn định khi sao chép, hoặc sự biểu hiện từ cấu trúc vectơ HVT+HA. Thành phần có hoạt tính miễn dịch bổ sung có thể là kháng nguyên, chất tăng cường miễn dịch, xytokin, và/hoặc vaccin.

Theo cách khác, chính vaccin theo sáng chế, có thể được bổ sung vào vaccin.

Do đó, theo một phương án được ưu tiên, vaccin theo sáng chế khác biệt ở chỗ vaccin này bao gồm một hoặc nhiều thành phần có hoạt tính miễn dịch bổ sung.

Trong phương án được ưu tiên vaccin theo sáng chế là vaccin kết hợp, bao gồm ít nhất một kháng nguyên bổ sung từ vi sinh vật mà gây bệnh cho gia cầm.

Tốt hơn là kháng nguyên bổ sung này từ vi sinh vật mà gây bệnh cho gia cầm được chọn từ nhóm bao gồm:

- virus: virus gây viêm phế quản truyền nhiễm, virus gây bệnh Newcastle, Adenovirus, virus gây hội chứng giảm đẻ, virus gây bệnh Gumboro ở gà (tức là Gumborovirus), virus gây bệnh thiếu máu ở gà, virus gây bệnh viêm não và dây cột sống ở gia cầm, virus gây bệnh đậu gà, virus gây hội chứng sung phù đầu ở gà tây, virus gây dịch tả vịt (viêm ruột non do virus ở vịt), virus gây bệnh đậu ở bồ câu, MDV, virus gây bệnh bạch cầu cấp, ILTV, virus gây viêm phổi ở gia cầm (avian pneumovirus), và reovirus;

- vi khuẩn: *Escherichia coli*, *Salmonella spec*, *Ornitobacterium rhinotracheitis*, *Haemophilis paragallinarum*, *Pasteurella multocida*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Erysipelas spec*, *Mycoplasma spec*, và *Clostridium spec*;

- ký sinh trùng: *Eimeria spec*; và

- nấm: ví dụ *Aspergillus spec*.

Ưu tiên nhất là MDV, ILTV, IBVD, và NDV.

Động vật gia cầm đích được ưu tiên sử dụng vacxin theo sáng chế là gà con. Gà con này là gà đẻ trứng, gà giống, các giống kết hợp, hoặc các dòng bố mẹ của giống gà con bất kỳ này.

Tuổi, cân nặng, giới tính, tình trạng miễn dịch, và các thông số khác của gia cầm được tiêm chủng không phải là quan trọng, mặc dù ưu tiên chủng ngừa cho các đối tượng khỏe mạnh, và tiêm chủng càng sớm càng tốt để ngăn ngừa việc lây nhiễm.

Vacxin theo sáng chế được sử dụng thuận lợi trong phương pháp DIVA, làm “vacxin đánh dấu”. Vacxin đánh dấu được biết là vacxin cho phép phân biệt giữa các đối tượng được tiêm chủng và bị lây nhiễm. Điều này có thể dễ dàng được phát hiện bằng thử nghiệm huyết thanh như thử nghiệm ELISA hoặc thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang.

Do đó, trong một phương án được ưu tiên, vacxin theo sáng chế là vacxin đánh dấu.

Như đã mô tả, có nhiều cách khác nhau để bào chế và tạo ra vacxin theo sáng chế, phụ thuộc vào đường dùng mong muốn, hỗn hợp kháng nguyên, v.v..

Do đó, theo một khía cạnh khác sáng chế đề cập đến việc sử dụng vector HVT theo sáng chế, hoặc vector HVT có thể thu được bằng phương pháp theo sáng chế, để sản xuất vacxin kháng AI ở gia cầm.

Theo cách khác, theo một khía cạnh khác sáng chế đề cập đến phương pháp bào chế vacxin theo sáng chế, phương pháp này bao gồm bước phối trộn vector HVT theo sáng chế, hoặc với vector HVT có thể thu được bằng phương pháp theo sáng chế, và chất mang được dùng.

Do các đặc tính thuận lợi của HVT, vacxin được sản xuất theo ứng dụng hoặc

theo phương pháp của sáng chế, có thể được trình bày ở các dạng khác nhau, cụ thể là ở dạng không tế bào hoặc dạng liên kết với tế bào. Để thu được dạng liên kết với tế bào, virut vectơ HVT+HA được thu hoạch cùng với tế bào chủ mà trong đó nó được sản sinh ra, ví dụ CEF. Ở dạng không tế bào, các tế bào chủ sản sinh được phá vỡ bằng sóng siêu âm trong dung dịch chất ổn định, và HVT không tế bào được thu hoạch ở dạng dịch nổi của dịch đồng nhất vô bào.

Vaccin theo sáng chế có thể được sản xuất để chứa một hoặc nhiều thành phần hỗ trợ khả năng sống và chất lượng của vectơ HVT theo sáng chế, vì thế thúc đẩy việc sao chép hiệu quả và thiết lập tác dụng gây nhiễm bảo vệ ở gia cầm đích.

Do đó, trong một phương án được ưu tiên, vaccin được sản xuất theo ứng dụng hoặc phương pháp theo sáng chế bao gồm chất ổn định.

Chất ổn định là các hợp chất làm ổn định số lượng và chất lượng của vectơ HVT theo sáng chế trong quá trình bảo quản, xử lý, và tiêm chủng, như bằng cách tiêm hoặc tiêu hóa. Thông thường, đây là các phân tử lớn có khối lượng phân tử lớn, như chất béo, hydrat cacbon, hoặc protein; ví dụ bột sữa, gelatin, albumin trong huyết thanh, sorbitol, trehaloza, spermidin, dextran hoặc polyvinyl pyrrolidon.

Các chất bảo quản cũng có thể được bổ sung, như thimerosal, merthiolat, hợp chất phenolic, hoặc gentamicin.

Trong một phương án được ưu tiên, hợp chất được sử dụng để sản xuất chế phẩm vaccin theo sáng chế là không có huyết thanh (tức là không có huyết thanh của động vật); không có protein (không có protein động vật, nhưng có thể chứa thành phần khác có nguồn gốc động vật); không chứa hợp chất từ động vật (ACF; không chứa thành phần bất kỳ thu được từ động vật); hoặc thậm chí “được xác định về mặt hóa học”, theo thứ tự ưu tiên.

Một điều hiển nhiên là việc trộn hợp chất khác, như chất mang, chất pha loãng, nhũ tương, và các chất tương tự vào vaccin theo sáng chế cũng nằm trong phạm vi của sáng chế. Các chất phụ gia này được mô tả trong các sổ tay thông dụng như: “Remington”, và “Veterinary Vaccinology” (đều được đề cập trên đây).

Vì lý do ổn định hoặc kinh tế, vaccin theo sáng chế có thể được sản xuất ở dạng đông khô. Thông thường điều này có thể cho phép bảo quản lâu dài ở nhiệt độ trên

0°C, ví dụ ở 4°C. Các quy trình làm đông khô đã biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, và thiết bị để làm đông khô ở các quy mô khác nhau có bán trên thị trường.

Do đó, theo một phương án được ưu tiên, vacxin được sản xuất theo ứng dụng hoặc phương pháp theo sáng chế là ở dạng đông khô.

Để hoàn nguyên chế phẩm vacxin đông khô, nó thường được tạo huyền phù trong chất pha loãng chấp nhận được về mặt sinh lý. Chất pha loãng này có thể, ví dụ, đơn giản là nước vô trùng, hoặc dung dịch muối sinh lý, ví dụ muối đệm phosphat (PBS); theo cách khác chất pha loãng có thể chứa hợp chất bổ trợ, như tocopherol, như được mô tả trong EP 382,271. Ở dạng phức tạp hơn, vacxin đông khô có thể được tạo huyền phù trong nhũ tương ví dụ như được mô tả trong EP 1,140,152.

Như đã mô tả, vacxin theo sáng chế thuận lợi có thể được sử dụng thuận lợi cho gia cầm bằng phương pháp chủng ngừa như phun, tiêm chủng hoặc dùng trong trứng.

Do đó, theo một khía cạnh khác sáng chế đề cập đến phương pháp chủng ngừa gia cầm kháng cúm gia cầm, bao gồm bước tiêm chủng gia cầm này bằng vacxin theo sáng chế.

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết bằng các ví dụ không giới hạn sau đây.

Ví dụ thực hiện sáng chế

1. Kết cấu của cấu trúc vectơ

1.1. HVP142

Các virut vectơ HVT của HVP142 mang đột biến gắn chèn khác loại là, gen H5 IV, được điều khiển bằng trình tự khởi động RSV LTR. Catxet chuyển nhiễm được gắn chèn vào locut Us10 của HVT chủng PB1, bằng cách sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng. Gen H5 thu được từ thể phân lập H5N2 AIV từ năm 1998.

Phương pháp chuyển nhiễm, tái tổ hợp, chọn lọc và khuếch đại chủ yếu như được mô tả trong Sondermeijer et al., 2003 (supra), và EP 431,668.

Kháng huyết thanh được sử dụng để chọn lọc mảng biểu hiện HA là kháng huyết thanh gà con đa dòng kháng chủng AIV typ H5N6.

1.2. HVP310

Virut vector HVP310 bao gồm gen H5 được tối ưu hóa codon (SEQ ID NO: 3), mà được điều khiển bằng trình tự khởi động gen PRV gB được kéo dài xuôi dòng với codon khởi đầu ATG của gen gB (SEQ ID NO: 2). Cấu trúc khác loại được gắn chèn vào locut Us2 của bộ gen HVT của chủng FC126, bằng cách sử dụng kỹ thuật tái tạo tạo dòng cosmid. Toàn bộ cấu trúc biểu hiện là như được thể hiện trong SEQ ID NO: 7.

Gen H5 có nguồn gốc từ thể phân lập HP H5N1 thu được từ giống mèo châu Á (Asian cat) từ 2005. Gen này được sửa đổi bằng cách tối ưu hóa codon để biểu hiện trong hệ vector biểu hiện của virut.

Phương pháp chuyển nhiễm, tái tổ hợp, chọn lọc và khuếch đại chủ yếu như được mô tả trong US 5,961,982. Các tế bào CEF đã chuyển nhiễm sau khi tái tổ hợp được gieo vào đĩa nuôi cấy mô 10cm; sau khoảng 1 tuần các mảng có thể nhìn thấy một cách rõ ràng. Các mảng được nhuộm tương phản với màu xanh Evans, và mảng có thể được lấy ra trực tiếp từ các đĩa. ADN từ virut vector HVT tái tổ hợp thường được kiểm tra về độ chính xác của việc tái tổ hợp và gắn chèn của gen HA và trình tự khởi động bằng cách phân tích enzym giới hạn.

Sự biểu hiện của gen HA được kết hợp được thực hiện bằng thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang trong các đĩa vi chuẩn độ, bằng cách sử dụng kháng huyết thanh đa dòng H5N6 ở gà con.

1.3. HVP311

Virut vector HVP311 bao gồm gen H5 được tối ưu hóa codon, được điều khiển bằng trình tự khởi động gen EHV gB (SEQ ID NO: 1). Việc tạo cấu trúc, tái tổ hợp, và chọn lọc là tương tự như đối với virut HVP310. Ngoài ra, cùng một đột biến gắn chèn gen H5 HA được tối ưu hóa codon được sử dụng.

1.4. Thử nghiệm độ ổn định *in vitro*

Để xác định tính ổn định *in vitro*, virut vector HVT tái tổ hợp HVP142, 310 và 311 được cấy chuyển qua ít nhất là 15 lần trên các lớp đơn CEF. Sau khi một mảng được lấy ra, mảng tan này được khuếch đại 15 chu trình.

Cuối cùng, các đĩa 10 cm được chủng và sau khi ủ, được nhuộm với kháng huyết thanh H5N6 của gà con để thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang (IFT). Số lượng

mảng thể hiện miễn dịch huỳnh quang dương tính trên mỗi tổng số mảng được đếm. Tất cả các thể tái tổ hợp đã thử nghiệm được phát hiện là ổn định hoàn toàn trong môi trường nuôi cấy *in vitro* vì 100% mảng thể hiện sự phát huỳnh quang dương tính. Điều này có nghĩa là thứ nhất, đột biến gắn chèn HA đã được sao chép chính xác qua hơn 15 lần cấy chuyển nuôi cấy tế bào, và thứ hai, gen HA vẫn còn nguyên vẹn và được biểu hiện một cách chính xác.

2. Thử nghiệm động vật trên gà con SPF

2.1. Thiết lập thử nghiệm trên động vật

Thử nghiệm trên động vật được thiết lập để xác định hiệu quả của thể tái tổ hợp HVT+HA sau khi tiêm chủng trên gà giò một ngày tuổi không mang yếu tố gây bệnh cụ thể (SPF). Hiệu quả bảo vệ được đánh giá bằng cách gây nhiễm bằng virus HPAI H5N1 vào hai hoặc ba tuần sau tiêm chủng (sau khi tiêm chủng). Gà được quan sát hàng ngày về sự xuất hiện của các dấu hiệu lâm sàng của sự nhiễm cúm gia cầm hoặc chết. Ngoài ra, gạc dùng thấm dịch khí quản và chất thải ở lỗ huyết được thu gom để đánh giá sự bài tiết virus gây nhiễm bằng PCR.

Nhóm gồm 10 gà giò SPF được đặt vào thiết bị cách ly áp suất âm trong các thiết bị cách ly cao của viện thú y trung tâm (Lelystad, NL). Các mẫu máu được lấy hàng tuần trong quá trình thử nghiệm.

Vaccin được thử nghiệm là các virus vector HVT tái tổ hợp HVP142, 310, và 311, so với vaccin bất hoạt dạng nhũ tương thông thường của typ H5, và nhóm được tiêm chủng giả chỉ nhận PBS. Vaccin HVT tái tổ hợp được bào chế thành chế phẩm liên kết với tế bào ở nồng độ khoảng 5×10^5 pfu/ml, mà được lưu giữ trong nitơ lỏng cho đến khi sử dụng.

Gà con được nhốt, được đánh dấu riêng, và được tiêm chủng; HVT được tiêm trong cơ, với 0,2ml/liều lượng ở lượng 2000 pfu/một gà con.

Sau hai hoặc ba tuần, gà con được gây nhiễm bằng virus gây nhiễm HP AIV H5N1 với lượng $10^{6,0}$ EID50 cho mỗi gà con (H5N1 Turkey/Turkey/01/05 Clade 2.2), với 0,1ml qua đường mũi và 0,1ml qua đường nội khí quản.

Sau khi gây nhiễm, gà con được quan sát hàng ngày về các dấu hiệu của AI. Các điểm số lâm sàng được chấm trong khoảng từ 0 - 3 (không có gì nghiêm trọng)

cho các triệu chứng AI điển hình như suy nhược, xuất tiết miệng-mũi, suy hô hấp, các dấu hiệu thần kinh, tiêu chảy, v.v.. Gà con bị ốm nặng được gây chết không đau. Gà con chết được xét nghiệm bằng mô bệnh học về nguyên nhân gây chết.

Các mẫu huyết thanh từ trước khi gây nhiễm và từ 14 ngày sau khi gây nhiễm được xác định bằng thử nghiệm ức chế ngưng kết hồng cầu (HI) bằng cách sử dụng chủ yếu là virus gây nhiễm typ HPAI H5.

Để đánh giá sự lây lan virus gây nhiễm, dịch khí quản và chất thải ở lỗ huyết của mỗi con gà được thấm vào tấm bông/gạc vào ngày 2, 3, 4, 7 và 14 sau khi gây nhiễm. Gạc được xét nghiệm riêng bằng Q-PCR trên gen AIV Matrix protein, để so sánh xem có hay không, và có bao nhiêu (giá trị Ct) virus gây nhiễm được thải ra từ gà con được tiêm chủng và gà con đối chứng.

2.2. Kết quả

Kết quả của các thử nghiệm ở gà con SPF được thể hiện trong các bảng 1 - 3.

Liên quan đến “việc bảo vệ khỏi các dấu hiệu lâm sàng”, như được thể hiện trong bảng 2, chỉ có các động vật không thể hiện bất kỳ dấu hiệu lâm sàng nào của AI mới được tính điểm là đã được bảo vệ.

Trong bảng 3 “dương tính khi tái phân lập virus” cho thấy từ động vật này có thể tái phân lập được virus; chỉ trong trường hợp động vật dương tính trong hai ngày liên tục mới được liệt kê là dương tính với tái phân lập virus. Vì không có mẫu gạc nào của lỗ huyết là dương tính, chỉ có kết quả từ gạc thấm dịch khí quản được thể hiện.

Bảng 1: Hiệu giá HI trước gây nhiễm, ở gà con SPF được tiêm chủng trong cơ ở các ngày tuổi

Vaccin	Số động vật	HI (log ₂ , HP H5N1)	
		Gây nhiễm ở 2 tuần sau khi tiêm	Gây nhiễm ở 3 tuần sau khi tiêm
HVP 142	20	<4	<4
HVP 310	20	5,9	8,6
HVP 311	20	4,2	8,1
H5 bất hoạt	20	<4*>	<4*>
Chất pha loãng	10	<4	<4

*) Khi được thử nghiệm trong thử nghiệm HI với kháng nguyên typ H5 khác, có bằng chứng rõ ràng về sự chuyển hóa huyết thanh, với hiệu giá HI bằng 6,7 và 8,6, lần lượt ở 2 và 3 tuần sau khi tiêm.

Bảng 2: Bảo vệ kháng các dấu hiệu lâm sàng của AI, ở gà con SPF được tiêm chủng trong cơ ở các ngày tuổi, sau khi gây nhiễm tử vong (<48 giờ) bằng HP AIV H5N1

Vaccin	Số động vật	Bảo vệ kháng lại các dấu hiệu lâm sàng	
		Gây nhiễm ở 2 tuần sau khi tiêm	Gây nhiễm ở 3 tuần sau khi tiêm
HVP 142	20	0/10	1/10
HVP 310	19	10/10	9/9
HVP 311	20	10/10	10/10
H5 bất hoạt	20	3/10	8/10
Chất pha loãng	10	0/5	0/5

Bảng 3: Bảo vệ kháng tái phân lập virus, ở gà con SPF được tiêm chủng trong cơ ở các ngày tuổi, sau khi gây nhiễm tử vong (<48 giờ) bằng HP AIV H5N1

Vaccin	Số động vật	Dương tính khi tái phân lập virus (khí quản)	
		Gây nhiễm ở 2 tuần sau khi tiêm	Gây nhiễm ở 3 tuần sau khi tiêm
HVP 142	20	10/10	10/10
HVP 310	20	6/10	1/10
HVP 311	20	6/10	2/10
H5 bất hoạt	20	10/10	10/10
Chất pha loãng*)	0	-	-

*) Động vật trong nhóm chất pha loãng không thể được thẩm dịch vào gạc do tất cả đã chết trong vòng 48 giờ sau khi gây nhiễm.

3. Thử nghiệm động vật ở gà con MDA+

3.1. Thiết lập thử nghiệm động vật

Việc bố trí thử nghiệm động vật ở gà giò con MDA+ là hầu như giống với thử nghiệm gà con SPF, ngoại trừ việc không bao gồm vaccin vectơ HVP142. Gà giò con MDA+ thu được từ bố mẹ đã được tiêm chủng hai lần bằng vaccin H5N2 dạng nhũ tương bất hoạt thông thường; gà con bắt đầu các hiệu giá H5 HI nằm trong khoảng từ 5 đến 6.

3.2. Kết quả

Kết quả của các thử nghiệm trên gà con MDA+ được thể hiện trong các bảng 4 đến 6.

Đối với các bảng 5 và 6, các lưu ý áp dụng tương tự như cho các bảng 2 và 3 nêu trên.

Bảng 4: Hiệu giá HI vào các ngày gây nhiễm, ở gà con MDA+ được tiêm trong cơ ở các ngày tuổi

Vaxxin	Số động vật	HI (log ₂ , HP H5N1)	
		Gây nhiễm ở 2 tuần sau khi tiêm	Gây nhiễm ở 3 tuần sau khi tiêm
HVP 310	20	<4	5,4
HVP 311	20	<4	4,4
H5 bất hoạt	20	<4	<4
Chất pha loãng	10	<4	<4

Bảng 5: Bảo vệ kháng các dấu hiệu lâm sàng của AI, ở gà con MDA+ được tiêm chủng trong cơ ở ngày tuổi, sau khi gây nhiễm tử vong (<120 giờ) bằng HP AIV H5N1

Vaxxin	Số động vật	Bảo vệ kháng lại các dấu hiệu lâm sàng	
		Gây nhiễm ở 2 tuần sau khi tiêm	Gây nhiễm ở 3 tuần sau khi tiêm
HVP 310	20	1/10	9/10
HVP 311	19	0/10	4/9
H5 bất hoạt	18	0/9	0/9
Chất pha loãng	20	0/10	0/10

Bảng 6: Bảo vệ kháng tái phân lập virus, ở gà con MDA+ được tiêm chủng trong cơ ở các ngày tuổi, sau khi gây nhiễm tử vong (<120 giờ) bằng HP AIV H5N1

Vaxxin	Số động vật	Dương tính ở các thể tái phân lập virus (quản bào)	
		Gây nhiễm ở 2 tuần sau khi tiêm	Gây nhiễm ở 3 tuần sau khi tiêm
HVP 310	20	10/10	7/10
HVP 311	19	10/10	9/9
H5 bất hoạt	18	9/9	9/9
Chất pha loãng	20	10/10	10/10

3.3. Định lượng bằng Q-PCR

Trong thử nghiệm động vật trong đó gà con MDA+ được gây nhiễm, các mẫu tái phân lập virus thu được bằng cách lấy dịch khí quản vào ngày 2 và 3 sau gây nhiễm. Sau đó, các axit nucleic được tách chiết, và thử nghiệm RT-PCR thời gian thực được tiến hành như đã mô tả bởi Maas et al. (2007, *Emerging Infectious Diseases*, vol. 13, p. 1219-1221). Các giá trị ngưỡng (Ct) được thể hiện ở số lượng bản sao tương đối và được so sánh với giá trị được xác định ở chim không được tiêm chủng (đối chứng) hoặc được tiêm chủng bằng vaccin dạng nhũ tương. Số lượng bản sao tương ứng với giá trị Ct thấp nhất trong nhóm này được thiết lập một cách tùy ý bằng 1000.

Fig. 1 thể hiện kết quả: sự suy giảm sao chép của virus gây nhiễm là khoảng 250 lần so với chủng HVP310.

4. Kết luận kết quả thử nghiệm động vật

4.1. Tổng quát:

HVP142 thiếu tính hiệu quả trong thử nghiệm SPF và không được bao gồm trong thử nghiệm MDA+.

Virus vector HVP310 và 311 sao chép tốt, trong cả gà con SPF và MDA+, cho thấy thành phần ổn định, có khả năng sống của chúng. Sự biểu hiện của gen HA được gắn chèn là ổn định và hiệu quả tương đương, như đã được chứng minh bằng đáp ứng miễn dịch hiệu quả cao được tạo ra.

Việc gây nhiễm đã sử dụng là cực kỳ nặng, vì tất cả các đối chứng và nhiều đối tượng được tiêm chủng bằng vaccin dạng nhũ tương thông thường đã chết. Tuy nhiên, điều này cho phép vaccin vector HVT+HA chứng tỏ được khả năng bảo vệ của chúng trong điều kiện nghiêm ngặt nhất.

4.2. Thử nghiệm SPF

Tác dụng bảo vệ lâm sàng được gây ra ở gà con SPF rất ấn tượng: gà con SPF được tiêm chủng bằng HVP310 và 311 được bảo vệ hoàn toàn kháng lại bất kỳ và tất cả các dấu hiệu lâm sàng của AI, đã xuất hiện ở 2 tuần sau tiêm chủng, ngược lại vaccin dạng nhũ tương chỉ tạo ra hiệu quả bảo vệ một phần, và gà con không được tiêm chủng đã chết trong vòng 48 giờ.

Gà con SPF cũng được bảo vệ hầu như hoàn toàn khỏi sự lây lan của virus gây

nhiễm, như được chứng tỏ bằng kết quả tái phân lập virus; sự giảm phân lập virus đến 80% và 90% đạt được tương ứng cho HVP 311 và 310, trong khi vaccin dạng nhũ tương không có tác dụng làm giảm sự lây lan virus.

Vì thế tính hiệu quả của các vector HVP310 và 311 ở gà con SPF chỉ khác biệt rất nhỏ.

4.3. Thử nghiệm MDA+

- Tác dụng bảo vệ gà con MDA+ khỏi các dấu hiệu lâm sàng của AI sau khi gây nhiễm ở 3 tuần sau khi tiêm chủng là tốt hơn nhiều so với ở 2 tuần sau khi tiêm chủng. HVP310 có thể bảo vệ 90% gà con MDA+ khỏi việc biểu hiện các dấu hiệu lâm sàng bất kỳ; HVP311 chỉ đạt được tác dụng bảo vệ 45%, trong khi đó vaccin dạng nhũ tương không có hiệu quả bảo vệ. Tất cả gà con MDA+ không được tiêm chủng đều chết trong thời gian 120 giờ.

Trong các điều kiện nghiêm ngặt của thử nghiệm, vaccin vector HVP310 vẫn có thể làm giảm sự lây lan virus ở gà con MDA+ xuống 30 % ở 3 tuần sau tiêm chủng, trong khi vaccin HVP311 hoặc vaccin dạng nhũ tương không có tác dụng làm giảm sự lây lan virus.

Tác dụng làm giảm sự thải virus được gây ra bởi vaccin vector HVP310, so với các con chim được tiêm chủng dạng nhũ tương, và được tiêm chủng chất đối chứng, là hệ số 250 vào ngày thứ 2 sau gây nhiễm.

5. Thử nghiệm tính ổn định của virus vaccin được tái phân lập

Vaccin vector HVP310 và HVP311 sẽ được tái phân lập từ gà con vào 2 và 3 tuần sau khi tiêm chủng. Virus sẽ được gieo trong các đĩa CEF 10cm, và được để lây nhiễm. Vào ngày 5 đến 7, màng sẽ được nhuộm bằng IFT với kháng huyết thanh H5N6 của gà con, như đã mô tả. Số lượng của màng -so với-số lượng của màng dương tính với huỳnh quang cho thấy có phải tất cả các virus có chứa và biểu hiện gen HA được gắn chèn hay không.

6. Độ an toàn khi sử dụng để tiêm chủng trong trứng

Để thử nghiệm độ an toàn để sử dụng trong trứng vaccin vector HVT HVP310 và 311, vaccin này sẽ được sử dụng trong trứng.

Ba ngày trước khi bắt đầu thử nghiệm ($t = -3$ ngày) ba nhóm, mỗi nhóm gồm 40

trứng gà có phôi 18 ngày tuổi sẽ được tiêm chủng bằng vaccin vector HVP310 và 311, như sau:

Trước khi tiêm chủng trứng sẽ được soi. Đầu to của trứng có phôi 18 ngày tuổi sẽ được trừ trùng bằng etanol 70%. Một lỗ sẽ được khoan vào trong vỏ trứng bằng cách sử dụng thiết bị khoan trứng. Trứng sẽ được tiêm chủng bằng cách chèn kim (Becton & Dickinson Plastipak® xilanh 1ml và Microlance® 23G, kim tiêm 0,6x25) theo hướng thẳng đứng vào trong trứng và tiêm 0,05ml vaccin. Tiếp đó, các lỗ sẽ được bịt kín bằng keo và trứng được đặt vào lò ấp, dưới các điều kiện thích hợp.

Tiếp theo, trứng sẽ nở trong ba lò ấp trong thiết bị cho động vật. Sau khi nở, 25 con gà mỗi nhóm sẽ được đánh dấu và được đặt vào các nhóm từ 1 đến 3 (t=1 ngày), và được nhốt trong trong ba thiết bị cách ly tương ứng, và được quan sát thêm một tuần nữa.

Các số liệu kết quả và sức khỏe của gà con đã nở sẽ được theo dõi để xác định có tác động bất kỳ lên khả năng nở hoặc sức khỏe xảy ra do việc tiêm chủng trong trứng của vaccin vector HVT HVP310 và 311 hay không.

7. Sự khác biệt về đặc tính của các trình tự khởi động gen gB thu được từ virus ecpet gia cầm hoặc từ động vật có vú, khi được sử dụng trong vector HVT

Khi các trình tự khởi động khác nhau được thử nghiệm về khả năng thích hợp của chúng để điều khiển sự biểu hiện của gen khác loại trong virus vector HVT, trình tự khởi động gen gB từ MDV1 đã được xác định là không hiệu quả ở HVT. Mặc khác, trình tự khởi động gen gB từ virus ecpet ngựa (EHV) là có hiệu lực ở HVT.

Các cấu trúc được sử dụng cho mục đích này lắp ráp chủ yếu như được mô tả trong ví dụ 1, và chứa một gen từ ký sinh trùng *Eimeria tenella*, gen Etsc2. Gen này mã hóa kháng nguyên có kích thước 37kDa, là thể tương đồng của kháng nguyên Easc2 từ *Eimeria acervulina* mà được mô tả ví dụ trong EP 775.746. Cấu trúc vector chuyển được tạo ra để chứa gen Etsc2 dưới sự kiểm soát của trình tự khởi động gen gB từ EHV1 (trong cấu trúc vector chuyển pVEC102), hoặc từ MDV1 (cấu trúc pVEC103).

Các HVT tái tổ hợp được tạo ra bằng cách chuyển nhiễm và tái tổ hợp tương đồng, và được gieo lên các lớp đơn CEF như đã mô tả. Màng HVT tái tổ hợp được lấy

ra, và chúng được thử nghiệm về sự biểu hiện của kháng nguyên Etsc2, bằng thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang trên các đĩa 96 giếng với các lớp đơn tế bào CEF. Từ cả hai cấu trúc hai mảng được thử nghiệm, và mỗi mảng được thử nghiệm hai lần. Kháng huyết thanh kháng Etsc2 của thỏ được sử dụng làm kháng thể sơ cấp, sau đó là kháng thể thứ cấp được liên hợp FITC. Bước sàng lọc ban đầu thể hiện sự phát huỳnh quang dương tính yếu đối với vectơ tái tổ hợp pVEC102, nhưng không có sự phát huỳnh quang từ vectơ tái tổ hợp pVEC103.

Tiếp theo, tất cả 4 mảng được khuếch đại, và IFA được lặp lại. Lần này tất cả các mảng từ pVEC102 (sử dụng trình tự khởi động gen EHV gB) đều là dương tính rõ ràng với sự biểu hiện kháng nguyên Etsc2; tuy nhiên, các mảng tái tổ hợp pVEC103 vẫn âm tính với sự biểu hiện kháng nguyên Etsc2, mặc dù mảng HVT có thể nhìn thấy một cách rõ ràng.

Kết luận rằng trình tự khởi động gen MDV1 gB không hữu hiệu trong virus vectơ HVT tái tổ hợp, trong khi trình tự khởi động gen EHV gB thì có.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Vector virus ecpet ở gà tây (HVT) bao gồm axit nucleic khác loại mà chứa trình tự nucleotit mã hóa protein haemagglutinin (HA) của virus cúm gia cầm (AIV), khác biệt ở chỗ trình tự nucleotit này được liên kết chức năng với trình tự khởi động của gen glycoprotein B (gB) từ virus ecpet của động vật có vú.
2. Vector HVT theo điểm 1, khác biệt ở chỗ, trình tự khởi động gen gB từ virus ecpet của động vật có vú chứa trình tự nucleotit từ vùng được dịch mã của gen gB này, trong đó trình tự nucleotit ATG bất kỳ đã được thay đổi.
3. Vector HVT theo điểm 2, khác biệt ở chỗ, trình tự khởi động gen gB từ virus ecpet của động vật có vú có trình tự nucleotit như trong SEQ ID NO: 2.
4. Vector HVT theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, khác biệt ở chỗ, trình tự nucleotit mã hóa protein AIV HA thu được từ AIV có khả năng gây bệnh cao.
5. Vector HVT theo điểm 4, khác biệt ở chỗ, trình tự nucleotit có khả năng mã hóa protein AIV HA, mã hóa protein AIV HA có độ tương đồng trình tự axit amin ít nhất là 90% với trình tự axit amin như trong SEQ ID NO: 4 hoặc 6.
6. Vector HVT theo điểm 4 hoặc 5, khác biệt ở chỗ, trình tự nucleotit mã hóa protein AIV HA có trình tự nucleotit có độ tương đồng trình tự nucleotit ít nhất là 90% với trình tự nucleotit như trong SEQ ID NO: 3 hoặc 5.
7. Phương pháp bào chế vector HVT theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, bao gồm bước kết hợp vào trong bộ gen của HVT axit nucleic khác loại chứa trình tự nucleotit có khả năng mã hóa protein AIV HA, trong đó trình tự nucleotit này được liên kết chức năng với trình tự khởi động gen gB từ virus ecpet của động vật có vú.
8. Vaccine kháng cúm gia cầm ở gia cầm, chứa vector HVT theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, hoặc thu được bằng phương pháp theo điểm 7, và chất mang được dùng.
9. Vaccine theo điểm 8, khác biệt ở chỗ, vaccine này có thể được sử dụng trong trứng.
10. Phương pháp bào chế vaccine theo các điểm 8 hoặc 9, trong đó phương pháp này bao gồm bước trộn vector HVT theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, hoặc thu được bằng phương pháp theo điểm 7, với chất mang được dùng.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Intervet

<120> Vectơ virus ecpet ở gà tây, vacxin chứa vectơ này và phương pháp bào chế vacxin này

<130> 2010-025-EP-PD

<160> 7

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 723

<212> ADN

<213> Virus ecpet equine 1

<400> 1

ggcgactgcg gatgcttcgc agcgagggcg catgtacgcg gagcgtctgt caaagcgctc
60

catcgccagt ttggggcgct gcgtgcgcga acagcgaaga gaactagaaa aaaccctgag
120

agttaacgtg tatggcgaag tgctgctaca tacgtacgta tcgtcctaca acgggttttg
180

cgccagggcg gggttttgcg cggcggtgag tcgagcgggt accatcatag ataaccgctc
240

tagcacgtcc gcgttcgact cgcatacagtt catgaaggcg gcgctgcttc gccaccccat
300

tgaccagtcg ctcatgccgt ccataacaca caagtttttc gagctgatca acggggcccg
360

gtttgacaac gctggccaca actttgcgca gccgccaaac acggcattat attacagcgt
420

tgaaaacggt gggttgttac cgcatactcaa ggaggaacta gctcggttta tgattactgc
480

ggctaaagggt gattgggtcaa ttagcgagtt tcaaagggtt tattgctttg agggagtgac
540

aggtgtgacg gccacgcagc ggctggcgtg gaaatatatc ggggagctca tcctagccgc
600

cgcagtattc tcctcggttt tccactgtgg agaggtgcgc ctccctgcgcg cagatcgta
660

ctacccggac tccagcggcg cacagcgctg cgtgagcggc atttacataa cctacgaggc
720

gtc
723

<210> 2
<211> 674
<212> ADN
<213> Virut gây bệnh giả dại

<400> 2
cgctgctgca cacgtacgtg gcggtggccg ccgggttccg cgcacggcgc gcgttctgcg
60

aggccgccgc gcgcgcgggc accgtcgtgg acgagcgcca gacgggctgc ttcgacgcgc
120

acagcttcat gaaggccacg gtgcagcgcc acccgtgga cgccgcgctc ctcccggcgc
180

tcacgcacaa gttcttcgag ctcgtaacg ggccgctctt cgcgcacgac acgcacgcct
240

tcgcccagtc cccaacacg gcgctctact ttgcggtgga gaacgtgggc ctctgccgc
300

acctgaagga ggagctggcg cgcttcatgg tggcccgca ttggtgcgtc agtgagttcc
360

gcggcttcta ccgcttcag acggccggcg taaccgccac ccagcggcag gcctggcgat
420

atatccgcga gctggtgctg gcggttgca tcttcaggtc cgtcttccac tgcggggacg
480

tcgaggtcct ccgcgcggat cgcttcgccg gacgcgacgg gctgtacctg acctacgagg
540

cgtcttgccc gctggtggcg gtctttggcg cgggccccgc gggcatcggc ccgggcacca
600

cggcggtgct ggcctcggac gtctttggcc tgctccacac cacgctgctg ctgcgcgggg
660

cgccgtcgcg ctag
674

<210> 3
<211> 1707

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Gen HP AIV H5 HA được tối ưu hóa codon

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1704)

<400> 3

atg gag aag atc gtc ctc ctg ctg gct atc gtc tcc ctg gtc aag agc
48

Met Glu Lys Ile Val Leu Leu Leu Ala Ile Val Ser Leu Val Lys Ser
1 5 10 15
gac cag atc tgc atc ggc tac cac gcc aac aac tct acc gag cag gtg
96

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

gac acc atc atg gag aag aac gtg acc gtc act cac gcc cag gac atc
144

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

ctc gag aag act cac aac gga aag ctc tgc gac ctc gac ggc gtc aag
192

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

cct ctg atc ctg cgt gac tgc tcc gtg gct ggt tgg ctc ctg ggc aac
240

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

ccc atg tgc gac gag ttc ctc aac gtg ccc gag tgg tcc tac atc gtc
288

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

gag aag atc aac ccc gcc aac gac ctg tgc tac cct ggc aac ttc aac
336

Glu Lys Ile Asn Pro Ala Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asn Phe Asn
 100 105 110
 gac tac gag gag ctc aag cac ctg ctc tcc cgt atc aac cac ttc gag
 384
 Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu
 115 120 125
 aag atc cag atc atc ccc aag tcc tcc tgg tcc gac cac gag gct tct
 432
 Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys Ser Ser Trp Ser Asp His Glu Ala Ser
 130 135 140
 agc ggt gtg tcc agc gct tgc ccc tac cag ggc cgc tcc agc ttc ttc
 480
 Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Gln Gly Arg Ser Ser Phe Phe
 145 150 155 160
 cgc aac gtc gtg tgg ctg atc aag aag gac aac gct tac cca act atc
 528
 Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asp Asn Ala Tyr Pro Thr Ile
 165 170 175
 aag cgc agc tac aac aac act aac cag gag gac ctg ctg gtg ctg tgg
 576
 Lys Arg Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Gln Glu Asp Leu Leu Val Leu Trp
 180 185 190
 ggc atc cac cac cct aac gac gcc gct gag cag act cgt ctc tac cag
 624
 Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Arg Leu Tyr Gln
 195 200 205
 aac cct act agc tac atc tcc gtg gga acc tct acc ctg aac cag agg
 672
 Asn Pro Thr Ser Tyr Ile Ser Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg
 210 215 220
 ctg gtg ccc aag atc gct acc agg tcc aag gtc aac ggt cag tct ggt
 720
 Leu Val Pro Lys Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly
 225 230 235 240

agg atg gag ttc ttc tgg act atc ctg aag ccc aac gac gct atc aac
768

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

ttc gag tct aac ggt aac ttc atc gct cct gag aac gcc tac aag atc
816

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

gtc aag aag ggt gac tct act atc atg aag tct gag ctg gag tac ggt
864

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

aac tgc aac acc aag tgc cag acc cct atc ggt gcc atc aac tcc tct
912

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

atg cct ttc cac aac atc cac ccc ctg acc atc ggt gag tgc cct aag
960

Met Pro Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys
305 310 315 320

tac gtc aag tct aac cgt ctg gtc ctg gct act gga ctg cgt aac tct
1008

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

ccc cag ggt gag cgc cgt cgt aag aag agg ggc ctc ttc ggt gcc atc
1056

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

gct ggc ttc atc gag ggt gga tgg cag ggc atg gtg gac ggc tgg tac
1104

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

ggt tac cac cac agc aac gag cag ggc tcc ggt tac gct gcc gac aag
1152

Gly Tyr His His Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys
 370 375 380
 gag tct acc cag aag gct atc gac ggc gtc acc aac aag gtg aac tcc
 1200
 Glu Ser Thr Gln Lys Ala Ile Asp Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser
 385 390 395 400
 atc atc gac aag atg aac acc cag ttc gag gct gtg ggc agg gag ttc
 1248
 Ile Ile Asp Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe
 405 410 415
 aac aac ctg gag cgt cgt atc gag aac ctg aac aag aag atg gag gac
 1296
 Asn Asn Leu Glu Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp
 420 425 430
 ggt ttc ctg gac gtc tgg act tac aac gcc gag ctc ctg gtg ctg atg
 1344
 Gly Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met
 435 440 445
 gag aac gag cgc acc ctg gac ttc cac gac tcc aac gtg aag aac ctc
 1392
 Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu
 450 455 460
 tac gac aag gtc cgc ctc cag ctc cgc gac aac gct aag gag ctg ggt
 1440
 Tyr Asp Lys Val Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly
 465 470 475 480
 aac ggt tgc ttc gag ttc tac cac agg tgc gac aac gag tgc atg gag
 1488
 Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Arg Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu
 485 490 495
 tcc gtg cgt aac ggc acc tac gac tac ccc cag tac tcc gag gag gcc
 1536
 Ser Val Arg Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala
 500 505 510

cgt ctc aag agg gag gag atc tcc ggt gtg cgc ctg gag agc atc ggt
1584

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

act tac cag atc ctc tcc atc tac tcc acc gtc gcc agc tcc ctc gcc
1632

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

ctg gct atc atg gtg gct ggc ctc tcc ctg tgg atg tgc tcc aac ggc
1680

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

agc ctg cag tgc aag atc tgc atc taa
1707

Ser Leu Gln Cys Lys Ile Cys Ile
565

<210> 4

<211> 568

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Gln Cys Lys Ile Cys Ile
565

<210> 5

<211> 1683

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> gen HP AIV H7 HA được tối ưu hóa codon

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1680)

<400> 5

atg aac act cag atc ctg gta ttc gct ctg gtg gcg atc atc cca acc
48

Met Asn Thr Gln Ile Leu Val Phe Ala Leu Val Ala Ile Ile Pro Thr
1 5 10 15

aac gcc gac aag atc tgc ctg gga cac cac gcc gtc tcc aac gga act
96

Asn Ala Asp Lys Ile Cys Leu Gly His His Ala Val Ser Asn Gly Thr
20 25 30

aag gtc aac acc ttg act gag cgt ggc gtg gag gtg gtc aac gct act
144

Lys Val Asn Thr Leu Thr Glu Arg Gly Val Glu Val Val Asn Ala Thr
35 40 45

gag acc gtg gag cgc act aac gtc ccc cgt atc tgc tcc aaa ggt aag
192

Glu Thr Val Glu Arg Thr Asn Val Pro Arg Ile Cys Ser Lys Gly Lys
50 55 60

cgt acc gtg gac ctc ggt cag tgc ggc ctg ctg ggt act atc act ggc
240

Arg Thr Val Asp Leu Gly Gln Cys Gly Leu Leu Gly Thr Ile Thr Gly
65 70 75 80

ccc ccc cag tgc gac cag ttc ctg gag ttc tct gcc gac ctg atc atc
288

Pro Pro Gln Cys Asp Gln Phe Leu Glu Phe Ser Ala Asp Leu Ile Ile
85 90 95

gag cgt cgc gag ggt tcc gac gtc tgc tac cct ggc aag ttc gtg aac
336

Glu Arg Arg Glu Gly Ser Asp Val Cys Tyr Pro Gly Lys Phe Val Asn
100 105 110

gag gag gct ctg cgt cag atc ctc cgc gag tcc ggc ggt atc gac aag
384

Glu Glu Ala Leu Arg Gln Ile Leu Arg Glu Ser Gly Gly Ile Asp Lys
 115 120 125
 gag acc atg ggc ttc acc tac agc ggt atc cgc act aac ggc gcc acc
 432
 Glu Thr Met Gly Phe Thr Tyr Ser Gly Ile Arg Thr Asn Gly Ala Thr
 130 135 140
 tcc gct tgc cgc cgt tcc ggt tct tcc ttc tac gcc gag atg aag tgg
 480
 Ser Ala Cys Arg Arg Ser Gly Ser Ser Phe Tyr Ala Glu Met Lys Trp
 145 150 155 160
 ctc ctg tcc agc act gac aac gct gct ttc ccc cag atg act aag tcc
 528
 Leu Leu Ser Ser Thr Asp Asn Ala Ala Phe Pro Gln Met Thr Lys Ser
 165 170 175
 tac aag aac acc cgc aag gac cct gct ctg atc atc tgg ggc atc cac
 576
 Tyr Lys Asn Thr Arg Lys Asp Pro Ala Leu Ile Ile Trp Gly Ile His
 180 185 190
 cac tcc ggt tcc acc act gag cag acc aag ctg tac ggc tcc ggt aac
 624
 His Ser Gly Ser Thr Thr Glu Gln Thr Lys Leu Tyr Gly Ser Gly Asn
 195 200 205
 aag ctc atc acc gtc ggc tct tct aac tac cag cag tcc ttc atc ccc
 672
 Lys Leu Ile Thr Val Gly Ser Ser Asn Tyr Gln Gln Ser Phe Ile Pro
 210 215 220
 tct ccc ggt gcc cgc cct cag gtg aac ggc cag tct ggc cgc atc gac
 720
 Ser Pro Gly Ala Arg Pro Gln Val Asn Gly Gln Ser Gly Arg Ile Asp
 225 230 235 240
 ttc cac tgg ctg atc ctg aac ccc aac gac act atc act ttc tcc ttc
 768
 Phe His Trp Leu Ile Leu Asn Pro Asn Asp Thr Ile Thr Phe Ser Phe
 245 250 255

aac ggt gcc ttc atc gct cct gac cgt gct agc ttc ctg cgt ggc aag
816

Asn Gly Ala Phe Ile Ala Pro Asp Arg Ala Ser Phe Leu Arg Gly Lys
260 265 270

tct atg ggt atc cag tcc ggt gtc cag gtg gac gcc aac tgc gag ggt
864

Ser Met Gly Ile Gln Ser Gly Val Gln Val Asp Ala Asn Cys Glu Gly
275 280 285

gac tgc tac cac tct ggc ggt acc atc atc agc aac ctg ccc ttc cag
912

Asp Cys Tyr His Ser Gly Gly Thr Ile Ile Ser Asn Leu Pro Phe Gln
290 295 300

aac atc aac agc cgc gcc gtc ggc aag tgc cct cgc tac gtc aag cag
960

Asn Ile Asn Ser Arg Ala Val Gly Lys Cys Pro Arg Tyr Val Lys Gln
305 310 315 320

gag tcc ctg atg ctg gct act ggt atg aag aac gtg ccc gag atc cct
1008

Glu Ser Leu Met Leu Ala Thr Gly Met Lys Asn Val Pro Glu Ile Pro
325 330 335

aag ggc cgt ggc ctg ttc ggc gct atc gcc ggt ttc atc gag aac ggt
1056

Lys Gly Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Asn Gly
340 345 350

tgg gag ggt ctg atc gac ggc tgg tac ggc ttc agg cac cag aac gcc
1104

Trp Glu Gly Leu Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Phe Arg His Gln Asn Ala
355 360 365

cag ggt gag ggc act gct gct gac tac aag agc acc cag tcc gcc atc
1152

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

gac cag atc acc ggt aag ctg aac cgt ctc atc gag aag act aac cag
1200

Asp Gln Ile Thr Gly Lys Leu Asn Arg Leu Ile Glu Lys Thr Asn Gln
 385 390 395 400
 cag ttc gag ctc atc gac aac gag ttc act gag gtc gag aag cag atc
 1248
 Gln Phe Glu Leu Ile Asp Asn Glu Phe Thr Glu Val Glu Lys Gln Ile
 405 410 415
 ggc aac gtg atc aac tgg acc agg gac tcc atg act gag gtg tgg tcc
 1296
 Gly Asn Val Ile Asn Trp Thr Arg Asp Ser Met Thr Glu Val Trp Ser
 420 425 430
 tac aac gct gag ctc ctc gtc gcc atg gag aac cag cac acc atc gac
 1344
 Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Ala Met Glu Asn Gln His Thr Ile Asp
 435 440 445
 ctg gct gac tcc gag atg aac aag ctc tac gag cgt gtg agg agg cag
 1392
 Leu Ala Asp Ser Glu Met Asn Lys Leu Tyr Glu Arg Val Arg Arg Gln
 450 455 460
 ctg cgc gag aac gct gag gag gac ggt act ggt tgc ttc gag atc ttc
 1440
 Leu Arg Glu Asn Ala Glu Glu Asp Gly Thr Gly Cys Phe Glu Ile Phe
 465 470 475 480
 cac aag tgc gac gac gac tgc atg gcc tcc atc cgt aac aac acc tac
 1488
 His Lys Cys Asp Asp Asp Cys Met Ala Ser Ile Arg Asn Asn Thr Tyr
 485 490 495
 gac cac agc aag tac agg gag gag gcc atg cag aac agg atc cag atc
 1536
 Asp His Ser Lys Tyr Arg Glu Glu Ala Met Gln Asn Arg Ile Gln Ile
 500 505 510
 gac ccc gtc aag ctg agc agc ggc tac aag gac gtg atc ctg tgg ttc
 1584
 Asp Pro Val Lys Leu Ser Ser Gly Tyr Lys Asp Val Ile Leu Trp Phe
 515 520 525

22636

agc ttc ggc gct tcc tgc ttc atc ctc ctg gcc atc gcc atg ggc ctg
1632

Ser Phe Gly Ala Ser Cys Phe Ile Leu Leu Ala Ile Ala Met Gly Leu
530 535 540

gtc ttc atc tgc gtg aag aac ggt aac atg agg tgc act atc tgc atc
1680

Val Phe Ile Cys Val Lys Asn Gly Asn Met Arg Cys Thr Ile Cys Ile
545 550 555 560

taa
1683

<210> 6
<211> 560
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 6

Met Asn Thr Gln Ile Leu Val Phe Ala Leu Val Ala Ile Ile Pro Thr
1 5 10 15

Asn Ala Asp Lys Ile Cys Leu Gly His His Ala Val Ser Asn Gly Thr
20 25 30

Lys Val Asn Thr Leu Thr Glu Arg Gly Val Glu Val Val Asn Ala Thr
35 40 45

Glu Thr Val Glu Arg Thr Asn Val Pro Arg Ile Cys Ser Lys Gly Lys
50 55 60

Arg Thr Val Asp Leu Gly Gln Cys Gly Leu Leu Gly Thr Ile Thr Gly
65 70 75 80

Pro Pro Gln Cys Asp Gln Phe Leu Glu Phe Ser Ala Asp Leu Ile Ile
85 90 95

Glu Arg Arg Glu Gly Ser Asp Val Cys Tyr Pro Gly Lys Phe Val Asn
100 105 110

Glu Glu Ala Leu Arg Gln Ile Leu Arg Glu Ser Gly Gly Ile Asp Lys
115 120 125

Glu	Thr	Met	Gly	Phe	Thr	Tyr	Ser	Gly	Ile	Arg	Thr	Asn	Gly	Ala	Thr	130	135	140	
Ser	Ala	Cys	Arg	Arg	Ser	Gly	Ser	Ser	Phe	Tyr	Ala	Glu	Met	Lys	Trp	145	150	155	160
Leu	Leu	Ser	Ser	Thr	Asp	Asn	Ala	Ala	Phe	Pro	Gln	Met	Thr	Lys	Ser	165	170	175	
Tyr	Lys	Asn	Thr	Arg	Lys	Asp	Pro	Ala	Leu	Ile	Ile	Trp	Gly	Ile	His	180	185	190	
His	Ser	Gly	Ser	Thr	Thr	Glu	Gln	Thr	Lys	Leu	Tyr	Gly	Ser	Gly	Asn	195	200	205	
Lys	Leu	Ile	Thr	Val	Gly	Ser	Ser	Asn	Tyr	Gln	Gln	Ser	Phe	Ile	Pro	210	215	220	
Ser	Pro	Gly	Ala	Arg	Pro	Gln	Val	Asn	Gly	Gln	Ser	Gly	Arg	Ile	Asp	225	230	235	240
Phe	His	Trp	Leu	Ile	Leu	Asn	Pro	Asn	Asp	Thr	Ile	Thr	Phe	Ser	Phe	245	250	255	
Asn	Gly	Ala	Phe	Ile	Ala	Pro	Asp	Arg	Ala	Ser	Phe	Leu	Arg	Gly	Lys	260	265	270	
Ser	Met	Gly	Ile	Gln	Ser	Gly	Val	Gln	Val	Asp	Ala	Asn	Cys	Glu	Gly	275	280	285	
Asp	Cys	Tyr	His	Ser	Gly	Gly	Thr	Ile	Ile	Ser	Asn	Leu	Pro	Phe	Gln	290	295	300	
Asn	Ile	Asn	Ser	Arg	Ala	Val	Gly	Lys	Cys	Pro	Arg	Tyr	Val	Lys	Gln	305	310	315	320
Glu	Ser	Leu	Met	Leu	Ala	Thr	Gly	Met	Lys	Asn	Val	Pro	Glu	Ile	Pro	325	330	335	
Lys	Gly	Arg	Gly	Leu	Phe	Gly	Ala	Ile	Ala	Gly	Phe	Ile	Glu	Asn	Gly	340	345	350	
Trp	Glu	Gly	Leu	Ile	Asp	Gly	Trp	Tyr	Gly	Phe	Arg	His	Gln	Asn	Ala	355	360	365	
Gln	Gly	Glu	Gly	Thr	Ala	Ala	Asp	Tyr	Lys	Ser	Thr	Gln	Ser	Ala	Ile	370	375	380	
Asp	Gln	Ile	Thr	Gly	Lys	Leu	Asn	Arg	Leu	Ile	Glu	Lys	Thr	Asn	Gln	385	390	395	400

Gln Phe Glu Leu Ile Asp Asn Glu Phe Thr Glu Val Glu Lys Gln Ile
 405 410 415
 Gly Asn Val Ile Asn Trp Thr Arg Asp Ser Met Thr Glu Val Trp Ser
 420 425 430
 Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Ala Met Glu Asn Gln His Thr Ile Asp
 435 440 445
 Leu Ala Asp Ser Glu Met Asn Lys Leu Tyr Glu Arg Val Arg Arg Gln
 450 455 460
 Leu Arg Glu Asn Ala Glu Glu Asp Gly Thr Gly Cys Phe Glu Ile Phe
 465 470 475 480
 His Lys Cys Asp Asp Asp Cys Met Ala Ser Ile Arg Asn Asn Thr Tyr
 485 490 495
 Asp His Ser Lys Tyr Arg Glu Glu Ala Met Gln Asn Arg Ile Gln Ile
 500 505 510
 Asp Pro Val Lys Leu Ser Ser Gly Tyr Lys Asp Val Ile Leu Trp Phe
 515 520 525
 Ser Phe Gly Ala Ser Cys Phe Ile Leu Leu Ala Ile Ala Met Gly Leu
 530 535 540
 Val Phe Ile Cys Val Lys Asn Gly Asn Met Arg Cys Thr Ile Cys Ile
 545 550 555 560

<210> 7
 <211> 9792
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HVP310 gắn xen EcoR-EcoR1

<220>
 <221> đặc tính misc
 <222> (1)..(3661)
 <223> Vùng Us2 ngược dòng HVT

<220>
 <221> đặc tính misc
 <222> (3683)..(4357)
 <223> Trình tự khởi động PRV gB, được kéo dài

<220>

<221> đặc tính misc

<222> (4361)..(6096)

<223> gen H5 HA được tối ưu hóa codon

<220>

<221> đặc tính misc

<222> (6139)..(9787)

<223> vùng dưới HVT Us2

<400> 7

gaattccaga ctaaagccc cggcccaatt tgtcaagtgt gcagtcacgg aggcgtcgac
60

cgtgtccccc gcattaaaca ggaaagcgtt aaagtttttg aatgttaggt cacaggtaca
120

aacataaatg tttgtacaaa caggtaacag gtacaaacat aaatgccccg gcataaatgt
180

cccttacggc ggatcgaaac gacattaggc atactcgggt accattttgc attccgatca
240

gcacggatga aattaggcag gaatgcggtt tatattatgc ggcattggac aaacgatatg
300

gcattgattg gcagtttatg aatgtcttca tgttgggcgt aaacggattc ctattggttc
360

agaagacaac gacgatatat ttagagagaa aaagctaccc agcataggat aaacacacat
420

tgagcattga gagacatagg tatcggatat gatgggaaaa ctacacacgt gaacaccaaa
480

cgacttatat actcgagcgg tgatactact gagcaagaat gcactgcac tgagccactg
540

aatgaagact gtgatgaaaa tgtgaccatc gatggaattg gagaagaata tgcgcagttc
600

ttcatgtccc cgcaatgggt cccaaatcta catcgcttga gcgaggatac caaaaaggta
660

taccgatgta tggtttccaa cagactcaat tattttccct attatgaggc gttcaggcgg
720

tctttgtttg atatgtatat gctaggtcgg ttggggcgtc gacttaagcg atctgactgg
780

gagactatta tgcattctgtc accaacgcaa agtcggcgctc tacatagaac ttttaagattt
840

gtggagcgta gaattatccc atctaacagt tatatacgca catcggggcca cgttccgcct
900

tcgagggcac ttccgacaga tacgaattta aagatggatg aataattaaa ttggaaagag
960

taactacatt aatcgagcgt catgacggcg tcccgtgaaa atgggaattt tctactcgaa
1020

acaccgtgac atttgacaga cctggaattg ttattctgat atatagtggg tgtgtctggc
1080

cggcaacata cataatgtgc atgcgaaacc actttttcag tgtacgctga cattgtgcaa
1140

cacggagggg tagcatctac atacaatata tgttgattaa tgattggaga aaaaactatg
1200

cagctcgccg atcatatggc taactcgcct tcgtctatat ggcggacccc gcgggaaaaa
1260

tcgacgtacc atctgattta caacaccagt aatgaacatg tcgcatccct gccagatct
1320

gtgcgcccac tggcgcggat cgttgtgaat gccgccgaaa cacttcaggt cggatatgaga
1380

gccgggaggc cgccatcagc aggagtttgg cgagaggtgt ttgatagaat gatgacagcc
1440

ttccgtgacc acgagcctac tgcgacattt aatgctgcaa atcccattag aaaaatggtc
1500

gagacagttc tacagaataa tgaagagccc ccgcgagcgc atgctgaaat gggtaatcgc
1560

cttatgaaca ttatgtactg gtgttgcttg ggacacgcag gacaatgctc gatatggcag
1620

ttgtacgaga cgaatcaggc cattttaagt ttattagatg aagtggttat cggcacaaca
1680

aatccctttt gcaccctcga gcaatactgg aagccattat gcaccgcaat cgccaacaag
1740

gggacctcat cgcttgttga ggatgccaaa gtggccgagt acctgggttag catgcgcaaa
1800

ttgatataac ataggcacgc tctgatgtta cagaccacaa taccgcatac atttattgta
1860

aggttgttaa taaaggttta ttctatgtaa gactacaata ctttcgacat tgcttgata
1920

catattaaat actttctcaa gttcctatta cataaaatgg gatctatcat tacattcggt
1980

aagagtctgg ataattttac tgtttgccag cttcgatctt ggaacgtact gtggatagtg
2040

ccttacttgg aatcgtgaaa atttgaaacg tccattatctt ggatatcttc cggttgctcc
2100

atatcccgcc ctggtaccgc tcggatacct tgcccgatg gattcgtatt gacagtcgcg
2160

caatcgggga ccaacaacgc gtgggtccac actcattcgg aaattttccg atgattctga
2220

atatttattg ccgctcgta cgagtcgttg gacatatctg taatacatctt cttcttctga
2280

aggatcgctg cacatttgat ctatacattg gccaggatgt tcaagtctca gatgttgc
2340

tctggcacag cacaacttta tggcatttcc gatgtaatcg tccggcagcc ctgggggagt
2400

tctatattcg catattggga tggtaaggac aatagcagat ctcgcaacct ccaggaggc
2460

tataataacg tttttaaggt atggatttct cataaaaatc tgtcgcaa
2520

atattcttta cttagcgcga ttgagagcat cgtcgtccaa ttttctaaat ggaaagaaa
2580

caaggcgggc aagagtgttc caaacatttt cattttcggc gaatctctca aatcccatgg
2640

cgtgcaattg attgcaaaat tggcacttcc gttcacgttt gtatctccaa actctaagac
2700

acttttaatt gaaaaactac gttctagtgt ggaaagaaac ctataggcag accatagaac
2760

tatttgacac cacatatctt tttgtatgtc aaactgacca tgatcgtatg ttgctgaatg
2820

cactagggca attcgctcgc ggcactccat acattgaata attccacacg tcagctcatc
2880

ggtttagcaag gtccagtagt tgaagtcatt tatttttccc cgcggtggc caaatctacc
2940

tctgggaata tccaagttgt cgaatatgat cgcaccggct ctggtcatgg tgaaggaact
3000

gtagcataaa gacgcaggta tcataggggt aatatttttt tattcactca cataactaaa
3060

gtaacgcata ttagcaccat gtatgggcta tcaattgaca tttgcgtagc actacatcac
3120

gattatgtac aacataatgg gacaacatat ggcaagtaga tgcaatttcc tcacactagt
3180

tgggtttatc tactattgaa ttttccccta tctgtgatac acttgggagc ctctacaagc
3240

atattgccat catgtacgtt tttatctact gtcttaacgc ccatgggaac ggaggcgtcg
3300

togtcatgta ttggacggca acataggcag caacacaaat tgcgtttagg tggggtgcat
3360

gtggactcga taccaagccc ctgcagctgg ggaacgtctg gtggagagcc gataatttga
3420

tatacgcacg ccatattact gtcggtgaag tacgccttat cttctatggt ttcaaattta
3480

ggttcccaag tggacgtgag aagtgtttgt atctcacatg gaatggccca aggcattcca
3540

gcccaggtgc ctggtacttt aatggcaaac aaacgttttg gtagaggat tgattctatt
3600

gcagttctgc agatatctgc agccccgagt atccacaggc tatacgatac gttatcggag
3660

gcaagcttgg cgcgccggat ctgcgtgctg cacacgtacg tggcgggtggc cgccgggttc
3720

cgcgcacggc gcgcgttctg cgaggccgcc gcgcgcgcgg gcaccgtcgt ggacgagcgc
3780

gagacgggct gcttcgacgc gcacagcttc atgaaggcca cgggtgcagc ccaccccgctg
3840

gacgccgcgc tcctcccggc gctcacgcac aagttcttcg agctcgtcaa cgggccgctc
3900

ttcgcgcacg acacgcacgc cttcgcccag tcccccaaca cggcgctcta ctttgcggtg
3960

gagaacgtgg gcctcctgcc gcacctgaag gaggagctgg cgcgcttcat ggtggcccg
4020

gattggtgcg tcagtgaagt ccgcggcttc taccgcttcc agacggccgg cgtaaccgcc
4080

accagcggc aggctggcg atatatccgc gagctggtgc tggcggttgc agtcttcagg
4140

tccgtcttcc actgcgggga cgtcgaggtc ctccgcgcgg atcgcttcgc cggacgcgac
4200

gggctgtacc tgacctacga ggcgtcttgc cccgctggtg gcggtctttg gcgcggggcc
4260

cgcgggcatc ggcccgggca ccacggcggc gctggcctcg gacgtctttg gcctgctcca
4320

caccacgctg ctgctgcgcg gggcgccgtc gcgctagaga tccaagatat caaagccatg
4380

gagaagatcg tcctcctgct ggctatcgtc tccctggtca agagcgacca gatctgcac
4440

ggctaccacg ccaacaactc taccgagcag gtggacacca tcatggagaa gaacgtgacc
4500

gtcactcacg ccaggacat cctcgagaag actcacaacg gaaagctctg cgacctcgac
4560

ggcgtcaagc ctctgacccg gcgtgactgc tccgtggctg gttggctcct gggcaacccc
4620

atgtgcgacg agttcctcaa cgtgcccagc tggctctaca tcgtcgagaa gatcaacccc
4680

gccaacgacc tgtgctaccc tggcaacttc aacgactacg aggagctcaa gcacctgctc
4740

tccgatatca accacttcga gaagatccag atcatcccca agtcctcctg gtccgaccac
4800

gaggcttcta gcggtgtgtc cagcgcttgc ccctaccagg gccgctccag cttcttccgc
4860

aacgtcgtgt ggctgatcaa gaaggacaac gcttacccaa ctatcaagcg cagctacaac
4920

aacactaacc aggaggacct gctgggtgctg tggggcatcc accaccctaa cgacgccgct
4980

gagcagactc gtctctacca gaaccctact agctacatct ccgtgggaac ctctaccctg
5040

aaccagaggc tggtgcccaa gatcgctacc aggtccaagg tcaacgggtca gtctggtagg
5100

atggagttct tctggactat cctgaagccc aacgacgcta tcaacttcga gtctaacggt
5160

aacttcacgc ctctgagaa cgcctacaag atcgtcaaga agggtgactc tactatcatg
5220

aagtctgagc tggagtacgg taactgcaac accaagtgcc agaccctat cggtgccatc
5280

aactcctcta tgcctttcca caacatccac cccctgacca tcggtgagtg ccctaagtac
5340

gtcaagtcta accgtctggc cctggctact ggactgcgta actctcccca gggtgagcgc
5400

cgtcgtaaga agaggggcct cttcggtgcc atcgtcggct tcatcgaggg tggatggcag
5460

ggcatgggtg acggctggta cggttaccac cacagcaacg agcagggctc cggttacgct
5520

gccgacaagg agtctaccca gaaggctatc gacggcgtca ccaacaaggc gaactccatc
5580

atcgacaaga tgaacaccca gttcgaggct gtgggcaggg agttcaacaa cctggagcgt
5640

cgtatcgaga acctgaacaa gaagatggag gacggtttcc tggacgtctg gacttacaac
5700

gccgagctcc tgggtgctgat ggagaacgag cgcaccctgg acttcacga ctccaacgtg
5760

aagaacctct acgacaaggc ccgcctccag ctccgcgaca acgctaagga gctgggtaac
5820

ggttgcttcg agttctacca caggcgcgac aacgagtgcg tggagtcggt gcgtaacggc
5880

acctacgact acccccagta ctccgaggag gcccgctctca agagggagga gatctccggt
5940

gtgcgcctgg agagcatcgg tacttaccag atcctctcca tctactccac cgtcgccagc
6000

tccctcgccc tggctatcat ggtggctggc ctctccctgt ggatgtgctc caacggcagc
6060

ctgcagtgca agatctgcat ctaactggat atcaaggatc tctcgaggat atcctgcagg
6120

tcgactctag gaagcttgcc tccgattcta gcattacata gccggtcagt agatcctgcc
6180

attcggtagc gcaaccggct acatcttcaa acagtctcac gataaatgca tctctcgttc
6240

ctgccaatcc ggaaccgggc ataccactcc cgctgccga ttttaattctc acaattgggc
6300

gatgccggcg gggcaaacg aatgtggatt tggcaaaccg acacaggtct gctgtacgga
6360

ctaatatggg cacaccaca tcattottca gatgctccat gcattgttct atgagaaaga
6420

tccatagggg ggaggcagcg tcacgagatc gcccaggcaa tcgatcgcat tcgtctagta
6480

aagtgcagag agttatcatg cacacacca tgcccacgcc ttccgaataa ctggagctgt
6540

ggaagatcgg aaacgtcttt ttgactgccg gtctcgctact actttcgcac aggtgtatac
6600

ccggacgcgt actatatatt ttatatcatc caacgtccga aattacatac gtggcggcga
6660

tggaagtaga tgttgagtct tcgaaagtaa gtgcctcgaa tatgggtatt gtctgtgaaa
6720

atatcgaaag cggtacgacg gttgcagaac cgtcgatgtc gccagatact agtaacaata
6780

gcttcgataa cgaagacttc cgtgggcctg aatacgatgt ggagataaat accagaaaat
6840

ctgctaattc tgatcgtatg gaatcttcgt gccgtgaaca acgagcggcg tgcgaacttc
6900

gaaagtgttc gtgtcctacg tctgccgtgc gcatgcaata cagtattcctt tcatctctcg
6960

ctccgggttc agagggtcat gtatatatat gtactagata cggggacgcg gaccaaaaaa
7020

aatgcatagt gaaggcagtc gttggaggaa agaatcccgg gagggagtg gatattttaa
7080

aaaccatctc acataaatca attataaaat taatccatgc ctataaatgg aaaaatgttg
7140

tgtgtatggc aatgcgtgta tatcgttatg atcttttcac atatattgac ggagtcggcc
7200

ctatgccct tcaacagatg atctatatc aacgtggact actagaggcg ctagcataca
7260

tacatgaaag gggcatcatt caccgagacg taaagacgga gaatatattc ttggataatc
7320

acgaaaatgc agttttgggt gacttcggtg ctgcatgcca actaggagat tgtatagata
7380

cgccccaatg ttacggttgg agcggaaactg tggaaacaaa ttcgccggaa ttatctgcac
7440

ttgatccgta ttgcacaaaa acagatattt ggagtgcggg attggttcta tatgagatgg
7500

caattaataaa tgtaccattg tttagtaagc aggtgaaaag ttcgggatct cagctgagat
7560

ccataatacg gtgcatgcaa gtgcatgaac tggagtttcc ccgcaacgat tctaccaacc
7620

tctgtaaaca tttcaaaca tatgcggttc gtgtacgacc gccttatacc attcctcgag
7680

ttataagaaa tgggggggatg ccaatggatg ttgaatatgt catttctaaa atgcttacgt
7740

ttgaccagga gttcagacct tctgctaagg aaatattgaa tatgcccta tttactaagg
7800

cgccgattaa cctgcttaat atcacaccct ctgacagtgt ctaacggtat acaggcggga
7860

gcgggtcgtg gcgtcatcat caccacttga gaatttatat tttgaattgt tgattgataa
7920

attaacctga ttcattgaga actgaaacgc catattgggt tcttgatat gtctacaaca
7980

attagttaaa ttgctatggt ctactgcgag taacatttga taagttgtaa gagacgggcg
8040

actcatgtcg aagttgacga atataaagta cataacgtgt ttagaatacc cagaatccga
8100

atagtccgcg ggggcgtctt ctgcggtgag taccaaatac tgagttgaac ttgaaaatgc
8160

taaatctgtg aactcctttg tgtgatgatt attgtcacca cttcgaagat ggcttcgaca
8220

ttcatgatgt tctgggtgtt gtttggaatc gtaatagcgc ttgtttcgtc caagtctgac
8280

aacaaagaaa atctgaagaa ttatatcacg gataagtcaa ccaatattag aatacccacg
8340

ccattatttg tatcaacgga aaactccttat cccacaaaac atgtaatcta cgatgaaaac
8400

tgtggcttcg ctgtactcaa tcctataagt gaccccaaata atgtcctttt gagccagctt
8460

ctaattgggaa ggcgcaaata tgatgcgacg gtcgctgggt ttgttctcgg taaaatgtgt
8520

gccagattaa tatatttgcg cgaattttat aactgctcga caaatgagcc ttttggcaca
8580

tgttctatga gctctcctgg atggtgggac aggcgctacg tctcaaccag tttcatttct
8640

cgcgacgaat tacagctggt ttttgcagcg ccgtcccgag aattagatgg tttatatacg
8700

cgcgtagtag ttgtcaacgg ggactttact acggccgata taatgtttaa tgttaaagtg
8760

gcatgtgcct tttcaaagac tggaatagaa gatgatacat tatgcaaacc ctttcatttc
8820

tttgccaatg caacattgca caatttaacc atgattagat cggttaactct tcgagcgcac
8880

gaaagccatt taaaggaatg ggtggcacgg agaggtggta acgtccctgc agtgctactt
8940

gagtctacca tgtatcatgc atccaatctg cctagaaatt tcagggattt ctacataaag
9000

tctccagatg attataagta taatcaccta gatgggccat ctgtaatgct catcactgac
9060

agacctagtg aagatttgga tgggaggctc gttcaccaa gtgacatttt tactactaca
9120

agtcctataa aacaggtccg gtatgaagag catcagtcac atacaaagca gtatcctgta
9180

aacaaaatac aagctataat ttttttgata gggttaggct cgttcattgg aagcatattc
9240

gtagttttgg tagtatggat tatacgcaga tattgcaatg gagcgcgag tgggggaacg
9300

ccccccagtc ctcgccggtg tgtgtatacc aggctatgat cacgtgtgaa acttgggcgg
9360

acctgtatca tatgtacacc gtccctattc gtttatagcc agtacgtgtt atctgcacat
9420

agaggaacat gtgtcatact gggatcgcat gcatggtatg tgtgactcta atattattct
9480

gtatcataat aaaaacacag tgcattggtat atagaggatc gctggtaagc actacggtag
9540

accaatcggc tcagattgca ttctttggca tcgataccgt tggttaattta tatggcaaag
9600

tcttgttcat gggagatcag tatttgagg aaatatactc tggaacgatg gaaatactca
9660

aatggaatca agctaaccgc tgctattcta ttgcgcatgc aacatattac gccgactgtc
9720

ctataatcag ttctacggta ttcagaggat gccgggacgc cgttgtttat actaggcccc
9780

acagcagaat tc
9792

Fig. 1

