



(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)



1-0027843

(51)⁷ A61K 48/00

(13) B

(21) 1-2013-00063

(22) 09/06/2011

(86) PCT/US2011/039832 09/06/2011

(87) WO 2011/156619 A2 15/12/2011

(30) 61/353,039 09/06/2010 US

(45) 25/04/2021 397

(43) 25/04/2013 301A

(73) THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ARKANSAS (US)
2404 North University Avenue, Little Rock, AR 72207, United States of America

(72) HARGIS, Billy (US); PUMFORD, Neil, R. (US); KWON, Young, Min (US);
LAYTON, Sherryll (US).

(74) Công ty TNHH Quốc tế D&N (D&N INTERNATIONAL CO.,LTD.)

(54) VECTƠ VACXIN ĐỂ LÀM GIẢM NHIỄM KHUẨN CAMPYLOBACTER VÀ
DƯỢC PHẨM CHỨA VECTƠ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến vectơ vacxin để làm tăng khả năng kháng nhiễm khuẩn *Campylobacter* hoặc để tăng cường đáp ứng miễn dịch với *Campylobacter* và dược phẩm chứa vectơ vacxin này. Vectơ vacxin theo sáng chế chứa polynucleotit thứ nhất mã hóa polypeptit kháng nguyên được chọn từ các trình tự SEQ ID NO: 7 đến SEQ ID NO: 9 hoặc đoạn của nó. Vectơ vacxin này cũng có thể chứa polypeptit kích thích miễn dịch.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến vectơ vaccin để làm tăng khả năng kháng nhiễm khuẩn *Campylobacter* hoặc tăng cường đáp ứng miễn dịch với *Campylobacter* và được phẩm chứa vectơ này. Vectơ vaccin theo sáng chế chứa polynucleotit thứ nhất mã hóa polypeptit kháng nguyên được chọn từ các trình tự SEQ ID NO: 7 đến SEQ ID NO: 9 hoặc đoạn peptit của nó. Vectơ này cũng có thể chứa polypeptit kích thích miễn dịch.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Danh mục các vaccin an toàn và có chi phí thấp để gây miễn dịch niêm mạc kháng lại nhiều tác nhân gây bệnh vẫn bị hạn chế. Vi khuẩn chính gây ra bệnh đường tiêu hóa ở người trên khắp thế giới là *Campylobacter*. Có thể thấy trước trong tương lai, bệnh viêm đường tiêu hóa do vi khuẩn vẫn tiếp tục gây ra mối đe dọa nghiêm trọng đối với cộng đồng ở Mỹ và thế giới nói chung. Bệnh truyền nhiễm do *Campylobacter jejuni* có tần suất xuất hiện cao hơn so với bệnh truyền nhiễm do *Salmonella* hoặc *Escherichia coli* O157:H7 vốn được nói đến nhiều hơn. Số liệu thực tế về các trường hợp mắc bệnh viêm đường tiêu hóa do *Campylobacter* ở Mỹ hàng năm là 500-850 ca/100.000 người.

Nguyên nhân chính gây bệnh viêm đường tiêu hóa không chỉ do *Campylobacter* mà còn do *C. jejuni* liên quan đến hội chứng Guillain-Barré (Guillain-Barré Syndrome – GBS) bệnh thần kinh. Căn bệnh đe dọa đến tính mạng này có thể là đáp ứng miễn dịch với các cấu trúc tương tự gangliosit ở một số chủng *C. jejuni* dẫn đến đáp ứng tự miễn chống lại các tế bào thần kinh. Mặc dù hội chứng Guillain-Barré là di chứng mạn tính nghiêm trọng nhất, nhưng sự lây nhiễm *Campylobacter* còn gây ra chứng viêm khớp phản ứng có thể tiến triển thành hội chứng Reiter.

Việc chủng ngừa kháng lại *Campylobacter* đã có những thành công hạn chế nhờ sử dụng vaccin toàn tế bào bất hoạt hoặc vaccin trên cơ sở protein. Ngoài ra, việc chủng ngừa bằng vaccin toàn tế bào bất hoạt vẫn có thể tiến triển thành hội chứng Guillain-Barré hoặc di chứng khác. Một vaccin thành công cần phải có chi phí thấp, an toàn, hiệu quả khi sử dụng qua đường miệng, và sản xuất được với lượng lớn trong thời gian rất ngắn. Hiện nay, chưa có một loại vaccin nào như vậy.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất vector vacxin để làm tăng sự kháng nhiễm khuẩn *Campylobacter* hoặc tăng cường đáp ứng miễn dịch với *Campylobacter* và được phẩm chứa vector này.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất vector vacxin chứa trình tự polynucleotit thứ nhất mã hóa polypeptit kháng nguyên không liên hợp tự nhiên với vector này. Polypeptit kháng nguyên này có thể là SEQ ID NO: 7 (cjaD; cj0113; GVSITVEGNCDEWGTDEYNQA), SEQ ID NO: 8 (cjaA; cj0982; KDIVLDAEIGGVAKGKDGKEK) hoặc SEQ ID NO: 9 (ACE 393; cj0420; KVALGVAVPKDSNITSVEDLKDKTLLLNGTTADA) hoặc đoạn peptit của chúng. Vector theo sáng chế cũng có thể chứa polypeptit kích thích miễn dịch không liên hợp tự nhiên với vector này. Vector vacxin theo sáng chế có khả năng tạo ra đáp ứng miễn dịch ở đối tượng được chủng ngừa bao gồm đáp ứng kháng thể IgA kháng *Campylobacter*. Đáp ứng này có thể bảo vệ kháng lại việc gây nhiễm bằng *Campylobacter*.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất vector vacxin chứa trình tự polynucleotit thứ nhất mã hóa polypeptit kháng nguyên không liên hợp tự nhiên với vector vacxin và trình tự polynucleotit thứ hai mã hóa polypeptit kích thích miễn dịch. Polypeptit kháng nguyên này có thể là đoạn peptit có trình tự SEQ ID NO: 1 (cjaD), SEQ ID NO: 2 (cjaA) hoặc SEQ ID NO: 3 (ACE393). Vector vacxin theo sáng chế có khả năng tạo ra đáp ứng miễn dịch ở đối tượng được chủng ngừa bao gồm đáp ứng kháng thể IgA kháng *Campylobacter*. Đáp ứng này có thể bảo vệ kháng lại việc gây nhiễm với *Campylobacter*.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất được phẩm chứa vector vacxin này và chất mang được dụng.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế mô tả phương pháp tăng cường đáp ứng miễn dịch kháng *Campylobacter* ở đối tượng. Phương pháp này bao gồm việc cho đối tượng sử dụng lượng có hiệu quả của vector vacxin theo sáng chế. Theo một phương án, đáp ứng miễn dịch được tăng cường bao gồm đáp ứng kháng thể IgA và đáp ứng này có thể bảo vệ.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế mô tả phương pháp làm tăng khả năng kháng nhiễm khuẩn *Campylobacter*. Phương pháp này bao gồm việc cho đối tượng sử

dụng lượng có hiệu quả của vector vacxin theo sáng chế sao cho đối tượng có khả năng kháng lại sự nhiễm khuẩn sau khi phơi nhiễm *Campylobacter*. Theo một phương án đáp ứng miễn dịch được tăng cường bao gồm đáp ứng kháng thể IgA và đáp ứng này có thể bảo vệ.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là đồ thị đường chuẩn PCR định lượng thể hiện số lượng vi khuẩn *Campylobacter jejuni* nuôi cấy được trên trục x định lượng được bằng phương pháp nuôi cấy thông thường và đếm số đơn vị hình thành khuẩn lạc (colony forming units - CFU). Số chu trình ở đó tín hiệu huỳnh quang vượt qua được ngưỡng PCR định lượng được thể hiện trên trục y.

Fig.2 là đồ thị thể hiện trị số log cfu/g hồi tràng ở gà được chủng ngừa bằng nước muối, hoặc vector *Salmonella* biểu hiện các peptit cj0420 (SEQ ID NO: 9), cj0113 (SEQ ID NO: 7) hoặc cj0982 (SEQ ID NO: 8) ở *Campylobacter* (10^8 cfu/con gà), sau 11 ngày gây nhiễm với *C. jejuni* (5×10^7 cfu/mL). Tiến hành PCR định lượng trên ADN tổng số chiết được bằng phương pháp thông thường từ các lớp niêm mạc của hồi tràng. Kết quả định lượng được thể hiện dưới dạng trị số trung bình $\pm$ SEM (n=10). Các nhóm có các chỉ số khác nhau có sự khác biệt đáng kể ($P < 0,05$).

Fig.3 là đồ thị thể hiện trị số log cfu/g hồi tràng ở gà được chủng ngừa bằng nước muối, vector *Salmonella* không chèn polypeptit kháng nguyên hoặc vector *Salmonella* có đoạn chèn cj0113 (SEQ ID NO: 7) (10^8 cfu/con gà), sau 11 ngày gây nhiễm với *C. jejuni* (1×10^7 cfu/mL). Tiến hành PCR định lượng trên ADN tổng số chiết được bằng phương pháp thông thường từ các lớp niêm mạc của hồi tràng. Kết quả định lượng được thể hiện dưới dạng trị số trung bình $\pm$ SEM (n=10) và dấu hoa thị * cho thấy có sự khác biệt đáng kể giữa các nhóm thử ($P < 0,05$).

Fig.4 là đồ thị thể hiện nồng độ tương đối của IgG kháng *Campylobacter* (tỷ lệ S/P) định lượng được bằng phương pháp ELISA ở ngày 21 và 32 sau khi sử dụng các vector vacxin được chỉ định (10^8 cfu/con gà). Các nhóm có các chỉ số khác nhau có sự khác biệt đáng kể ($P < 0,05$).

Fig.5 là đồ thị nồng độ tương đối của sIgA kháng *Campylobacter* (tỷ lệ S/P) trong niêm mạc hồi tràng ở ngày 32 sau khi chủng ngừa bằng các vector vacxin được chỉ định (10^8 cfu/con gà). Các nhóm có các chỉ số khác nhau có sự khác biệt đáng kể ($P < 0,05$).

Fig.6 là đồ thị thể hiện nồng độ IgG trong huyết thanh (tỷ lệ S/P) ở ngày 21 và 31 sau khi chủng ngừa và nồng độ sIgA (tỷ lệ S/P) trong niêm mạc hồi tràng ở ngày 32 sau khi chủng ngừa bằng nước muối, vectơ *Salmonella* không chèn hoặc chèn polypeptit kháng nguyên cj0113 (SEQ ID NO: 7) (10^8 cfu/con gà). Dấu hoa thị * cho thấy có sự khác biệt đáng kể so với nhóm chứng ($P < 0,05$).

Fig.7 là đồ thị thể hiện nồng độ kháng thể IgG trong huyết thanh đặc hiệu với *C. jejuni* 10 ngày sau khi chủng ngừa bằng *Bacillus subtilis* tự nhiên (*Bacillus subtilis* backbone strain - BSBB) hoặc vectơ vaccin *Bacillus subtilis* chèn cj0113 (SEQ ID NO: 7) bằng ống thông qua đường miệng ở nồng độ 10^8 cfu/con gà. Dữ liệu được thể hiện dưới dạng trị số trung bình $\pm$ SEM và dấu hoa thị * cho thấy có sự khác biệt đáng kể so với cả hai nhóm chứng ($P < 0,05$).

Fig.8 là đồ thị thể hiện nồng độ kháng thể IgA tiết ra đặc hiệu với *C. jejuni* 10 ngày sau khi chủng ngừa bằng *Bacillus subtilis* tự nhiên (BSBB) hoặc vectơ vaccin *Bacillus subtilis* chèn cj0113 (SEQ ID NO: 7) bằng ống thông qua đường miệng ở nồng độ 10^8 cfu/con gà. Thu gom niêm mạc trong vùng hồi tràng. Dữ liệu được thể hiện dưới dạng trị số trung bình $\pm$ SEM và dấu hoa thị * cho thấy có sự khác biệt đáng kể so với cả hai nhóm chứng ($P < 0,05$).

Fig.9 là đồ thị thể hiện trị số $\log_{10}$ CFU của *C. jejuni* trên mỗi gam hồi tràng định lượng được bằng phương pháp PCR định lượng. Gà được chủng ngừa bằng *Bacillus subtilis* tự nhiên (BSBB) hoặc vectơ vaccin *Bacillus subtilis* biểu hiện cj0113 (SEQ ID NO: 7), được gây nhiễm với *C. jejuni* ở nồng độ 1×10^8 cfu/con gà, 10 ngày sau được định lượng bằng PCR. Tiến hành qPCR trên ADN tổng số chiết được bằng phương pháp thông thường từ các lớp niêm mạc của hồi tràng. Kết quả định lượng được thể hiện dưới dạng trị số $\log_{10}$ cfu/g hồi tràng trung bình $\pm$ SEM ($n=10$) và dấu hoa thị * cho thấy có sự khác biệt đáng kể so với nhóm chứng ($P < 0,05$).

Fig.10 là đồ thị thể hiện trị số $\log_{10}$ CFU của *C. jejuni* trên mỗi gam hồi tràng của gà tây định lượng được bằng phương pháp PCR định lượng. Gà tây được chủng ngừa bằng *Bacillus subtilis* tự nhiên (BSBB) hoặc vectơ vaccin *Salmonella* chèn cj0113 (SEQ ID NO: 7), được gây nhiễm với *C. coli* ở nồng độ 1×10^8 cfu/con gà, sau 12 ngày được định lượng bằng PCR. Tiến hành qPCR trên ADN tổng số chiết được bằng phương pháp thông thường từ các lớp niêm mạc của hồi tràng. Kết quả định lượng được thể hiện dưới

dạng trị số $\log_{10}$ cfu/g hồi tràng trung bình $\pm$ SEM (n=10) và dấu hoa thị * cho thấy có sự khác biệt đáng kể so với nhóm chứng ($P < 0,05$).

Mô tả chi tiết sáng chế

Vector vaccin gây đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào, dịch thể và niêm mạc, kháng nhiều chủng *Campylobacter* được xem là phương pháp có triển vọng để hạn chế bệnh viêm đường tiêu hóa do *Campylobacter*. Phương pháp này sử dụng cách tiếp cận mới trong phát triển vaccin bằng cách chèn các trình tự polynucleotit mã hóa epitop mạch thẳng không tự nhiên (polypeptit kháng nguyên). Polypeptit kháng nguyên này có thể được sử dụng kết hợp với polypeptit kích thích miễn dịch như CD154 (CD40L) hoặc HMGB1 (nhóm có khả năng di động cao hộp 1) vào vector vaccin. Phù hợp là, polypeptit kháng nguyên và polypeptit kích thích miễn dịch không phải là polypeptit được tìm thấy liên hợp một cách tự nhiên với vector vaccin. Epitop hoặc polypeptit kháng nguyên và polypeptit kích thích miễn dịch có thể được biểu hiện trên bề mặt của vector vaccin tái tổ hợp. Vector này có thể là vi khuẩn, virus hoặc thậm chí là vector liposom. Vector này có thể ở thể sống, sống và được giảm độc lực, hoặc chết trước khi sử dụng. Dữ liệu sơ bộ cơ bản được thể hiện trong phần “Ví dụ thực hiện sáng chế”, cho thấy rằng các cấu trúc *Salmonella* hoặc *Bacillus* biểu hiện epitop lạ có khả năng gây cảm ứng một cách nhanh chóng kháng thể đặc hiệu epitope độ chuẩn cao *in vivo*. Hơn nữa, sự biểu hiện đồng thời của CD154 hoặc HMGB1 trên bề mặt đã tăng cường đáp ứng miễn dịch kháng epitop lạ này một cách hiệu quả.

Kỹ thuật ADN tái tổ hợp có khả năng thao tác tương đối dễ dàng trên nhiều chủng vi khuẩn và virus. Một số vi khuẩn và virus gây bệnh thể nhẹ hoặc không gây bệnh, nhưng có khả năng tạo ra đáp ứng miễn dịch mạnh. Các vi khuẩn và virus này làm cho vector vaccin thu hút hơn để gây đáp ứng miễn dịch với kháng nguyên lạ, không tự nhiên, hoặc khác nguồn gốc. Vector vaccin vi khuẩn hoặc virus có thể bắt chước sự lây nhiễm tự nhiên và tạo ra khả năng miễn dịch mạnh và kéo dài. Chi phí để sản xuất và sử dụng vector vaccin thường tương đối thấp. Ngoài ra, vector vaccin này thường có thể chứa nhiều hơn một kháng nguyên và có thể tạo ra khả năng bảo vệ kháng nhiều tác nhân gây bệnh.

Polynucleotit mã hóa polypeptit kháng nguyên từ một số sinh vật gây bệnh có thể được chèn vào vector vaccin và biểu hiện để tạo ra polypeptit kháng nguyên. Polypeptit

kháng nguyên là polypeptit có thể được nhận diện đặc hiệu bởi hệ miễn dịch thu được. Polypeptit kháng nguyên là polypeptit bất kỳ có khả năng gây miễn dịch. Polypeptit kháng nguyên bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, kháng nguyên liên quan đến mầm bệnh, kháng nguyên dị ứng, kháng nguyên liên quan đến khối u hoặc kháng nguyên liên quan đến bệnh. Các mầm bệnh bao gồm virus, ký sinh trùng, nấm, vi khuẩn và protein như prion.

Polypeptit kháng nguyên có thể là protein có chiều dài đủ hoặc đoạn peptit của nó. Quá trình nhận diện nhiều protein của hệ miễn dịch được chứng minh là dựa trên số lượng axit amin tương đối ít, thường được gọi là epitop. Epitop có thể chỉ có từ 8 đến 10 axit amin. Do đó, polypeptit kháng nguyên theo sáng chế có thể là protein có chiều dài đủ, epitop chứa 8 axit amin hoặc vùng bất kỳ giữa các đầu này. Thực tế, polypeptit kháng nguyên có thể chứa nhiều hơn một epitop từ một mầm bệnh hoặc protein duy nhất. Tốt hơn là, polypeptit kháng nguyên là polypeptit không liên hợp tự nhiên với vector vaccin. Không liên hợp từ nhiên bao gồm các polypeptit kháng nguyên mà cũng có thể có trong tự nhiên ở vector vaccin, nhưng được biểu hiện tái tổ hợp dưới dạng epitop, được biểu hiện kết hợp với polypeptit khác dưới dạng protein dung hợp để thể hiện và tăng cường đáp ứng miễn dịch một cách khác biệt so với polypeptit được biểu hiện tự nhiên.

Nhiều bản sao của cùng một epitop hoặc nhiều epitop từ các protein nhau khác có thể được chèn vào vector vaccin. Hình dung là nhiều epitop hoặc kháng nguyên từ các mầm bệnh hoặc nguồn bệnh giống hoặc khác nhau có thể được chèn vào cùng một vector vaccin để tạo ra đáp ứng miễn dịch tăng cường kháng lại nhiều kháng nguyên. Vector vaccin tái tổ hợp có thể mã hóa kháng nguyên từ nhiều vi sinh vật, virus gây bệnh hoặc kháng nguyên liên quan đến khối u. Việc sử dụng vector vaccin có thể biểu hiện nhiều kháng nguyên có ưu điểm là gây cảm ứng hệ miễn dịch kháng hai hoặc nhiều bệnh đồng thời.

Polynucleotit này có thể được chèn vào nhiễm sắc thể của vector vaccin hoặc mã hóa trên plasmid hoặc ADN ngoài nhiễm sắc thể khác. Polynucleotit mã hóa epitop có thể được biểu hiện độc lập (tức là, được liên kết hoạt động được với promoter chức năng ở vector vaccin) hoặc có thể được chèn vào polynucleotit của vector vaccin (tức là, polynucleotit tự nhiên hoặc polynucleotit không tự nhiên) được biểu hiện ở vector vaccin này. Tốt hơn là, polynucleotit của vector vaccin mã hóa polypeptit được biểu hiện trên bề mặt của vector vaccin dưới dạng protein xuyên màng. Polynucleotit mã hóa polypeptit

kháng nguyên có thể được chèn vào khung trình tự polynucleotit của vector vacxin để biểu hiện polypeptit kháng nguyên trên bề mặt của vector vacxin này. Ví dụ, polynucleotit mã hóa polypeptit kháng nguyên có thể được chèn vào khung polynucleotit của vi khuẩn ở vùng mã hóa vòng bên ngoài của protein xuyên màng sao cho vẫn giữ được khung trình tự polynucleotit của vector vacxin này. Xem phần “Ví dụ thực hiện sáng chế” dưới đây, trong đó polypeptit kháng nguyên được chèn vào vòng bên ngoài của gen *lamB* của vector vacxin *Salmonella enteritidis*.

Theo phương án khác, polynucleotit mã hóa polypeptit kháng nguyên có thể được chèn vào polypeptit tiết ra. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng, polynucleotit mã hóa polypeptit kháng nguyên có thể được chèn vào nhiều polynucleotit của vector vacxin để biểu hiện và trình diện polypeptit kháng nguyên đến các tế bào miễn dịch của đối tượng được điều trị bằng vector vacxin này. Trong phần “Ví dụ thực hiện sáng chế”, một số polynucleotit của *Campylobacter* được chèn vào trình tự mã hóa *lamB* của *Salmonella enteritidis*. Vi khuẩn tái tổ hợp thu được biểu hiện polypeptit kháng nguyên được chèn này trên bề mặt của nó. Polynucleotit có thể được chèn vào gen *CotB* của *Bacillus subtilis* sao cho vi khuẩn tái tổ hợp biểu hiện polypeptit kháng nguyên được chèn này ở dạng bào tử hoặc được chèn vào vùng gen *slp* để biểu hiện trên bề mặt của vi khuẩn sinh dưỡng.

Vector vacxin theo sáng chế có thể chứa polynucleotit mã hóa protein có chiều dài đủ của *Campylobacter* bao gồm *cjaD* (SEQ ID NO: 1), *cjaA* (SEQ ID NO: 2) và ACE393 (SEQ ID NO: 3) hoặc polypeptit kháng nguyên của các protein này. Trong phần “Ví dụ thực hiện sáng chế”, polypeptit kháng nguyên có nguồn gốc từ các protein có chiều dài đủ được sử dụng là như sau: SEQ ID NO: 7 (polypeptit *cjaD* được gọi là cj0113); SEQ ID NO: 8 (polypeptit *cjaA* được gọi là cj0982); và SEQ ID NO: 9 (polypeptit ACE 393 được gọi là cj0420). Các polynucleotit được sử dụng trong phần “Ví dụ thực hiện sáng chế” có trình tự lần lượt nêu trong SEQ ID NO: 4 đến SEQ ID NO: 6. Các polynucleotit được sử dụng trong phần “Ví dụ thực hiện sáng chế” có các polypeptit kháng nguyên có trình tự nêu trong SEQ ID NO 7 đến SEQ ID NO: 9 được phân tách bởi các cầu nối serin và liên kết với các axit amin 140-149 của CD154 (ba axit amin ở trước, sau và giữa polypeptit kháng nguyên và polypeptit kích thích miễn dịch).

Tốt hơn là, một phần của polypeptit kháng nguyên được chèn vào vector vacxin có tính gây miễn dịch hoặc kháng nguyên. Đoạn có tính gây miễn dịch là peptit hoặc

polypeptit có khả năng gây ra đáp ứng miễn dịch dịch thể hoặc tế bào. Tốt hơn là, polypeptit kháng nguyên có thể là protein có chiều dài đủ, hoặc tốt hơn là chứa 20 axit amin hoặc nhiều hơn, 15 axit amin hoặc nhiều hơn, 10 axit amin hoặc nhiều hơn, 8 axit amin hoặc nhiều hơn của protein có chiều dài đủ này. Tốt hơn là, đáp ứng miễn dịch được tạo ra kháng lại mầm bệnh đích là đáp ứng miễn dịch bảo vệ. Đáp ứng miễn dịch bảo vệ là đáp ứng có khả năng ngăn chặn hoặc làm giảm tỷ lệ mắc bệnh hoặc tỷ lệ tử vong do nhiễm mầm bệnh đích, cụ thể là *Campylobacter*.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng, trình tự polynucleotit bất kỳ trong số các trình tự polynucleotit này có thể được sử dụng kết hợp với polypeptit kháng nguyên bất kỳ khác bao gồm polypeptit từ mầm bệnh hoặc sinh vật khác loại khác và cũng có thể được sử dụng kết hợp với polynucleotit mã hóa polypeptit kích thích miễn dịch như polypeptit CD154 hoặc HMGB1 được mô tả trong các đơn yêu cầu cấp patent quốc tế số PCT/US07/078785 và PCT/US2011/022062, cả hai tài liệu này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ.

Polynucleotit mã hóa polypeptit kích thích miễn dịch tương đồng với protein của đối tượng và có khả năng kích thích hệ miễn dịch đáp ứng với epitop lạ cũng có thể được chèn vào vector vaccin. Như được mô tả chi tiết hơn dưới đây, vector vaccin có thể chứa polypeptit CD154 có khả năng liên kết với CD40 ở đối tượng và kích thích đối tượng đáp ứng với vector vaccin này và polypeptit kháng nguyên lạ được gắn vào vector. Ngoài ra, vector vaccin có thể chứa polypeptit HMGB1 hoặc đoạn chức năng của nó. Như được mô tả nêu trên đối với polypeptit kháng nguyên, polynucleotit mã hóa polypeptit này có thể được chèn vào nhiễm sắc thể của vector vaccin hoặc ở ngoài nhiễm sắc thể. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng, các polynucleotit này có thể được chèn vào nhiều polynucleotit của vector vaccin này để biểu hiện ở các vùng khác nhau của vector vaccin hoặc tiết ra các polypeptit.

Polynucleotit mã hóa polypeptit kích thích miễn dịch có khả năng tăng cường đáp ứng miễn dịch với polypeptit kháng nguyên không tự nhiên cũng có thể mã hóa polypeptit kháng nguyên này. Polynucleotit mã hóa polypeptit kích thích miễn dịch có thể được liên kết với polynucleotit mã hóa polypeptit kháng nguyên, sao cho polypeptit kích thích miễn dịch và polypeptit kháng nguyên lạ có mặt trên cùng polynucleotit của vector vaccin. Ví dụ, polypeptit kháng nguyên và polypeptit kích thích miễn dịch có thể là các phần của protein dung hợp. Trong phần “Ví dụ thực hiện sáng chế”, polynucleotit mã

hóa polypeptit CD154 có khả năng liên kết với CD40 cũng mã hóa polypeptit kháng nguyên từ cjaD, cjaA hoặc ACE 393 của *Campylobacter*. Tham khảo các trình tự SEQ ID NO: 10 đến SEQ ID NO: 12 trong phần “Danh mục trình tự” để biết một số ví dụ về các trình tự polypeptit tiềm năng và các trình tự SEQ ID NO: 4 đến SEQ ID NO: 6 cho các trình tự polynucleotit mã hóa các cầu nối serin tùy ý ở giữa polypeptit kháng nguyên, polypeptit kích thích miễn dịch và polypeptit của vật chủ.

Trong phần “Ví dụ thực hiện sáng chế”, polynucleotit mã hóa polypeptit kháng nguyên *Campylobacter* và polynucleotit mã hóa polypeptit kích thích miễn dịch cùng được chèn vào vòng bên ngoài của gen *lamB* xuyên màng. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng, polynucleotit của vectơ vacxin mã hóa các protein xuyên màng khác cũng có thể được sử dụng. Ngoài ra, polynucleotit kháng nguyên có thể ở ngoài nhiễm sắc thể hoặc được tiết ra bởi vectơ vacxin. Trong phần “Ví dụ thực hiện sáng chế”, polynucleotit mã hóa kháng nguyên cj0113 *Campylobacter* (SEQ ID NO: 7) và peptit kích thích miễn dịch HMGB1 (SEQ ID NO:20) được biểu hiện từ plasmit được mang bởi vectơ *Bacillus* và được biểu hiện trên bề mặt tế bào này.

Tốt hơn là, polypeptit CD154 có chiều dài ít hơn 50 axit amin, tốt hơn nữa là ít hơn 40, ít hơn 30 hoặc ít hơn 20 axit amin. Polypeptit có thể có chiều dài từ 10 đến 15 axit amin, từ 10 đến 20 axit amin hoặc từ 10 đến 25 axit amin. Trình tự CD154 và vùng liên kết với CD40 không có tính bảo thủ cao ở các loài khác nhau. Các trình tự CD154 của gà và người lần lượt là SEQ ID NO: 13 và SEQ ID NO: 14.

Vùng liên kết với CD40 của CD154 đã được xác định đối với một số loài, bao gồm người, gà, vịt, chuột và gia súc và được thể hiện lần lượt là SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO:18, và SEQ ID NO:19. Mặc dù có khả năng biến đổi trong trình tự của vùng liên kết với CD40 giữa các loài, nhưng sự liên kết chéo loài của CD154 với CD40 đã được ghi nhận. Ví dụ, polypeptit CD154 của người có khả năng tăng cường đáp ứng miễn dịch ở gà. Do đó, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể thực hiện sáng chế bằng cách sử dụng polypeptit CD154 đặc hiệu cho loài hoặc polypeptit CD154 khác loại.

Protein HMGB1 (High Mobility Group Box-1) được nhận diện đầu tiên là protein liên kết ADN quan trọng đối với cấu trúc và độ ổn định của ADN. HMGB1 là protein nhân được biểu hiện ở mọi vị trí liên kết ADN không có tính đặc hiệu trình tự. Protein

này có tính bảo thủ cao và được tìm thấy ở cả thực vật và động vật có vú. Trình tự axit amin của HMGB1 ở cá ngựa vằn, gà và người lần lượt là SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 20 và SEQ ID NO: 27. Trình tự axit amin của HMGB1 ở tất cả động vật có vú có tính bảo thủ cao với độ tương đồng axit amin là 98% và các biến đổi axit amin có tính bảo thủ. Do đó, protein HMGB1 từ một loài hầu như có thể thay thế được chức năng cho protein HMGB1 từ loài khác. Protein HMGB1 có chiều dài đủ hoặc đoạn của nó có thể được sử dụng làm polypeptit HMGB1 trong vector vacxin theo sáng chế. Protein HMGB1 có hai vùng liên kết ADN được gọi là hộp A như được thể hiện trên trình tự SEQ ID NO: 21 và SEQ ID NO: 22 và hộp B như được thể hiện trên trình tự SEQ ID NO: 23 và SEQ ID NO: 24. Tham khảo tài liệu Andersson and Tracey, *Annu. Rev. Immunol.* 2011, 29:139-162, tài liệu này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ.

Protein HMGB1 là chất trung gian trong quá trình viêm và đóng vai trò như dấu hiệu của quá trình tổn thương nhân, như từ các tế bào hoại tử. Protein HMGB1 cũng có thể được tiết ra chủ động bởi các dòng tế bào bạch cầu đơn nhân/đại thực bào trong quá trình cần thiết để acetyl hóa, di chuyển qua nhân và tiết ra. Protein HMGB1 ngoại bào đóng vai trò làm chất trung gian quan trọng trong quá trình viêm bằng cách truyền tín hiệu thông qua thụ thể của các sản phẩm glycat hóa bền vững (Receptor for Advanced Glycated End-products - RAGE) và thông qua các thành viên của họ thụ thể tương tự Toll (Toll-like Receptor family - TLR), cụ thể là TLR4. Hoạt tính liên kết RAGE đã được xác định và cần có polypeptit có trình tự SEQ ID NO: 25. Hoạt tính liên kết TLR4 cần có cysteine ở vị trí 106 của trình tự SEQ ID NO: 20, được tìm thấy ở vùng hộp B của HMGB1.

Hoạt tính gây viêm của HMGB1 không yêu cầu protein có chiều dài đủ này và các đoạn chức năng của nó được nhận diện. Hộp B đã được kiểm chứng là đủ để làm trung gian các tác dụng tiền viêm của HMGB1 và do đó các trình tự SEQ ID NO: 23 và SEQ ID NO: 24 là các polypeptit HMGB1 hoặc đoạn chức năng của chúng nằm trong phạm vi của sáng chế. Ngoài ra, vị trí liên kết RAGE và hoạt tính xytokin tiền viêm đã được thể hiện tương ứng là SEQ ID NO: 25 và SEQ ID NO: 26. Do đó, các polypeptit này là các đoạn chức năng của polypeptit HMGB1 theo sáng chế.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể nhận dạng các polypeptit HMGB1 và đoạn của chúng có khả năng kích thích hoạt tính xytokin tiền viêm, bằng cách sử dụng các phương pháp như được mô tả trong công bố đơn yêu cầu cấp patent

quốc tế số WO02 092004, tài liệu này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ. Tốt hơn là, polypeptit HMGB1 chứa vùng liên kết RAGE ở vị trí các axit amin 150-183 của trình tự SEQ ID NO: 20 (SEQ ID NO: 25 hoặc thể tương đồng của nó) và vùng có hoạt tính xytokin tiền viêm ở vị trí các axit amin 89-109 của trình tự SEQ ID NO: 20 (SEQ ID NO: 26 hoặc thể tương đồng của chúng). Cụ thể là, các polypeptit HMGB1 và đoạn chức năng hoặc thể tương đồng của chúng bao gồm các polypeptit tương đồng, hoặc có độ tương đồng ít nhất là 99%, ít nhất 98%, ít nhất 95%, ít nhất 90%, ít nhất 85%, hoặc ít nhất 80% với các polypeptit HMGB1 có trình tự tương ứng là SEQ ID NO: 20 đến SEQ ID NO: 28.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng, polypeptit HMGB1 có thể được sử dụng để tăng cường đáp ứng miễn dịch với nhiều hơn một polypeptit kháng nguyên có mặt trong vector. Polypeptit từ HMGB1 kích thích đáp ứng miễn dịch ít nhất một phần bằng cách hoạt hóa các tế bào tua và đại thực bào và do đó kích thích sản sinh IL-1, IL-6, IFN- γ và TNF- α . Tốt hơn là, HMGB1 có thể được biểu hiện trên bề mặt của vector.

Ít nhất một phần của polypeptit kháng nguyên và ít nhất một phần của polypeptit HMGB1 hoặc polypeptit kích thích miễn dịch khác có thể có mặt trên bề mặt của vector vacxin. Có mặt trên bề mặt của vector vacxin bao gồm polypeptit nằm bên trong protein xuyên màng, tương tác, liên kết chéo cộng hóa trị hoặc hóa học với protein xuyên màng, lipid màng hoặc carbohydrat neo ở màng. Polypeptit có thể nằm bên trong protein xuyên màng do chứa các axit amin bao gồm polypeptit được liên kết thông qua liên peptit với đầu tận cùng N, đầu tận cùng C hoặc ở vị trí bất kỳ bên trong protein xuyên màng (tức là, được chèn vào giữa 2 axit amin của protein xuyên màng hoặc ở vị trí của một hoặc nhiều axit amin của protein xuyên màng (tức là, đột biến mất đoạn-chèn đoạn). Tốt hơn là, các polypeptit có thể được chèn vào vòng bên ngoài của protein xuyên màng. Protein xuyên màng thích hợp là *cotB* và *lamB*, nhưng người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng có nhiều protein xuyên màng thích hợp khác.

Theo phương thức khác, polypeptit này có thể được liên kết cộng hóa trị hoặc hóa học với các protein, lipid hoặc carbohydrat trên màng, hoặc vỏ capsit nếu vector virus được sử dụng theo phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Ví dụ, các liên kết di-sulfite hoặc liên kết ngang biotin-avidin có thể được sử dụng để biểu hiện polypeptit kháng nguyên và polypeptit HMGB1 trên bề mặt của vector vacxin

này. Tốt hơn là, polypeptit kháng nguyên và polypeptit HMGB1 là một phần của protein dung hợp. Hai polypeptit này có thể được liên kết trực tiếp thông qua liên kết peptit hoặc phân tách bởi cầu nối hoặc phân đoạn của protein thứ ba mà các polypeptit này được chèn vào.

Trong phần “Ví dụ thực hiện sáng chế”, một số vector vacxin chứa polypeptit kháng nguyên *Campylobacter* (cj0113, cj0420 và cj0982) và polypeptit kích thích miễn dịch (các axit amin 140-149 của CD154 hoặc HMGB1 hoặc đoạn chức năng của nó) được mã hóa trên cùng polynucleotit (*lamB*) sao cho các trình tự này nằm trong khung với nhau và với polynucleotit *Salmonella* mà chúng được chèn vào. Theo một số phương án, các cầu nối có thể được thêm vào giữa các trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit kháng nguyên và polypeptit kích thích miễn dịch sao cho trong polypeptit được biểu hiện này một số axit amin phân tách hai polypeptit. Cầu nối này có thể chứa 3 nucleotit mã hóa một axit amin duy nhất, hoặc có thể nhiều hơn, ví dụ 30 nucleotit mã hóa 10 hoặc nhiều axit amin. Trong phần “Ví dụ thực hiện sáng chế”, cầu nối chứa 9 nucleotit được sử dụng và mã hóa cho ba gốc serin. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng nhiều loại cầu nối khác có thể được sử dụng.

Ngoài ra, polynucleotit này có thể có mặt trong một bản sao duy nhất hoặc nhiều bản sao. Ví dụ, ba bản sao của polypeptit kháng nguyên và ba bản sao của polypeptit kích thích miễn dịch có thể được tìm thấy ở cùng vòng ngoài của protein xuyên màng hoặc được biểu hiện bên trong một số protein khác của vector vacxin. Theo các phương án khác, polypeptit kích thích miễn dịch và polypeptit kháng nguyên có thể được mã hóa bởi các polynucleotit riêng biệt.

Vector vacxin tiềm năng để sử dụng trong phương pháp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, *Bacillus*, *Salmonella* (*Salmonella enteritidis*), *Shigella*, *Escherichia* (*E. coli*), *Yersinia*, *Bordetella*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Vibrio* (*Vibrio cholerae*), *Listeria*, *adenovirus*, *poxvirus*, virus herpes, alphavirus, và virus kết hợp với adeno virus. Tốt hơn là, vector vacxin là sinh vật GRAS. Vector vacxin có thể được bất hoạt hoặc giết chết sao cho không có khả năng sao chép. Phương pháp bất hoạt hoặc giết chết vector vacxin vi khuẩn hoặc virus đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phương pháp bất hoạt bằng formalin, phương pháp bất hoạt bằng kháng sinh, xử lý bằng nhiệt và xử lý bằng etanol. Theo một số phương án, vector vacxin có thể là vector trên cơ sở liposom.

Sáng chế cũng đề cập đến được phẩm chứa vector vaccin này và chất mang được dụng. Chất mang được dụng là chất mang bất kỳ thích hợp để sử dụng trong điều kiện in vivo. Chất mang được dụng có thể bao gồm nước, dung dịch đệm, dung dịch glucoza hoặc dịch nuôi cấy vi khuẩn. Các thành phần thích hợp khác của được phẩm theo sáng chế có thể bao gồm các tá được như chất ổn định, chất bảo quản, tá được pha loãng, chất nhũ hóa và tá được trộn. Ví dụ về chất mang hoặc tá được pha loãng được dụng bao gồm chất ổn định như carbohydrat (ví dụ, sorbitol, manitol, tinh bột, sucroza, glucoza, dextran), protein như albumin hoặc casein, tác nhân chứa protein như huyết thanh bò hoặc sữa tách kem và dung dịch đệm (ví dụ, dung dịch đệm phosphat). Đặc biệt là, khi chất ổn định này được bổ sung vào được phẩm, được phẩm này phù hợp để sấy đông khô hoặc sấy phun.

Sáng chế còn mô tả phương pháp tăng cường đáp ứng miễn dịch với *Campylobacter* ở đối tượng bằng cách sử dụng vector vaccin theo sáng chế. Vector vaccin này có thể chứa polypeptit HMGB1 hoặc polypeptit CD154 có khả năng kích thích đáp ứng miễn dịch với vector vaccin và polypeptit kháng nguyên được mô tả nêu trên. Vector vaccin được sử dụng cho đối tượng với lượng có hiệu quả để tăng cường đáp ứng miễn dịch của đối tượng với các polypeptit kháng nguyên không tự nhiên. Tốt hơn là, tăng cường đáp ứng miễn dịch sau khi gây nhiễm với *Campylobacter*.

Tăng cường đáp ứng miễn dịch bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở tăng cường đáp ứng kháng thể. Tốt hơn là, đáp ứng kháng thể IgA được tăng cường, tốt hơn nữa là đáp ứng kháng thể IgA tiết ra được tăng cường sau khi chủng ngừa bằng vector vaccin so với đối chứng. Đối chứng có thể là chính đối tượng trước khi chủng ngừa bằng vector vaccin, đối tượng tương thích được chủng ngừa chỉ bằng vector thuần hoặc vector vaccin biểu hiện polypeptit kháng nguyên không thích hợp hoặc không phải của *Campylobacter*. Đáp ứng kháng thể, tốt hơn là đáp ứng IgA có thể được tăng gấp hai lần, ba lần, bốn lần, năm lần hoặc cao hơn so với đáp ứng ở đối tượng đối chứng. Đáp ứng miễn dịch được tăng cường này cũng có thể làm giảm khả năng sinh trưởng, sao chép và tạo khuẩn lạc của *Campylobacter* ở đối tượng sau khi sử dụng vector vaccin theo sáng chế. Sự giảm này có thể được đánh giá bằng cách gây nhiễm *Campylobacter* cho đối tượng đã được chủng ngừa bằng vector vaccin và theo dõi khả năng tạo khuẩn lạc và sao chép của vi khuẩn này, tức là, sự nhiễm bệnh ở đối tượng so với đối tượng đối chứng. Sự sinh trưởng của *Campylobacter* ở đối tượng có thể được làm giảm ở mức 1 log, 2 log, 3 log, 4 log, 5 log

hoặc thậm chí là nhiều hơn. Sự sinh trưởng của *Campylobacter* ở đối tượng được chủng ngừa bằng vector vaccin theo sáng chế có thể thấp hơn giới hạn phát hiện.

Ngoài ra, sáng chế còn mô tả phương pháp làm tăng khả năng kháng nhiễm khuẩn *Campylobacter*. Cụ thể, phương pháp này bao gồm việc cho đối tượng sử dụng vector vaccin được mô tả trên đây chứa polypeptit kháng nguyên của *Campylobacter* với lượng có hiệu quả để gây đáp ứng miễn dịch. Tăng cường khả năng kháng nhiễm khuẩn *Campylobacter* bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, làm giảm tỷ lệ lây nhiễm *Campylobacters*, hạn chế sự lây lan của *Campylobacters* từ vật chủ này sang vật chủ khác, làm giảm sự sao chép của *Campylobacter* ở đối tượng, xâm lấn hoặc lây lan bên trong một vật chủ, giảm tỷ lệ mắc bệnh liên quan đến nhiễm *Campylobacters*, và giảm thời gian lây nhiễm *Campylobacter*.

Việc sử dụng vector vaccin theo sáng chế có thể ngăn ngừa đối tượng không bị lây nhiễm *Campylobacter* hoặc có dấu hiệu thực thể của bệnh liên quan đến vi khuẩn này, như viêm đường tiêu hóa hoặc hội chứng Guillian – Barre (GBS). Tăng cường khả năng kháng khuẩn *Campylobacter* có thể còn bao gồm tăng sản sinh kháng thể, tốt hơn là kháng thể IgA. Đáp ứng kháng thể, tốt hơn là đáp ứng IgA, có thể tăng gấp hai lần, ba lần, bốn lần, năm lần hoặc cao hơn so với đáp ứng ở đối tượng đối chứng. Đáp ứng miễn dịch được tăng cường này cũng có thể làm giảm khả năng sinh trưởng hoặc sao chép và tạo khuẩn lạc của *Campylobacter* ở đối tượng sau khi sử dụng vector vaccin theo sáng chế. Sự giảm này có thể được đánh giá bằng cách gây nhiễm *Campylobacter* cho đối tượng đã được chủng ngừa bằng vector vaccin và theo dõi khả năng tạo khuẩn lạc và sao chép của vi khuẩn này, tức là, sự nhiễm bệnh cho đối tượng so với đối tượng đối chứng. Sự sinh trưởng của *Campylobacter* ở đối tượng có thể được làm giảm ở mức 1 log, 2 log, 3 log, 4 log, 5 log hoặc thậm chí là nhiều hơn. Sự sinh trưởng của *Campylobacter* ở đối tượng được chủng ngừa bằng vector vaccin theo sáng chế có thể thấp hơn giới hạn phát hiện.

Polypeptit kháng nguyên để sử dụng theo sáng chế có thể được chọn từ cjaD, cjaA hoặc ACE 393 như được mô tả nêu trên. Quá trình chèn polypeptit kháng nguyên vào vector vaccin có thể được thực hiện theo nhiều phương pháp khác nhau đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, hệ đột biến điểm định hướng không vết được mô tả trong công bố đơn yêu cầu cấp patent quốc tế số WO2008/036675, tài liệu này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn toàn

bộ. Vector vaccin theo sáng chế có thể là vi khuẩn được thiết kế để biểu hiện polypeptit kháng nguyên *Campylobacter* kết hợp với polynucleotit có khả năng tăng cường đáp ứng miễn dịch như được mô tả nêu trên. Cụ thể, polypeptit CD154 hoặc HMGB1 có thể được biểu hiện bởi vector vaccin để tăng cường đáp ứng miễn dịch của đối tượng với polypeptit kháng nguyên. Các vector được sử dụng theo sáng chế có thể được làm giảm độc lực hoặc bất hoạt trước khi dùng hoặc sử dụng.

Liều hữu dụng của vector vaccin theo sáng chế sẽ thay đổi phụ thuộc vào độ tuổi, thể trọng và đối tượng cụ thể, cách dùng và đường dùng và loại mầm bệnh cần được kháng bằng đáp ứng miễn dịch. Dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng với liều bất kỳ của vector vaccin đủ để gây đáp ứng miễn dịch. Đối với vector vaccin vi khuẩn, tốt hơn là liều dùng nằm trong khoảng từ 10^3 đến 10^{10} vi khuẩn, từ 10^4 đến 10^9 vi khuẩn, hoặc từ 10^5 đến 10^7 vi khuẩn. Dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng chỉ một lần, hoặc có thể được sử dụng hai hoặc nhiều lần để làm tăng đáp ứng miễn dịch. Ví dụ, dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng hai hoặc nhiều lần cách nhau một tuần, hai tuần, ba tuần hoặc lâu hơn. Vector vaccin vi khuẩn này tốt hơn là có thể sống được trước khi sử dụng, nhưng theo một số phương án, vector vaccin vi khuẩn này có thể được bất hoạt trước khi sử dụng. Theo một số phương án, vector vaccin vi khuẩn này có khả năng sao chép ở đối tượng, tuy nhiên theo các phương án khác, vector vaccin vi khuẩn này có thể được làm giảm độc lực và/hoặc có thể là không có khả năng sao chép ở đối tượng.

Để sử dụng cho người hoặc động vật, dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng theo nhiều đường đưa thuốc khác nhau bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, qua mũi, qua niêm mạc, xịt, trong da, đường tiêm, dưới da, đường uống, khí dung hoặc tiêm bắp. Dùng dưới dạng thuốc nhỏ mắt hoặc bổ sung vào nước uống hoặc thực phẩm cũng là các cách thức sử dụng thích hợp. Đối với gà, dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng in ovo.

Đối tượng sử dụng của phương pháp theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, động vật có xương sống, tốt hơn là động vật có vú, tốt hơn là người, hoặc các loài có lông vũ, tốt hơn là gia cầm như gà hoặc gà tây. Các mô hình động vật bị lây nhiễm khác cũng có thể được sử dụng. Tăng cường đáp ứng miễn dịch bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tạo ra tác dụng phòng ngừa hoặc điều trị qua trung gian hệ miễn dịch của đối tượng. Ví dụ, đáp ứng miễn dịch được tăng cường nếu sau đó đối tượng được bảo vệ không bị lây nhiễm *Campylobacter*. Đặc biệt là, tăng cường đáp ứng miễn dịch có thể

bao gồm tăng cường sản sinh kháng thể, như được thể hiện trên các hình vẽ từ Fig.4 đến Fig.8, tăng cường dịch chuyển lớp chuỗi nặng của kháng thể, quá trình chín của các tế bào trình diện kháng nguyên, kích thích các tế bào T hỗ trợ, kích thích các tế bào T hủy bào hoặc cảm ứng ghi nhớ của tế bào T và B. Trong phần “Ví dụ thực hiện sáng chế”, thấy được sự tăng lượng kháng thể IgA tiết ra sau khi sử dụng vector vacxin theo sáng chế có tương quan với sự bảo vệ đối tượng không bị lây nhiễm *Campylobacter* sau đó.

Hình dung là, một số epitop hoặc kháng nguyên từ mầm bệnh giống hoặc khác nhau có thể được sử dụng kết hợp vào cùng một vector vacxin duy nhất để tạo ra đáp ứng miễn dịch tăng cường kháng lại nhiều kháng nguyên và mầm bệnh liên quan đến chúng. Vector vacxin tái tổ hợp này có thể mã hóa các kháng nguyên từ nhiều vi sinh vật, virus gây bệnh hoặc kháng nguyên liên quan đến khối u. Việc sử dụng vector vacxin có khả năng biểu hiện nhiều kháng nguyên này có ưu điểm là gây cảm ứng hệ miễn dịch kháng lại hai hoặc nhiều bệnh đồng thời.

Polynucleotit khác loại mã hóa các kháng nguyên có thể được chèn vào bộ gen của vector vacxin ở vị trí không thiết yếu bất kỳ hoặc theo cách khác có thể được chứa trên plasmit bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Một vị trí thích hợp để chèn polynucleotit này là vùng bên ngoài của protein xuyên màng hoặc bắt cặp với các trình tự có đích là polynucleotit khác loại cho các quá trình tiết ra. Một ví dụ về protein xuyên màng thích hợp để chèn polynucleotit vào là gen *lamB* của *Salmonella*. Polynucleotit khác loại bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, polynucleotit mã hóa kháng nguyên được chọn từ vi sinh vật hoặc virus gây bệnh không giống với vector vacxin, tức là, polynucleotit không tự nhiên mã hóa polypeptit không tự nhiên.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ dưới đây chỉ để minh họa và không giới hạn phạm vi hoặc yêu cầu bảo hộ của sáng chế. Tất cả các tài liệu tham khảo được trích dẫn trong bản mô tả được kết hợp bằng cách viện dẫn toàn bộ.

Làm giảm độc lực chủng *Salmonella* sử dụng làm vector vacxin

Thực khuẩn thể *Salmonella enteritidis* 13A (*S. enteritidis*) được làm giảm độc lực bằng cách đưa vào các đột biến mất đoạn không thể hồi phục, xác định ở gen *aroA* và/hoặc *htrA* của bộ gen *S. enteritidis* như được mô tả nêu trên (có sẵn với số đăng ký ATCC: PTA-7871, PTA-7872 và PTA-7873). Cụ thể, trình tự gen đích trong bộ gen của

vi khuẩn này được thay thế bằng trình tự gen kháng kanamycin (Km^R). Quá trình này được thực hiện bằng phương pháp 3S-PCR và biến nạp bằng xung điện các sản phẩm 3S-PCR vào tế bào *Salmonella* khả biến bằng xung điện chứa plasmid pKD46. Cây trái hỗn hợp tế bào thu được lên đĩa thạch LB được bổ sung kanamycin để chọn lọc dòng tế bào dương tính chứa gen Km^R . Gen Km^R được chèn vào vùng bộ gen chứa các gen quan tâm (*aroA* hoặc *htrA*) bằng cách áp hai bên gen Km^R bằng trình tự tương đồng với gen quan tâm. Khi thu được đột biến Km^R , đột biến mất đoạn này được kiểm chứng bằng PCR và giải trình tự ADN. Toàn bộ các gen Km^R được loại bỏ trước khi bắt đầu chèn epitop.

Thiết kế vector vacxin *Salmonella* tái tổ hợp

Ba polypeptit kháng nguyên tiềm năng được chọn bao gồm: Omp18/cjaD (cj0113), cjaA (cj0982) và ACE393 (cj0420). Các polypeptit được chọn là như sau: cj0113 (GVSITVEGNCDEWGTDEYNQAWMTTSYAPTS; SEQ ID NO: 10), cj0982c (KDIVLDAEIGGVAKGKDGKEKWMTTSYAPTS; SEQ ID NO: 11), và cj0420 (KVALGVAVPKDSNITSVEDLKDKTLLLNKGTTADAWMTTSYAPTS; SEQ ID NO: 12), tất cả các đoạn chèn còn chứa trình tự axit amin từ 140 đến 149 của CD154.

Chủng *S. enteritidis* tái tổ hợp chứa các bản sao kết hợp ổn định của cj0113-CD154 (cj0113), cj0420-CD154 (cj0420) hoặc cj0982c-CD154 (cj0982) được thiết kế bằng cách sử dụng phương pháp của Cox và các đồng tác giả trong tài liệu: Scarless and site-directed mutagenesis in *Salmonella enteritidis* chromosome. BMC Biotechnol 2007;7:59. Cụ thể, vị trí cắt giới hạn của enzym I-SceI cùng với gen Km^R được chèn vào vòng 9 của gen *lamB* bằng cách thiết kế sản phẩm PCR chứa vị trí cắt giới hạn của enzym I-SceI và gen Km^R được áp hai bên bởi xấp xỉ 200 đến 300 cặp bazơ ADN ở mỗi bên, tương đồng với vùng trước và vùng sau của vòng 9. Các đoạn mồi sử dụng được thể hiện trong bảng 1. Biến nạp bằng xung điện sản phẩm PCR này vào tế bào *Salmonella* giảm độc lực khả biến bằng xung điện chứa plasmid pKD46 và cây trái hỗn hợp tế bào thu được lên đĩa thạch LB được bổ sung kanamycin để chọn lọc dòng tế bào dương tính chứa gen Km^R . Sau khi đột biến Sce-I/ Km được tạo ra ở vòng 9, vùng này được thay thế bằng trình tự ADN epitop lạ được tối ưu bộ ba mã hóa (Burns DM, Beacham IR. Rare codons in *E. coli* and *S. typhimurium* signal sequences. FEBS Lett 1985;189(2):318-24.). Phản ứng 3S-PCR thứ hai này tạo ra đoạn chèn epitop lạ được áp hai bên bởi vùng trước và vùng sau của vòng 9, và biến nạp bằng xung điện sản phẩm PCR thu được vào tế bào SE13A khả biến bằng xung điện chứa đột biến Sce-I/ Km nêu trên. Plasmid pBC-I-SceI

cũng được biến nạp bằng xung điện vào tế bào SE13A này cùng với đoạn chèn nêu trên vì plasmid này tạo ra enzyme I-SceI, enzyme này nhận diện và phân cắt trình tự tạo ra khoảng trống ở vị trí cắt giới hạn của enzyme I-SceI trong vòng 9 của gen *lamB* tại đó trình tự epitop lạ được chèn vào bộ gen SE13A. Plasmid pBC-I-SceI này cũng mang gen kháng cloramphenicol (gen Cm^R) do đoạn chèn epitop lạ mà sẽ thay thế các đột biến gen Km^R phải chứa gen đánh dấu chọn lọc mới để đối chọn lọc với đột biến I-SceI/ Km trước đó. Sau khi biến nạp bằng xung điện, cấy trải các tế bào trên đĩa thạch LB chứa 25µg/mL cloramphenicol để chọn các thể đột biến dương tính.

Bảng 1: Các đoạn mồi dùng trong PCR

Đoạn mồi	Vùng được khuếch đại	Trình tự đoạn mồi (SEQ ID NO)
lam-up-f	Vùng trước của vòng 9	5'TGTACAAGTGGACGCCAATC 3' (SEQ ID NO: 29)
lam-up-r	Vùng trước của vòng 9	5'GTTATCGCCGTCTTTGATATAGCC3' (SEQ ID NO: 30)
lam-dn-f	Vùng sau của vòng 9	5'ATTTCCTCGTTATGCCGCAGC3' (SEQ ID NO: 31)
lam-dn-r	Vùng sau của vòng 9	5'GTAAACAGAGGGGCGACGAG 3'(SEQ ID NO: 32)
Km-f	Gen I-SceI/ Km^r	5'GCTATATCAAAGACGGCGATAAC TAATAACGGTCCTAAGGTAGCGA ATTTCGGGGATCCGTCGA 3'(SEQ ID NO: 33)
Km-r	Gen I-SceI/ Km^r	5'GCTGCGGCATAACGGGAAA TGTAGGCTGGAGCTGCTTCG 3' (SEQ ID NO: 34)
Kan4f	Bên trong gen Km^R	5'CAAAAGCGCTCTGAAGTTCC 3' (SEQ ID NO: 35)
Kan4r	Bên trong gen Km^R	5'GCGTGAGGGGATCTTGAAGT 3' (SEQ ID NO: 36)
lam 3f	Vùng ngoài của vòng 9	5'GCCATCTCGCTTGGTGATAA 3' (SEQ ID NO: 37)

lam 3r	Vùng ngoài của vòng 9	5'CGCTGGTATTTTGCGGTACA 3' (SEQ ID NO: 38)
Cj011 3f	Đoạn chèn có vùng trước của vòng 9	5'TTCATCGGTACCCCATTCATCACAGTTACCTTCA ACGGTGATGCTAACACCGGAGGAGGAGTTATCGC CGTCTTTGATATAGCC3' (SEQ ID NO: 39)
Cj011 3r	Đoạn chèn có vùng sau của vòng 9	5'ATGAATGGGGTACCGATGAATATAACCAGGCGT CCTCCTCCTGGATGACCACCTCCTATGCGCCGACC TCCTCCTCCTCCATTTCCTCGTTATGCCGCAGC3' (SEQ ID NO: 40)
Cj042 0f	Đoạn chèn có vùng trước của vòng 9	5'ATCTTTACCTTTCGCAACACCAACCGATTTCGCA TCCAGAACGATATCTTTGGAGGAGGAGTTATCGCC GTCTTTGATATAGCC3' (SEQ ID NO: 41)
Cj042 0r	Đoạn chèn có vùng sau của vòng 9	5'GTGTTGCGAAAGGTAAAGATGGTAAAGAAAAAT CCTCCTCCTGGATGACCACCTCCTATGCGCCGACC TCCTCCTCCTCCATTTCCTCGTTATGCCGCAGC3' (SEQ ID NO: 42)
Cj098 2c-f	Đoạn chèn có vùng trước của vòng 9	5'GGTTTTATCTTTCAGATCTTCAACGCTGGTGATG TTGCTATCTTTCGGAACCGCAACACCCAGCGCAAC TTTGGAGGAGGAGTTATCGCCGTCTTTGATATAGC C3' (SEQ ID NO: 43)
Cj098 2c-r	Đoạn chèn có vùng sau của vòng 9	5'AAGATCTGAAAGATAAAACCCTGCTGCTGAACA AAGGTACCACCGCGGATGCGTCCTCCTCCTGGATG ACCACCTCCTATGCGCCGACCTCCTCCTCCTCCATT TCCCGTTATGCCGCAGC3' (SEQ ID NO: 44)

Khi cần kiểm chứng độ chính xác của đột biến/đoạn chèn, phương pháp PCR và giải trình tự ADN được thực hiện để khẳng định các trình tự chèn có mặt và chính xác.

Gây nhiễm với *Campylobacter jejuni*

Ba thể phân lập *C. jejuni* kiểu đại từ gà giò được nuôi cấy riêng đến pha sinh trưởng logarit, kết hợp, pha loãng theo thứ tự và cấy trải lên đĩa nuôi cấy để đếm số lượng vi khuẩn nuôi cấy thông thường như đã được mô tả trước (Cole et al. Effect of aeration and storage temperature on *Campylobacter* concentrations in poultry semen.

Poult Sci 2004;83:1734-8.). Các mẫu này được pha loãng đến nồng độ xấp xỉ nằm trong khoảng từ 10^7 đến 10^8 cfu/mL để gây nhiễm bằng ống thông đường miệng sử dụng mật độ quang và so sánh với đường chuẩn được dựng trước đó. Số cfu được sử dụng được xác định theo kinh nghiệm được thông báo cho mỗi thử nghiệm gây miễn dịch (xem dưới đây).

Nghiên cứu gây miễn dịch 1

Trong nghiên cứu gây miễn dịch thứ nhất, gà giò sau khi nở trứng 210 ngày thu được từ nguồn cung cấp tại chỗ được chia ngẫu nhiên vào một trong bốn nhóm thử nghiệm: chỉ sử dụng nước muối (nhóm đối chứng âm), hoặc một trong số ba nhóm dùng vector vaccin: cj0113, cj0420 hoặc cj0982; n=50/nhóm. Mỗi nhóm gà thử nghiệm được nuôi trong buồng riêng quây xung quanh bằng gỗ thông tươi, cho ăn và uống nước. Vào ngày nở trứng, toàn bộ gà ở mỗi nhóm thử nghiệm được chủng ngừa bằng ống thông qua đường miệng bằng 0,25mL dung dịch chứa xấp xỉ 10^8 cfu/mL mẫu thử vector vaccin. Ở ngày 21 sau khi nở trứng, toàn bộ gà ở mỗi nhóm thử nghiệm được gây nhiễm bằng ống thông qua đường miệng bằng 0,25mL dung dịch chứa 1×10^7 cfu *C. jejuni*/mL. Ở ngày 3, 11, 21 (trước khi chủng ngừa lặp lại) và 32 sau khi nở trứng, gan, lá lách và hạch manh tràng của từ 10 đến 15 con gà ở mỗi nhóm thử nghiệm được lấy ra trong điều kiện vô trùng để đánh giá sự xâm lấn tới các cơ quan nội tạng, tạo khuẩn lạc và độ thanh thải của các chủng vector vaccin *Salmonella*. Ở ngày 21 và 32 sau khi nở trứng, phần hồi tràng cũng được lấy ra và xử lý để phân tích qRT-PCR và ở ngày 32 một mẫu hồi tràng riêng biệt được lấy ra và pha loãng với nước muối theo tỷ lệ 1:5 để định lượng globulin miễn dịch A tiết ra (sIgA). Ngoài ra, thu lấy mẫu máu từ 10 con gà ở mỗi nhóm thử nghiệm và sử dụng huyết thanh để đánh giá đáp ứng kháng thể ở ngày 21 và 32 sau khi chủng ngừa.

Nghiên cứu gây miễn dịch 2

Trong nghiên cứu gây miễn dịch thứ 2, gà giò sau khi nở trứng 110 ngày thu được từ nguồn cung cấp tại chỗ được chia ngẫu nhiên vào một trong hai nhóm thử nghiệm: chỉ sử dụng nước muối (nhóm đối chứng chỉ sử dụng chất dẫn thuốc) hoặc vaccin *Salmonella* cj0113 thử nghiệm, (n=55/nhóm). Mỗi nhóm gà thử nghiệm được nuôi trong buồng riêng quây xung quanh bằng gỗ thông tươi, cho ăn và uống nước. Vào ngày nở trứng, toàn bộ gà ở mỗi nhóm thử nghiệm được chủng ngừa bằng ống thông qua đường miệng bằng 0,25mL dung dịch chứa xấp xỉ 10^8 cfu/mL mẫu thử vector vaccin. Ở ngày 21

sau khi nở trứng, toàn bộ gà ở mỗi nhóm thử nghiệm được gây nhiễm bằng ống thông qua đường miệng bằng 0,25ml dung dịch chứa 1×10^7 cfu *C. jejuni*/mL. Ở ngày 3, 11, 21 (trước khi chủng ngừa lặp lại) và 32 sau khi nở trứng, gan, lá lách và hạch manh tràng của từ 10-15 gà ở mỗi nhóm thử nghiệm được lấy ra trong điều kiện vô trùng để đánh giá sự xâm lấn tới các cơ quan nội tạng, tạo khuẩn lạc và độ thanh thải của các chủng vector vaccin *Salmonella*. Và, ở ngày 21 và 32 sau khi nở trứng phần hồi tràng cũng được lấy ra và xử lý để phân tích qRT-PCR. Ngoài ra, thu lấy mẫu máu từ 10 con gà ở mỗi nhóm thử nghiệm và sử dụng huyết thanh để đánh giá đáp ứng kháng thể ở ngày 21 và 32 sau khi nở trứng.

Nghiên cứu gây miễn dịch 3

Nghiên cứu thử nghiệm này là tương tự như thử nghiệm gây miễn dịch thứ 2 (được mô tả nêu trên) ngoại trừ bổ sung thêm nhóm thử thứ ba được sử dụng vector vaccin *S. enteritidis* 13A *aroA/htrA* không chứa epitop *Campylobacter* (SE13A) làm mẫu đối chứng để chủng ngừa theo đường miệng chính vector này. Tất cả các mẫu thu thập là tương tự như ở nghiên cứu gây miễn dịch thứ 2 ngoại trừ ở ngày 32 sau khi nở trứng phần hồi tràng khác được sử dụng để thu lấy lớp niêm mạc để định lượng sIgA tương tự như thử nghiệm 1.

Đánh giá đáp ứng kháng thể *Campylobacter*

Huyết thanh thu được từ các con gà ở cả hai nghiên cứu miễn dịch được sử dụng trong phân tích ELISA để đánh giá đáp ứng kháng thể tương đối. Cụ thể, mỗi giếng của đĩa 96 giếng được phủ bằng *C. jejuni*. Sự dính bám kháng nguyên được để diễn ra qua đêm ở nhiệt độ 4°C, sau đó rửa các đĩa và ức chế bằng Superblock (Pierce) trong thời 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, ủ các đĩa trong 2 giờ với dung dịch huyết thanh pha loãng theo tỷ lệ 1:50 nêu trên. Rửa lại các đĩa, tiếp theo ủ với kháng thể thứ cấp kháng IgG ở gà được đánh dấu Peroxidaza (Jackson Immunolaboratories) thêm 1 giờ. Sau khi rửa lại, các đĩa này được khai triển bằng cách sử dụng kit cơ chất peroxidaza (BD OptEIA, Fisher Scientific) và đo độ hấp thụ bằng thiết bị đo quang phổ ở bước sóng 450nm. Mỗi đĩa chứa mẫu đối chứng dương và mẫu đối chứng âm tương ứng là mẫu máu thu được từ gà được chủng ngừa và huyết thanh gà được gây miễn dịch sơ bộ thay cho huyết thanh từ các nhóm thử nghiệm. Độ hấp thụ thu được đối với các mẫu đối chứng dương, mẫu đối chứng âm và mẫu thử nghiệm được sử dụng để xác định tỷ lệ giữa mẫu

thử nghiệm so với mẫu đối chứng dương (tỷ lệ S/P) theo phương trình sau: (độ hấp thụ trung bình của mẫu thử nghiệm – độ hấp thụ trung bình của mẫu đối chứng âm) / (độ hấp thụ trung bình của mẫu đối chứng dương – độ hấp thụ trung bình của mẫu đối chứng âm) (Brown et al. Detection of antibodies to Mycoplasma gallisepticum in egg yolk versus serum samples. J Clin Microbiol 1991;29(12):2901-3 and Davies et al. Evaluation of the use of pooled serum, pooled muscle tissue fluid (meat juice) and pooled faeces for monitoring pig herds for Salmonella. J Appl Microbiol 2003;95(5):1016-25.). Phương pháp ELISA được sử dụng để phát hiện sIgA là tương tự như phương pháp được mô tả trên đây để phát hiện globulin huyết thanh miễn dịch ngoại trừ việc sử dụng kháng thể của dê kháng IgA ở gà được liên hợp với peroxidaza của cây cải ngựa (GenTex) thay cho kháng thể liên hợp kháng IgG ở gà.

Phân lập ADN và PCR định lượng đối với *C. jejuni*

Quy trình phân lập ADN tổng số từ các mẫu hồi tràng đạt được bằng cách sử dụng Kit QIAmp DNA Stool Mini (Qiagen). Quy trình của nhà sản xuất được biến đổi đôi chút theo cách thức sau: phân hồi tràng được lấy ra để chứa cả lớp niêm mạc và pha loãng với PBS được làm lạnh bằng nước đá theo tỷ lệ 1:5 (khối lượng/thể tích) + 0,05% Tween 20; 1mL hỗn dịch đặc này được bổ sung vào 1mL dung dịch đệm ASL trong ống ly tâm nhỏ dung tích 2,0mL, lắc xoáy và gia nhiệt đến nhiệt độ 70°C trong 5 phút. Sau đó, tuân thủ hướng dẫn của nhà sản xuất đến bước cuối cùng khi ADN được rửa giải vào thể tích cuối là 50uL.

Tiến hành định lượng *C. jejuni* bằng cách sử dụng phương pháp được công bố trước đó được biến đổi đôi chút (Skanseng et al. Comparison of chicken gut colonisation by the pathogens *Campylobacter jejuni* and *Clostridium perfringens* by real-time quantitative PCR. Mol Cell Probes 2006;20(5):269-7)9. Phương pháp định lượng này được tối ưu hóa để sử dụng trên master mix MX3005P (Agilent Technology) và Brilliant II QPCR (Agilent Technology) và toàn bộ các thành phần còn lại của hỗn hợp, đoạn môi, mẫu dò và điều kiện chu trình là tương tự như phương pháp đã công bố.

Đường chuẩn (Fig.1) được xây dựng bằng cách sử dụng dịch nuôi cấy *C. jejuni* chuẩn được pha loãng liên tiếp 10 lần và bổ sung vào lượng hồi tràng không đổi; tiến hành phân lập ADN tổng số như được mô tả nêu trên.

Phân tích thống kê

Phân tích dữ liệu nghiên cứu bằng thuật toán kiểm định “Student’s two-tailed *t-test*” giả định phương sai không đồng nhất để so sánh sự khác biệt giữa các nhóm thử nghiệm và đối chứng bằng phần mềm thống kê JMPTM. Trị số $P < 0,05$ được xem là có sự khác biệt đáng kể.

Kết quả

Độ tương quan giữa phương pháp định lượng *C. jejuni* bằng kỹ thuật đếm vi sinh vật quy ước so với phương pháp qPCR là rất cao (Fig.1), với mức độ tương quan giữa hai phương pháp này là lớn hơn 99%. Trong thử nghiệm 1, 3 ngày sau khi chủng ngừa, quan sát thấy mức độ tạo khuẩn lạc ở hạch manh tràng của 3 vector vaccin thử nghiệm là rất cao; cũng như khả năng xâm lấn tới các cơ quan nội tạng của vector vaccin biểu hiện cj0113 tại cùng thời điểm cũng rất cao (bảng 2). Tuy nhiên, 11 ngày sau khi chủng ngừa, lượng khuẩn lạc của cả ba vector vaccin thử nghiệm đã giảm và 21 ngày sau khi chủng ngừa, các vector vaccin này đã hoàn toàn biến mất khỏi hạch manh tràng cũng như các cơ quan nội tạng (bảng 2). Kết quả của nghiên cứu thử nghiệm 2 cũng tương tự như kết quả của nghiên cứu thử nghiệm 1 nêu trên, sử dụng vector vaccin biểu hiện cj0113 làm đối tượng thử nghiệm, dữ liệu nghiên cứu được thể hiện trong bảng 2.

Bảng 2.

Tỷ lệ phần trăm tạo khuẩn lạc, khả năng xâm lấn và độ thanh thải gan, lá lách hoặc hạch manh tràng bởi *Salmonella* sau khi chủng ngừa bằng một trong ba vector vaccin *Salmonella* thử nghiệm hoặc nước muối bằng ống thông qua đường miệng.

	Gan/Lá lách				Hạch manh tràng			
	Ngày 3	Ngày 11	Ngày 21	Ngày 32	Ngày 3	Ngày 11	Ngày 21	Ngày 32
Thử nghiệm 1								
Nước muối	0	0	0	0	0	0	0	0
cj0420	0	0	0	0	60	0	0	0
Cj0113	0	0	0	0	100	40	0	0
cj0982	50	0	0	0	70	20	0	0
Thử nghiệm 2								
Nước muối	0	0	0	0	0	0	0	0

cj0113	0	20	0	0	50	40	0	0
--------	---	----	---	---	----	----	---	---

Trong các thử nghiệm 1 và 2, tỷ lệ tác động của vector vaccin *Salmonella* tái tổ hợp giảm độc lực được thể hiện dưới dạng tỷ lệ phần trăm của gan, lá lách, hoặc hạch manh tràng biểu hiện dương tính từ 10 con gà. Vào ngày nở trứng, chủng ngừa cho gà bằng ống thông qua đường miệng bằng dung dịch chứa xấp xỉ 10^8 cfu mẫu thử vector vaccin. Ở ngày 3, 11, 21 và 32 sau khi nở trứng, 10 con gà ở mỗi nhóm thử nghiệm được gây chết và thu lấy gan, lá lách, và hạch manh tràng để xác định biểu hiện dương tính/âm tính (+/-) của vector vaccin *Salmonella* tái tổ hợp giảm độc lực. Gan và lá lách của từng gà được kết hợp và đánh giá dưới dạng một mẫu thử.

Gà được gây nhiễm *C. jejuni* ở ngày 21 sau khi chủng ngừa. Các mẫu niêm mạc hồi tràng được thu nhận ở ngày 21 và 32 sau khi chủng ngừa (ngày 0 và 11 sau khi gây nhiễm), và sử dụng để điều chế mẫu ADN và định lượng hàm lượng *C. jejuni* trong ruột gà như được mô tả nêu trên. Việc chủng ngừa bằng các vector vaccin cj0420 và cj0982 đã làm giảm lượng *C. jejuni* có trong các mẫu hồi tràng ở mức xấp xỉ tương ứng là 1 log và 2 log ($P < 0,05$). Bằng cách sử dụng vector vaccin cj0113 đã làm giảm rõ rệt lượng *C. jejuni* ở hồi tràng ở mức 4,8 log ($P < 0,05$) so với mẫu gà đối chứng (Fig.2).

Trong thử nghiệm 2, tiến hành lặp lại nghiên cứu gây miễn dịch sơ bộ chỉ bằng vector vaccin biểu hiện cj0113. Trong nghiên cứu này, các dữ liệu qPCR cho thấy việc chủng ngừa bằng vector vaccin SE biểu hiện cj0113 đã làm giảm lượng *C. jejuni* ở mức xấp xỉ 5 log ở những con gà thử nghiệm khi so sánh với gà chỉ sử dụng nước muối (bảng 3). Ngoài ra, trong thử nghiệm 3, việc chủng ngừa bằng vector vaccin cj0113 đã làm giảm lượng *C. jejuni* ở mức xấp xỉ 4 log, đến dưới các mức có thể phát hiện được ở gà thử nghiệm khi so với gà chỉ sử dụng nước muối hoặc chủng *Salmonella* gốc không chứa đột biến chèn epitop (Fig.3).

Bảng 3.

Kết quả định lượng *Campylobacter jejuni* bằng qPCR ở gà sau 11 ngày khi gây nhiễm *Campylobacter* trong thử nghiệm 2 (n=10).

	Hàm lượng <i>C. jejuni</i> trung bình Log ₁₀ cfu/g hồi tràng	SD ^a	SE ^b
Nước muối	5,00	0,98	0,44

cj0113	0,00	0,00	0,00
--------	------	------	------

Trong thử nghiệm 2, hàm lượng *Campylobacter jejuni* được định lượng ở gà chỉ sử dụng nước muối hoặc vector vaccin *Salmonella*, cj0113 ở nồng độ 10^8 cfu/con gà bằng qPCR sau 11 ngày gây nhiễm bằng *C. jejuni* ở liều xấp xỉ 10^7 cfu/mL. Tiến hành qPCR trên ADN tổng số chiết được bằng phương pháp thông thường từ các lớp niêm mạc hồi tràng. Kết quả định lượng được thể hiện dưới dạng trị số trung bình $\log_{10}$ cfu/g hồi tràng với độ lệch chuẩn (SD^a) và sai số chuẩn (SE^b) ($n=10$).

Các mẫu huyết thanh thu được trong mỗi thử nghiệm ở ngày 21 và 32 sau khi chủng ngừa được sử dụng để định lượng kháng thể IgG kháng đặc hiệu *C. jejuni*. Trong thử nghiệm 1, cả ba vector vaccin (cj0420, cj0113, cj0982) đã làm tăng đáng kể nồng độ kháng thể IgG ở cả hai thời điểm này khi so sánh với nhóm chỉ sử dụng nước muối (Fig.4). Trong thử nghiệm 1, nhóm được chủng ngừa bằng cj0113 thể hiện độ chuẩn kháng thể cao hơn đáng kể khi so với vector vaccin biểu hiện cj0420 và cj0982 (Fig.4). Thử nghiệm ELISA cũng được sử dụng để xác định nồng độ kháng thể sIgA ở niêm mạc đặc hiệu đối với *Campylobacter*. Dữ liệu này cho thấy vector vaccin biểu hiện cj0113 làm tăng đáng kể nồng độ kháng thể sIgA khi so với nhóm chỉ sử dụng nước muối và 2 nhóm được chủng ngừa bằng vector vaccin biểu hiện cj0420 hoặc cj0982 (Fig.5). Kết quả của nghiên cứu thứ hai và thứ ba, chỉ sử dụng vector vaccin biểu hiện cj0113 cũng tương tự như kết quả của thử nghiệm 1, trong đó gà được chủng ngừa bằng các vector vaccin này có nồng độ kháng thể IgG và sIgA đặc hiệu kháng nguyên kháng *C. jejuni* cao hơn đáng kể so với gà chỉ sử dụng nước muối (dữ liệu của thử nghiệm 3 được thể hiện trên Fig.6). Ngoài ra, trong thử nghiệm thứ ba, nồng độ các kháng thể ở nhóm được chủng ngừa bằng chủng (SE13) tự nhiên là tương tự như nhóm đối chứng chỉ sử dụng nước muối (Fig.6).

Nghiên cứu gây miễn dịch bằng vector vaccin *Bacillus*

Quá trình sản sinh protein khác loại để biểu hiện trên tế bào thực vật

Plasmid pHT10 từ MoBioTec/Boca Scientific, Boca Raton, FL (Nguyen et al., 2007) được đột biến ở vị trí tách dòng đa điểm cắt bằng cách chèn trình tự được tối ưu bộ ba mã hóa của *Bacillus subtilis* mã hóa cj0113 và HMGB1 (SEQ ID NO: 4 và 20, tương ứng). Thực hiện giải trình tự ADN để kiểm chứng trình tự chính xác đã được chèn. Sau

đó, plasmit mới được cải biến này được biến nạp vào *Bacillus*. Cụ thể, chủng *Bacillus* được sinh trưởng qua đêm ở nhiệt độ 37°C trên môi trường HS (môi trường Spizizen có bổ sung 0,5% glucoza, 50µg/mL DL-tryptophan, 50µg/mL uraxil, 0,02% sản phẩm thủy phân casein, 0,1% chiết xuất nấm men, 8µg/mL arginin, 0,4µg/mL histidin, 1mM MgSO₄). Ủ 20ml môi trường LS (môi trường Spizizen có bổ sung 0,5% glucoza, 5µg/mL DL-tryptophan, 5µg/mL uraxil, 0,01% sản phẩm thủy phân casein, 0,1% chiết xuất nấm men, 1mM MgSO₄, 2,5mM MgCl₂, 0,5mM CaCl₂) với 1mL dịch nuôi cấy qua đêm ở trên và ủ kết hợp lắc trong 3-4 giờ ở nhiệt độ 30 °C. Hút 1mL dịch môi trường nuôi cấy LS này, bổ sung 10µL EGTA 0,1M và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút. Bổ sung 1-2µg ADN plasmit, lắc trong 2 giờ ở nhiệt độ 37°C, và cấy trải lên các đĩa LB chứa kháng sinh chọn lọc. Chủng *Bacillus* spp. được biến nạp này sẽ sản sinh trình tự epitop khác loại có nguồn gốc từ *Campylobacter* (cj0113) và HMGB1 khi được gây cảm ứng bằng 1mM IPTG.

Nghiên cứu gây miễn dịch

Trong thử nghiệm gây miễn dịch này, gà giò sau 100 ngày nở trứng thu được từ nguồn cung cấp tại chỗ và chia ngẫu nhiên thành một trong bốn nhóm thử nghiệm: chỉ sử dụng nước muối, chỉ sử dụng vector *Bacillus* (BSBB) hoặc 10⁶ hoặc 10⁸ vector vaccin *Bacillus* biểu hiện cj0113, (n=25/nhóm). Mỗi nhóm gà thử nghiệm được nuôi trong buồng riêng quây xung quanh bằng gỗ thông tươi, cho ăn và uống nước. Vào ngày nở trứng, toàn bộ gà ở mỗi nhóm thử nghiệm được chủng ngừa bằng ống thông qua đường miệng bằng 0,25mL dung dịch chứa xấp xỉ 10⁶cfu/mL chủng vector tự nhiên hoặc vector *Bacillus* biểu hiện cj0113. Ở ngày thứ 10, gà tiếp tục được chủng ngừa tương tự như ở ngày nở trứng. Ở ngày 21 sau khi nở trứng, toàn bộ gà ở mỗi nhóm thử nghiệm được gây nhiễm bằng ống thông qua đường miệng bằng 0,25ml dung dịch chứa 1x10⁷cfu *C. jejuni*/mL như được mô tả nêu trên. Ở ngày 3, 11, 21 (trước khi chủng ngừa lặp lại) và 32 sau khi nở trứng, gan, lá lách và hạch manh tràng của từ 10-15 gà ở mỗi nhóm thử nghiệm được lấy ra trong điều kiện vô trùng để đánh giá sự xâm lấn tới các cơ quan nội tạng, tạo khuẩn lạc và độ thanh thải của các chủng vector vaccin này. Ngoài ra, ở ngày 21 và 36 sau khi nở trứng, phần hồi tràng cũng được lấy ra và xử lý để phân tích qRT-PCR. Ngoài ra, thu mẫu máu từ 15 con gà ở mỗi nhóm thử nghiệm và sử dụng huyết thanh của chúng để đánh giá đáp ứng kháng thể ở ngày 21 và 36 sau khi nở trứng.

Kết quả

Các mẫu huyết thanh thu được ở ngày 36 sau khi chủng ngừa được sử dụng để định lượng nồng độ kháng thể IgG đặc hiệu *C. jejuni*. Việc chủng ngừa bằng vector vaccin *Bacillus* biểu hiện polypeptit cj0113 đã làm tăng đáng kể nồng độ kháng thể IgG khi so với nhóm chỉ sử dụng nước muối hoặc vector trống (Fig.7). Phương pháp ELISA cũng được sử dụng để định lượng nồng độ kháng thể sIgA ở niêm mạc hồi tràng đặc hiệu với *Campylobacter* ở ngày 36 sau khi chủng ngừa. Dữ liệu phân tích ELISA cho thấy vector vaccin biểu hiện cj0113 làm tăng đáng kể nồng độ kháng thể sIgA khi so với vector trống (Fig.8).

Gà được gây nhiễm *C. jejuni* vào ngày 24 sau khi chủng ngừa. Các mẫu niêm mạc hồi tràng được thu nhận ở ngày 24 và 36 sau khi chủng ngừa (ngày 0 và 11 sau khi gây nhiễm), và được sử dụng để điều chế mẫu ADN và định lượng hàm lượng *C. jejuni* trong ruột gà như được mô tả nêu trên. Việc chủng ngừa bằng vector vaccin *Bacillus* biểu hiện cj0113 đã làm giảm lượng *C. jejuni* có trong các mẫu hồi tràng ở mức xấp xỉ 3 log ($P < 0,05$) (Fig.9).

Nghiên cứu gây miễn dịch ở gà tây

Do vector vaccin *Salmonella* biểu hiện cj0113 có hiệu quả làm giảm sự phục hồi *Campylobacter* sau khi gây nhiễm ở gà, nên giả thuyết rằng vector vaccin này cũng có hiệu quả ở gà tây. Do đó, để tiếp tục đánh giá hệ vector chứa epitop này, thử nghiệm sau được thực hiện để đánh giá độ hiệu quả của vector vaccin kháng lại sự gây nhiễm *C. coli* này ở gà tây.

Vector vaccin Δ SE-cj0113 được thiết kế cấu trúc như mô tả nêu trên. Thực khuẩn thể *Salmonella enteritidis* 13A (SE13A) được sử dụng làm chủng khung cho vector vaccin này. Thực khuẩn thể phân lập được này được làm giảm độc lực hai lần bằng cách gây đột biến mất đoạn không hồi phục ở các gen *aroA* và/hoặc *htrA* như được mô tả nêu trên. Sau đó, các chủng tái tổ hợp chứa các đột biến mất đoạn này tiếp tục được cải biến để kết hợp đoạn chèn cj0113 và phân tử kích thích miễn dịch CD-154 (Δ SE-cj0113). Các trình tự này được kết hợp vào vector như mô tả nêu trên.

Trong thử nghiệm này, 70 con gà tây thu được từ nguồn cung cấp tại chỗ được chia ngẫu nhiên vào một trong hai nhóm thử nghiệm có đánh dấu. 30 con gà tây được chủng ngừa bằng ống thông qua đường miệng bằng 10^8 cfu Δ SE-cj0113/con gà tây và các

con gà tây còn lại được chủng ngừa bằng nước muối. Vào ngày 21, gà tây được gây nhiễm bằng $1,5 \times 10^8$ cfu *C. coli* /con gà tây bằng ống thông qua đường miệng. Gan, lá lách và hạch manh tràng được lấy ra trong điều kiện vô trùng ở ngày 3 (N=10), ngày 21 (N=10) và ngày 35 (N=10) để phát hiện sự phục hồi của vector vacxin này bằng cách làm giàu trên canh trường tetrathionat và cấy trải lên thạch Brilliant Green. Ở ngày 21 và 35, các mẫu thức ăn (N=10) và mô (N=5) được thu nhận để tiếp tục phân tích. Phân tích mẫu thức ăn từ hồi tràng của gà đã được chủng ngừa bằng cách sử dụng phương pháp qPCR để định lượng hàm lượng *C. coli*. Các mẫu mô từ vùng tương tự được thu nhận và sử dụng để tách ARN tổng số. Đáp ứng vacxin interferon-gama và tương tự TNF-alpha đã được đánh giá.

Kết quả

Tương tự như kết quả thử nghiệm trên gà, gà tây đã thể hiện đáp ứng miễn dịch đáng kể sau khi chủng ngừa bằng vector vacxin *Salmonella* biểu hiện cj0113. Sau khi gây nhiễm, có sự giảm lượng *Campylobacter coli* ở hồi tràng ở mức khoảng 5 log so với mẫu đối chứng chỉ sử dụng vector *Salmonella* tự nhiên (Fig.10). Việc chủng ngừa bằng vector vacxin *Salmonella* biểu hiện cj0113 ở gà tây có hiệu quả tương tự như ở gà.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Vector vacxin chứa trình tự polynucleotit thứ nhất, trình tự polynucleotit thứ nhất này mã hóa polypeptit kháng nguyên bao gồm trình tự SEQ ID NO: 7, trong đó trình tự polynucleotit thứ nhất không liên hợp tự nhiên với vector này.
2. Vector vacxin theo điểm 1, trong đó vector này còn chứa trình tự polynucleotit thứ hai mã hóa polypeptit kích thích miễn dịch không liên hợp tự nhiên với vector này.
3. Vector vacxin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 2, trong đó vector này là vi khuẩn.
4. Vector vacxin theo điểm 3, trong đó vi khuẩn này thuộc chi được chọn từ *Salmonella*, *Escherichia*, *Bacillus* hoặc *Lactobacillus*.
5. Vector vacxin theo điểm 3, trong đó trình tự polynucleotit thứ nhất và trình tự polynucleotit thứ hai được kết hợp vào bộ gen của vi khuẩn.
6. Vector vacxin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 5, trong đó vector này chứa nhiều hơn một bản sao của trình tự polynucleotit thứ nhất, nhiều hơn một bản sao của trình tự polynucleotit thứ hai hoặc nhiều hơn một bản sao của trình tự polynucleotit thứ nhất và trình tự polynucleotit thứ hai.
7. Vector vacxin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 6, trong đó trình tự polynucleotit thứ nhất được liên kết trong khung với trình tự polynucleotit thứ hai.
8. Vector vacxin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 7, trong đó polypeptit kháng nguyên và polypeptit kích thích miễn dịch được biểu hiện trên bề mặt của vector này.
9. Vector vacxin theo điểm 8, trong đó trình tự polynucleotit thứ nhất và trình tự polynucleotit thứ hai được chèn vào trong trình tự polynucleotit thứ ba mã hóa phần bên ngoài của protein xuyên màng.
10. Vector vacxin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 9, trong đó polypeptit kích thích miễn dịch là polypeptit CD154 hoặc polypeptit HMGB1.
11. Vector vacxin theo điểm 10, trong đó polypeptit CD154 có khả năng liên kết CD40, polypeptit CD154 này có ít hơn 50 axit amin và chứa các axit amin từ 140 đến 149 của trình tự SEQ ID NO:13 hoặc thể tương đồng của nó.

12. Vector vacxin theo điểm 11, trong đó polypeptit CD154 bao gồm polypeptit được chọn từ các trình tự SEQ ID NO: 15 đến SEQ ID NO: 19.
13. Vector vacxin theo điểm 10, trong đó polypeptit HMGB1 bao gồm polypeptit được chọn từ ít nhất một trong số các trình tự từ SEQ ID NO: 20 đến SEQ ID NO: 28 hoặc đoạn peptit của ít nhất một trong số các trình tự từ SEQ ID NO: 20 đến SEQ ID NO: 28.
14. Vector vacxin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 13, trong đó trình tự polypeptit kháng nguyên là SEQ ID NO: 7 và polypeptit kích thích miễn dịch được chọn từ một trong số các trình tự từ SEQ ID NO: 13 đến SEQ ID NO: 28 hoặc trong đó trình tự polypeptit kháng nguyên và trình tự polypeptit kích thích miễn dịch là SEQ ID NO:10.
15. Vector vacxin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14, vector này còn chứa trình tự polynucleotit thứ ba mã hóa polypeptit kháng nguyên thứ hai.
16. Dược phẩm chứa vector vacxin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 15 và chất mang dược dụng.

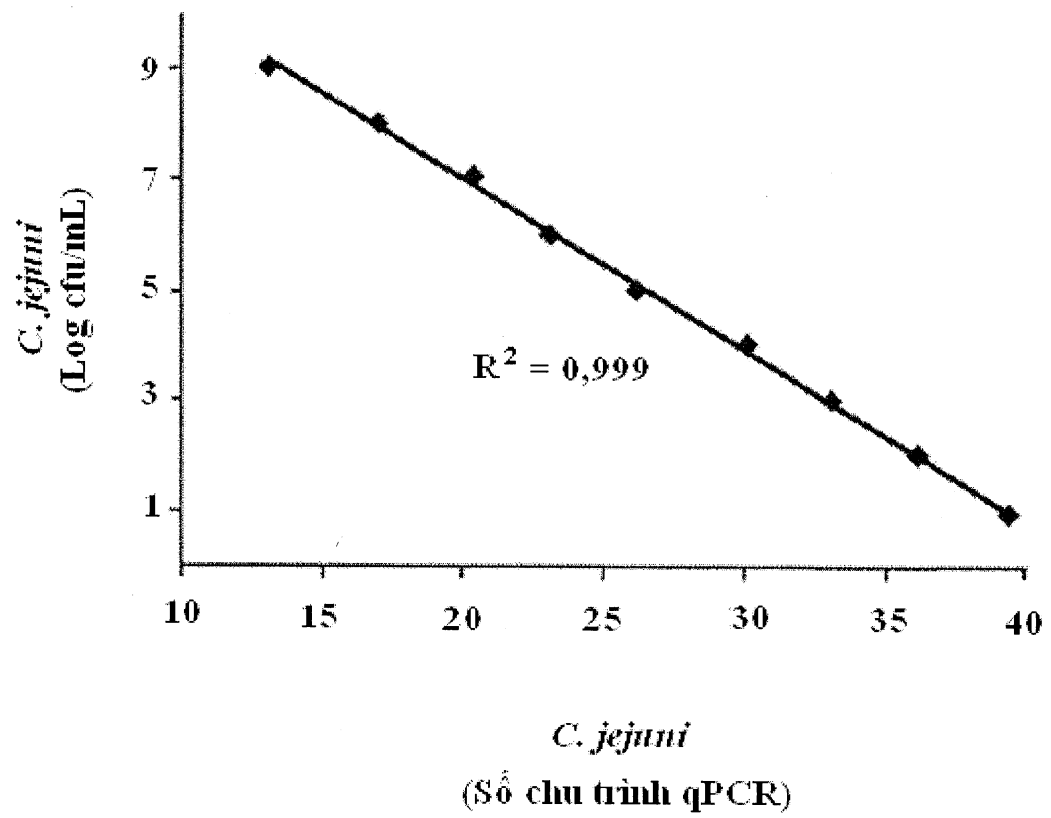


Fig.1

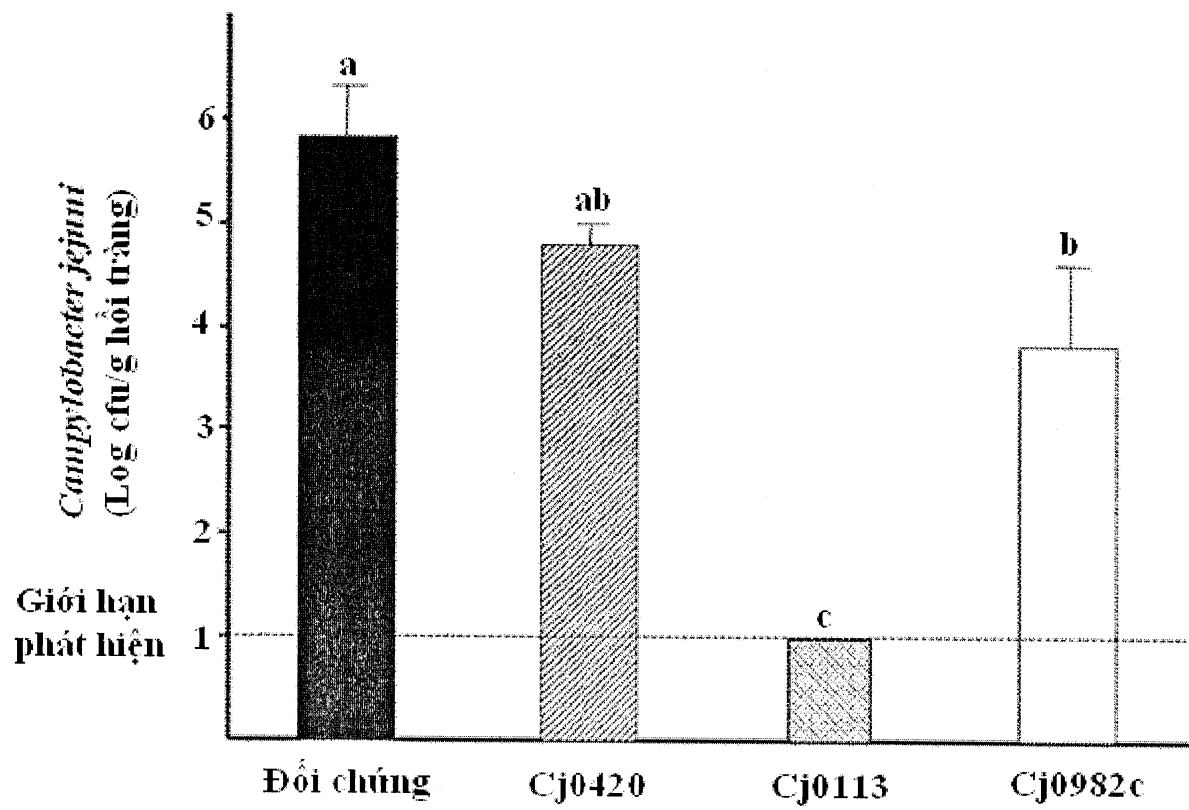


Fig.2

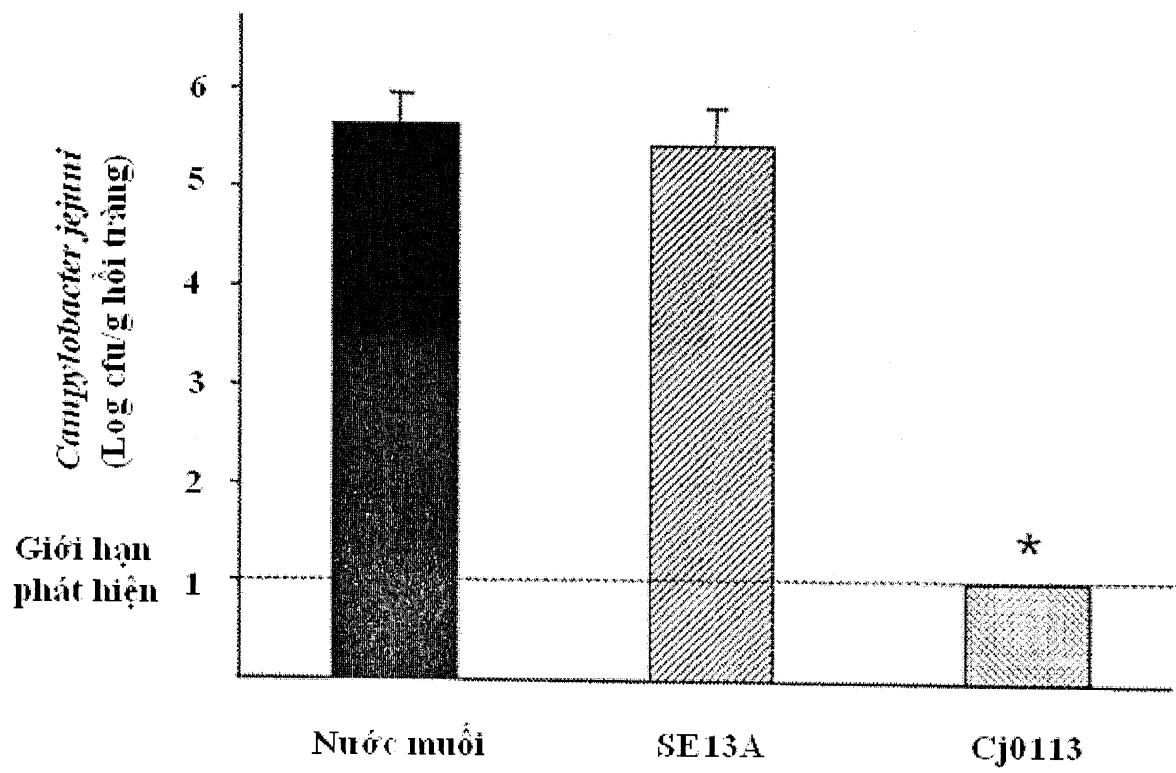


Fig.3

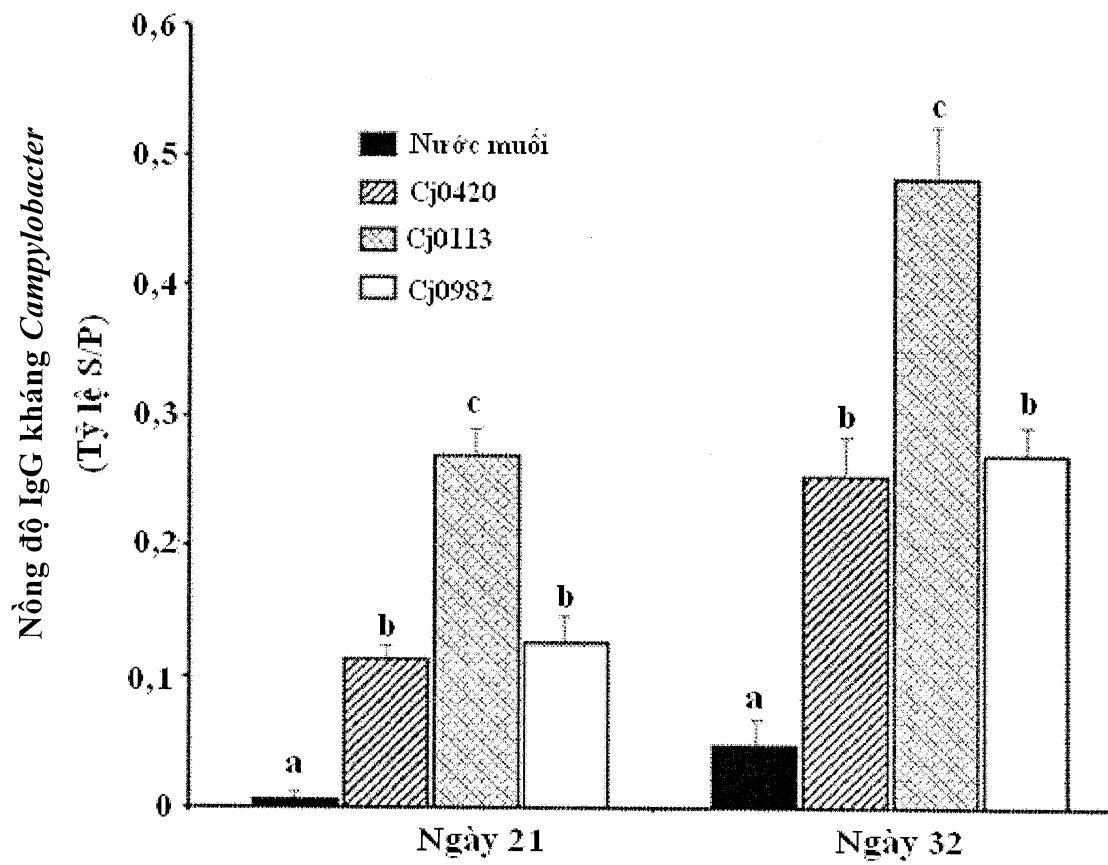


Fig.4

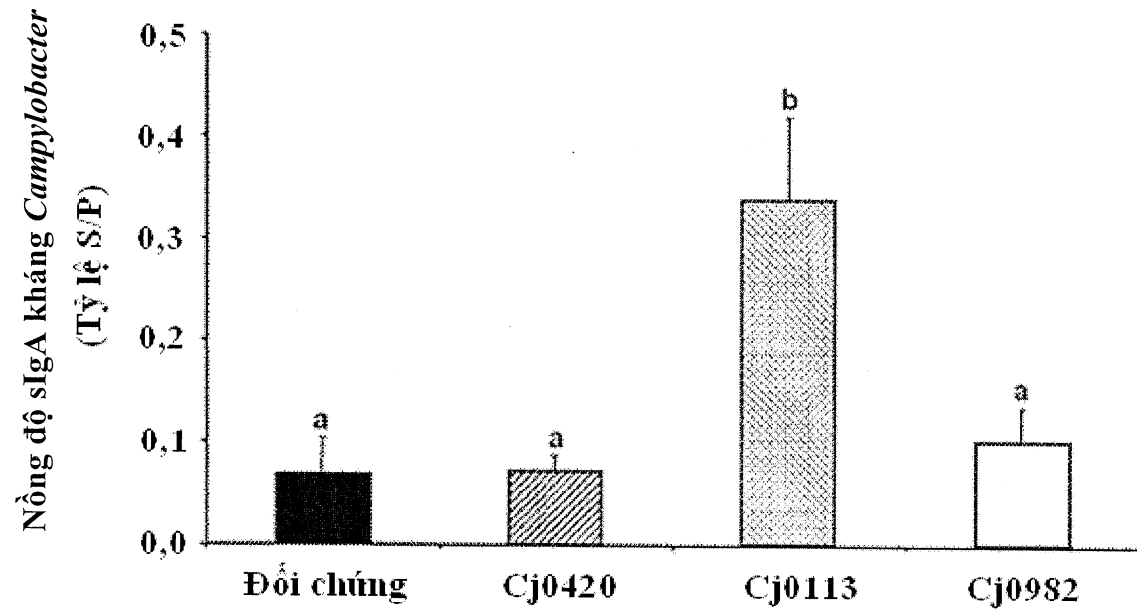


Fig.5

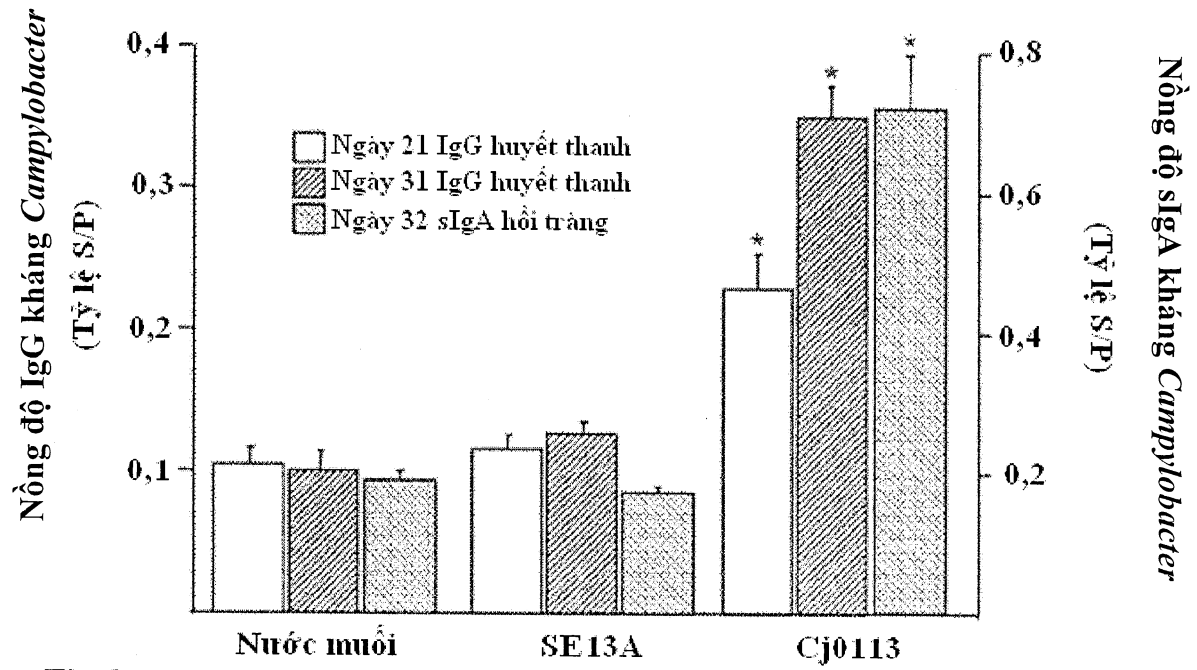


Fig.6

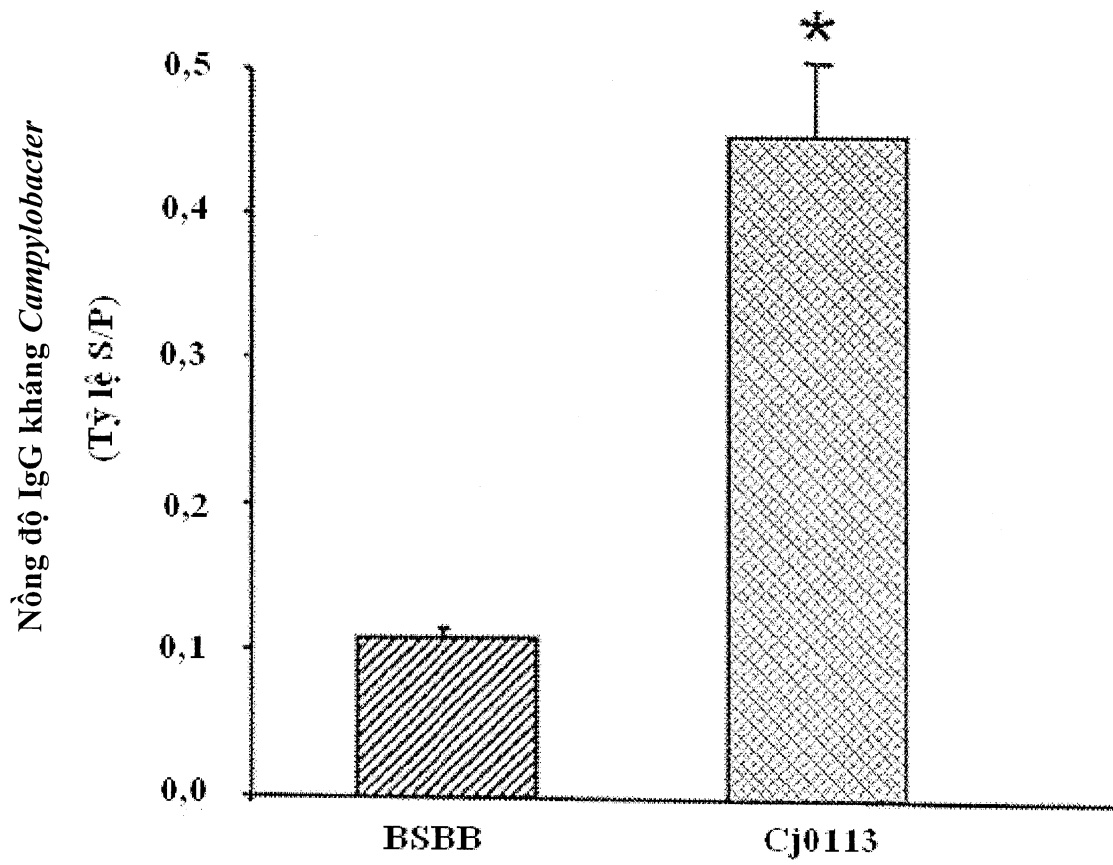


Fig.7

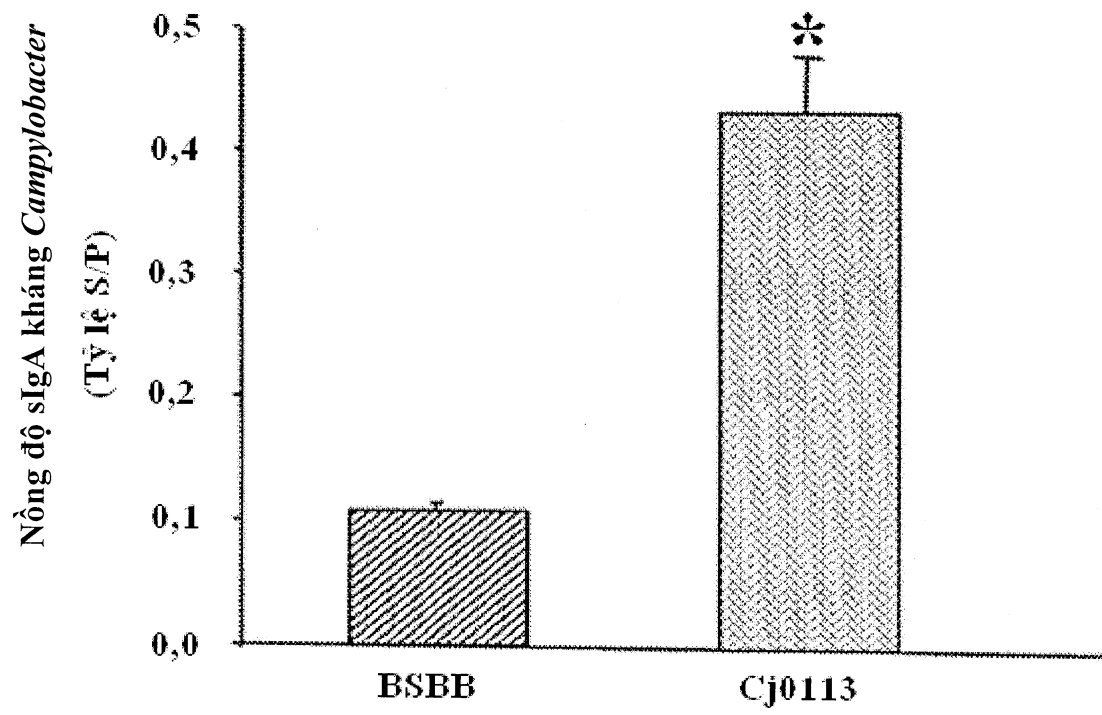


Fig.8

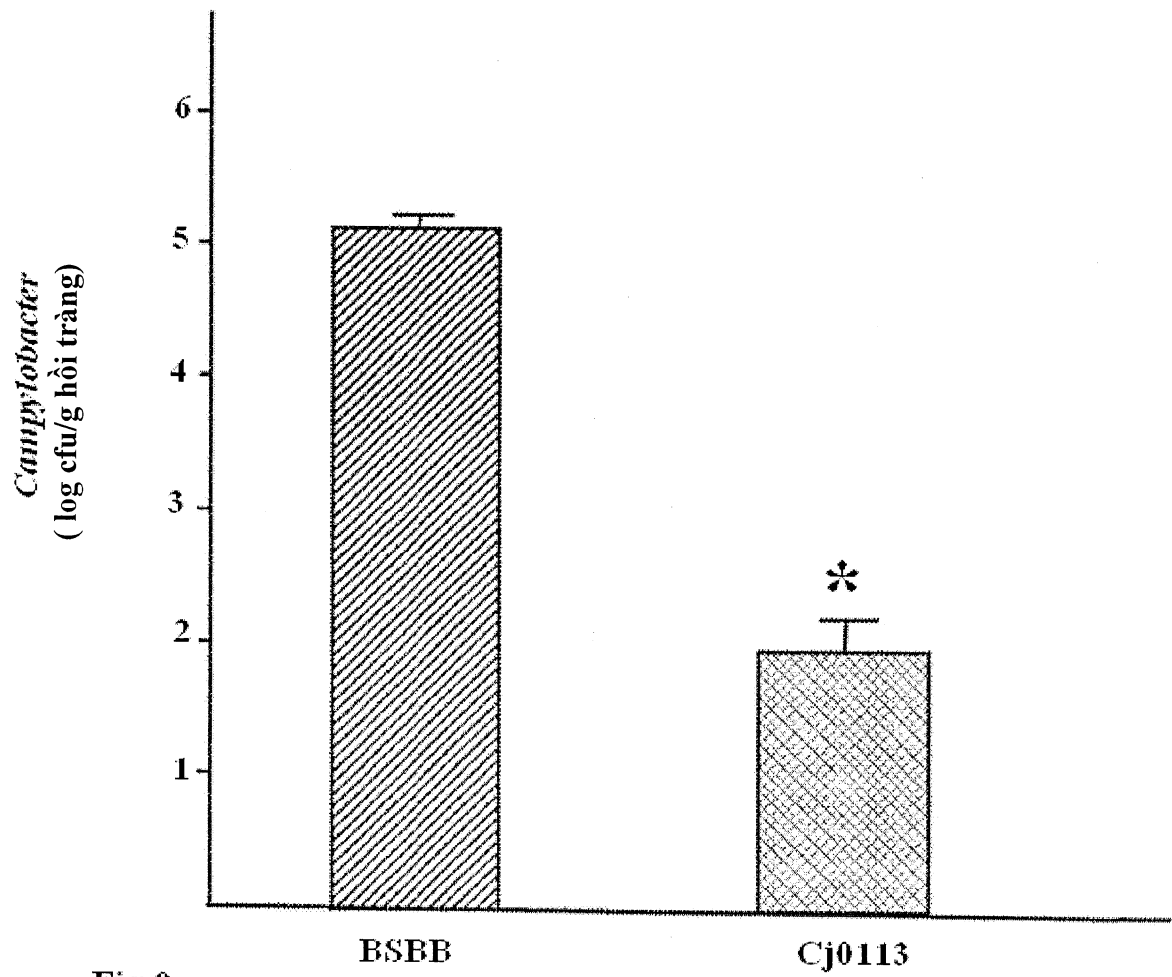


Fig.9

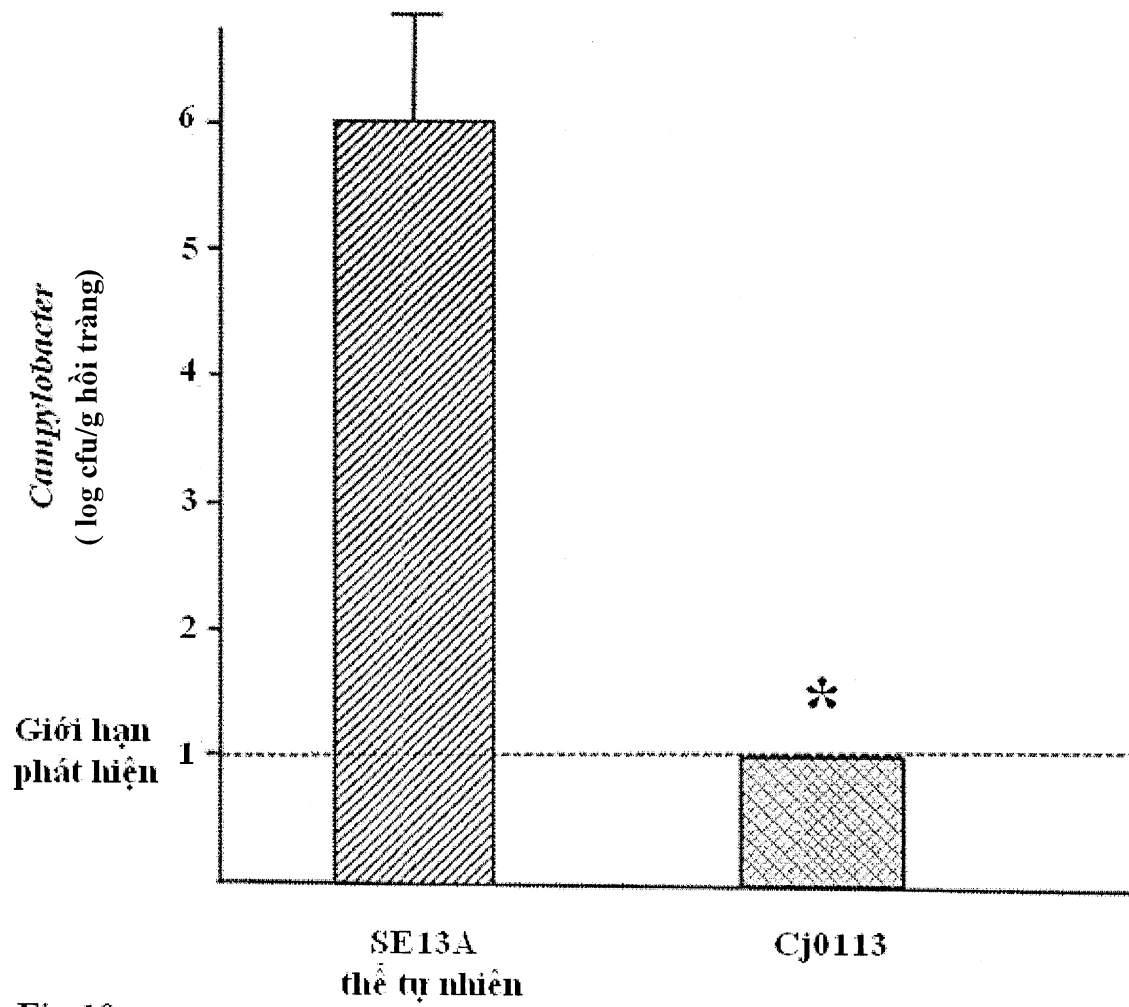


Fig.10

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ARKANSAS
 <120> VECTO VACXIN ĐỂ LÀM GIẢM NHIỄM KHUẨN *CAMPYLOBACTER* VÀ DUỘC PHẨM CHỨA VECTO NÀY
 <130> 5658-00102
 <150> US 61/353,039
 <151> 2010-06-09
 <160> 44
 <170> PatentIn phiên bản 3.5
 <210> 1
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> *Campylobacter jejuni* cjaD
 <400> 1
 Met Lys Lys Ile Leu Phe Thr Ser Ile Ala Ala Leu Ala Val Val Ile
 1 5 10 15
 Ser Gly Cys Ser Thr Lys Ser Thr Ser Val Ser Gly Asp Ser Ser Val
 20 25 30
 Asp Ser Asn Arg Gly Ser Gly Gly Ser Asp Gly Trp Asp Ile Asp Ser
 35 40 45
 Lys Ile Ser Gln Leu Asn Asp Thr Leu Asn Lys Val Tyr Phe Asp Phe
 50 55 60
 Asp Lys Phe Asn Ile Arg Pro Asp Met Gln Asn Val Val Ser Thr Asn
 65 70 75 80
 Ala Asn Ile Phe Asn Thr Glu Val Ser Gly Val Ser Ile Thr Val Glu
 85 90 95
 Gly Asn Cys Asp Glu Trp Gly Thr Asp Glu Tyr Asn Gln Ala Leu Gly
 100 105 110
 Leu Lys Arg Ala Lys Ala Val Lys Glu Ala Leu Ile Ala Lys Gly Val
 115 120 125
 Asn Ala Asp Arg Ile Ala Val Lys Ser Tyr Gly Glu Thr Asn Pro Val
 130 135 140
 Cys Thr Glu Lys Thr Lys Ala Cys Asp Ala Gln Asn Arg Arg Ala Glu
 145 150 155 160
 Phe Lys Leu Ser Arg
 165
 <210> 2
 <211> 279
 <212> PRT
 <213> *Campylobacter jejuni* cjaA
 <400> 2

```

Met Lys Lys Ile Leu Leu Ser Val Leu Thr Ala Phe Val Ala Val Val
1           5           10           15
Leu Ala Ala Cys Gly Gly Asn Ser Asp Ser Lys Thr Leu Asn Ser Leu
          20           25           30
Asp Lys Ile Lys Gln Asn Gly Val Val Arg Ile Gly Val Phe Gly Asp
          35           40           45
Lys Pro Pro Phe Gly Tyr Val Asp Glu Lys Gly Asn Asn Gln Gly Tyr
          50           55           60
Asp Ile Ala Leu Ala Lys Arg Ile Ala Lys Glu Leu Phe Gly Asp Glu
65           70           75           80
Asn Lys Val Gln Phe Val Leu Val Glu Ala Ala Asn Arg Val Glu Phe
          85           90           95
Leu Lys Ser Asn Lys Val Asp Ile Ile Leu Ala Asn Phe Thr Gln Thr
          100          105          110
Pro Gln Arg Ala Glu Gln Val Asp Phe Cys Ser Pro Tyr Met Lys Val
          115          120          125
Ala Leu Gly Val Ala Val Pro Lys Asp Ser Asn Ile Thr Ser Val Glu
          130          135          140
Asp Leu Lys Asp Lys Thr Leu Leu Leu Asn Lys Gly Thr Thr Ala Asp
145          150          155          160
Ala Tyr Phe Thr Gln Asn Tyr Pro Asn Ile Lys Thr Leu Lys Tyr Asp
          165          170          175
Gln Asn Thr Glu Thr Phe Ala Ala Leu Met Asp Lys Arg Gly Asp Ala
          180          185          190
Leu Ser His Asp Asn Thr Leu Leu Phe Ala Trp Val Lys Asp His Pro
          195          200          205
Asp Phe Lys Met Gly Ile Lys Glu Leu Gly Asn Lys Asp Val Ile Ala
          210          215          220
Pro Ala Val Lys Lys Gly Asp Lys Glu Leu Lys Glu Phe Ile Asp Asn
225          230          235          240
Leu Ile Ile Lys Leu Gly Gln Glu Gln Phe Phe His Lys Ala Tyr Asp
          245          250          255
Glu Thr Leu Lys Ala His Phe Gly Asp Asp Val Lys Ala Asp Asp Val
          260          265          270
Val Ile Glu Gly Gly Lys Ile
          275
<210> 3
<211> 190
<212> PRT
<213> Campylobacter jejuni ACE 393
<400> 3

```

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

<210> 4

<211> 120

<212> ADN

<213> Campylobacter jejuni cjaD

<400> 4

tcctcctccg gtgtagcat caccgttgaa ggtaactgtg atgaatgggg taccgatgaa 60

tataaccagg cgctcctctc ctggatgacc acctcctatg cgccgacctc ctctcctcc 120

<210> 5

<211> 162

<212> ADN

<213> Campylobacter jejuni cjaA

<400> 5

tcctcctcca aagttgcgct ggggtgtgct gttccgaaag atagcaacat caccagcgtt 60

gaagatctga aagataaaac cctgctgctg aacaaaggta ccaccgcgga tgcgtcctcc 120

tcctggatga ccacctccta tgcgccgacc tcctcctcct cc 162

<210> 6

<211> 120

<212> ADN

<213> Campylobacter jejuni ACE 393

<400> 6

```
tccctcctcca aagatatcgt tctggatgcg gaaatcggtg gtgttgcgaa aggtaaagat      60
ggtaaagaaa aatcctcctc ctggatgacc acctcctatg cgccgacctc ctctcctcc      120
```

<210> 7

<211> 21

<212> PRT

<213> Campylobacter jejuni Cj0113

<400> 7

```
Gly Val Ser Ile Thr Val Glu Gly Asn Cys Asp Glu Trp Gly Thr Asp
1              5              10              15
Glu Tyr Asn Gln Ala
                20
```

<210> 8

<211> 21

<212> PRT

<213> Campylobacter jejuni Cj0982

<400> 8

```
Lys Asp Ile Val Leu Asp Ala Glu Ile Gly Gly Val Ala Lys Gly Lys
1              5              10              15
Asp Gly Lys Glu Lys
                20
```

<210> 9

<211> 35

<212> PRT

<213> Campylobacter jejuni Cj0420

<400> 9

```
Lys Val Ala Leu Gly Val Ala Val Pro Lys Asp Ser Asn Ile Thr Ser
1              5              10              15
Val Glu Asp Leu Lys Asp Lys Thr Leu Leu Leu Asn Lys Gly Thr Thr
                20              25              30
Ala Asp Ala
```

35

<210> 10

<211> 31

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Peptit tổng hợp: Cj0113-CD154

<400> 10

Gly Val Ser Ile Thr Val Glu Gly Asn Cys Asp Glu Trp Gly Thr Asp
 1 5 10 15
 Glu Tyr Asn Gln Ala Trp Met Thr Thr Ser Tyr Ala Pro Thr Ser
 20 25 30

<210> 11

<211> 31

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Peptit tổng hợp: Cj0982-CD154

<400> 11

Lys Asp Ile Val Leu Asp Ala Glu Ile Gly Gly Val Ala Lys Gly Lys
 1 5 10 15
 Asp Gly Lys Glu Lys Trp Met Thr Thr Ser Tyr Ala Pro Thr Ser
 20 25 30

<210> 12

<211> 45

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Peptit tổng hợp: Cj0420-CD154

<400> 12

Lys Val Ala Leu Gly Val Ala Val Pro Lys Asp Ser Asn Ile Thr Ser
 1 5 10 15
 Val Glu Asp Leu Lys Asp Lys Thr Leu Leu Leu Asn Lys Gly Thr Thr
 20 25 30

Ala Asp Ala Trp Met Thr Thr Ser Tyr Ala Pro Thr Ser
 35 40 45

<210> 13

<211> 272

<212> PRT

<213> Gallus gallus

<220>

<221> đặc tính hỗn hợp

<223> CD154 gà

<400> 13

Met Asn Glu Ala Tyr Ser Pro Ala Ala Pro Arg Pro Met Gly Ser Thr
 1 5 10 15
 Ser Pro Ser Thr Met Lys Met Phe Met Cys Phe Leu Ser Val Phe Met
 20 25 30
 Val Val Gln Thr Ile Gly Thr Val Leu Phe Cys Leu Tyr Leu His Met

35	40	45
Lys Met Asp Lys Met Glu Glu Val Leu Ser Leu Asn Glu Asp Tyr Ile		
50	55	60
Phe Leu Arg Lys Val Gln Lys Cys Gln Thr Gly Glu Asp Gln Lys Ser		
65	70	75
Thr Leu Leu Asp Cys Glu Lys Val Leu Lys Gly Phe Gln Asp Leu Gln		
85	90	95
Cys Lys Asp Arg Thr Ala Ser Glu Glu Leu Pro Lys Phe Glu Met His		
100	105	110
Arg Gly His Glu His Pro His Leu Lys Ser Arg Asn Glu Thr Ser Val		
115	120	125
Ala Glu Glu Lys Arg Gln Pro Ile Ala Thr His Leu Ala Gly Val Lys		
130	135	140
Ser Asn Thr Thr Val Arg Val Leu Lys Trp Met Thr Thr Ser Tyr Ala		
145	150	155
Pro Thr Ser Ser Leu Ile Ser Tyr His Glu Gly Lys Leu Lys Val Glu		
165	170	175
Lys Ala Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Val Ser Phe Cys Thr Lys		
180	185	190
Ala Ala Ala Ser Ala Pro Phe Thr Leu Tyr Ile Tyr Leu Tyr Leu Pro		
195	200	205
Met Glu Glu Asp Arg Leu Leu Met Lys Gly Leu Asp Thr His Ser Thr		
210	215	220
Ser Thr Ala Leu Cys Glu Leu Gln Ser Ile Arg Glu Gly Gly Val Phe		
225	230	235
Glu Leu Arg Gln Gly Asp Met Val Phe Val Asn Val Thr Asp Ser Thr		
245	250	255
Ala Val Asn Val Asn Pro Gly Asn Thr Tyr Phe Gly Met Phe Lys Leu		
260	265	270

<210> 14

<211> 261

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> đặc tính hỗn hợp

<223> CD154 người

<400> 14

Met Ile Glu Thr Tyr Asn Gln Thr Ser Pro Arg Ser Ala Ala Thr Gly		
1	5	10
Leu Pro Ile Ser Met Lys Ile Phe Met Tyr Leu Leu Thr Val Phe Leu		
20	25	30

Ile Thr Gln Met Ile Gly Ser Ala Leu Phe Ala Val Tyr Leu His Arg
 35 40 45
 Arg Leu Asp Lys Ile Glu Asp Glu Arg Asn Leu His Glu Asp Phe Val
 50 55 60
 Phe Met Lys Thr Ile Gln Arg Cys Asn Thr Gly Glu Arg Ser Leu Ser
 65 70 75 80
 Leu Leu Asn Cys Glu Glu Ile Lys Ser Gln Phe Glu Gly Phe Val Lys
 85 90 95
 Asp Ile Met Leu Asn Lys Glu Glu Thr Lys Lys Glu Asn Ser Phe Glu
 100 105 110
 Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser
 115 120 125
 Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly
 130 135 140
 Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln
 145 150 155 160
 Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr
 165 170 175
 Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser
 180 185 190
 Leu Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala
 195 200 205
 Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His
 210 215 220
 Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn
 225 230 235 240
 Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe
 245 250 255
 Gly Leu Leu Lys Leu
 260

<210> 15

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> đặc tính hỗn hợp

<223> CD154 một phần của người

<400> 15

Trp Ala Glu Lys Gly Tyr Tyr Thr Met Ser Cys

1

5

10

<210> 16

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Gallus gallus
 <220>
 <221> đặc tính hỗn hợp
 <223> Peptit CD154 ở gà
 <400> 16
 Trp Met Thr Thr Ser Tyr Ala Pro Thr Ser Ser
 1 5 10
 <210> 17
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Anas sp.
 <220>
 <221> đặc tính hỗn hợp
 <223> Peptit CD154 ở vịt
 <400> 17
 Trp Asn Lys Thr Ser Tyr Ala Pro Met Asn
 1 5 10
 <210> 18
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus sp.
 <220>
 <221> đặc tính hỗn hợp
 <223> Peptit CD154 ở chuột
 <400> 18
 Trp Ala Lys Lys Gly Tyr Tyr Thr Met Lys
 1 5 10
 <210> 19
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Bos taurus
 <220>
 <221> đặc tính hỗn hợp
 <223> Peptit CD154 ở bò
 <400> 19
 Trp Ala Pro Lys Gly Tyr Tyr Thr Leu Ser
 1 5 10
 <210> 20
 <211> 190

<212> PRT

<213> Gallus gallus

<220>

<221> đặc tính hỗn hợp

<223> Axit amin HMGB1 ở gà

<400> 20

```

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

```

<210> 21

<211> 85

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Peptit tổng hợp: Hộp a1 của HMGB1

<400> 21

```

Met Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr
1           5           10           15
Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro
          20           25           30

```

Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg
 35 40 45
 Trp Lys Thr Met Ser Ser Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala
 50 55 60
 Lys Ala Asp Lys Leu Arg Tyr Glu Lys Glu Met Lys Asn Tyr Val Pro
 65 70 75 80
 Pro Lys Gly Glu Thr
 85

<210> 22
 <211> 54
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Peptit tổng hợp: Hộp a2 của HMGB1
 <400> 22

Pro Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu
 1 5 10 15
 Arg Trp Lys Thr Met Ser Ser Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met
 20 25 30
 Ala Lys Ala Asp Lys Leu Arg Tyr Glu Lys Glu Met Lys Asn Tyr Val
 35 40 45
 Pro Pro Lys Gly Glu Thr
 50

<210> 23
 <211> 73
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Peptit tổng hợp: Hộp b1 của HMGB1
 <400> 23

Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe
 1 5 10 15
 Cys Ser Glu Phe Arg Pro Lys Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser
 20 25 30
 Ile Gly Asp Val Ala Lys Lys Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala
 35 40 45
 Ala Asp Asp Lys Gln Pro Tyr Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu
 50 55 60
 Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala Ala Tyr
 65 70
 <210> 24

<211> 69

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Peptit tổng hợp: Hộp b2 của HMGB1

<400> 24

Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu
1 5 10 15

Phe Arg Pro Lys Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp
20 25 30

Val Ala Lys Lys Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala Asp Asp
35 40 45

Lys Gln Pro Tyr Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu
50 55 60

Lys Asp Ile Ala Ala
65

<210> 25

<211> 21

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Peptit tổng hợp: Domain liên kết RAGE của HMGB1

<400> 25

Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe
1 5 10 15

Cys Ser Glu Phe Arg
20

<210> 26

<211> 33

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Peptit tổng hợp: Hoạt tính xytokin tiền viêm của HMGB1

<400> 26

Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala Ala Tyr Arg Ala Lys Gly
1 5 10 15

Lys Val Asp Ala Gly Lys Lys Val Val Ala Lys Ala Glu Lys Ser Lys
20 25 30

Lys

<210> 27

<211> 215
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>

<221> đặc tính hỗn hợp

<223> HMGB1

<400> 27

```

Met Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr
1           5           10           15
Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro
      20           25           30
Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg
      35           40           45
Trp Lys Thr Met Ser Ala Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala
      50           55           60
Lys Ala Asp Lys Ala Arg Tyr Glu Arg Glu Met Lys Thr Tyr Ile Pro
65           70           75           80
Pro Lys Gly Glu Thr Lys Lys Lys Phe Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys
      85           90           95
Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu Tyr Arg Pro Lys
      100          105          110
Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys Lys
      115          120          125
Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala Asp Asp Lys Gln Pro Tyr
      130          135          140
Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala
      145          150          155          160
Ala Tyr Arg Ala Lys Gly Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val
      165          170          175
Lys Ala Glu Lys Ser Lys Lys Lys Lys Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu
      180          185          190
Asp Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Asp Glu Asp Glu
      195          200          205
Glu Glu Asp Asp Asp Asp Glu
      210          215

```

<210> 28
 <211> 205
 <212> PRT
 <213> Danio rerio

<220>

<221> đặc tính hỗn hợp

<223> HGMB1 của cá ngựa

<400> 28

```

Met Gly Lys Asp Pro Thr Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr Ala
1           5           10           15
Tyr Phe Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro Glu
           20           25           30
Ala Thr Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg Trp
           35           40           45
Lys Thr Met Ser Ala Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala Lys
           50           55           60
Leu Asp Lys Ala Arg Tyr Glu Arg Glu Met Lys Asn Tyr Ile Pro Pro
65           70           75           80
Lys Gly Glu Lys Lys Lys Arg Phe Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys Arg
           85           90           95
Pro Pro Ser Ala Phe Phe Ile Phe Cys Ser Glu Phe Arg Pro Lys Val
           100          105          110
Lys Glu Glu Thr Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys Arg Leu
           115          120          125
Gly Glu Met Trp Asn Lys Ile Ser Ser Glu Glu Lys Gln Pro Tyr Glu
           130          135          140
Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala Ala
145          150          155          160
Tyr Arg Ser Lys Gly Lys Val Gly Gly Gly Ala Ala Lys Ala Pro Ser
           165          170          175
Lys Pro Asp Lys Ala Asn Asp Glu Asp Glu Asp Asp Asp Glu Glu Glu
           180          185          190
Asp Glu Asp Asp Asp Asp Glu Glu Glu Glu Asp Asp Glu
           195          200          205

```

<210> 29

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi tổng hợp: lam-up-f; Vùng trước của vòng 9

<400> 29

tgtacaagtg gacgccaatc

20

<210> 30

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi tổng hợp: lam-up-r; Vùng trước của vòng 9
 <400> 30
 gttatcgccg tctttgatat agcc 24
 <210> 31
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi tổng hợp: lam-dn-f; Vùng sau của vòng 9
 <400> 31
 atttcccgtt atgccgcagc 20
 <210> 32
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi tổng hợp: lam-dn-r; Vùng sau của vòng 9
 <400> 32
 gttaaacaga gggcgacgag 20
 <210> 33
 <211> 68
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi tổng hợp: Km-f; Gen I-SceI/Kmr
 <400> 33
 gctatatcaa agacggcgat aactaactat aacggtccta aggtagcgaa tttccgggga 60
 tccgtcga 68
 <210> 34
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi tổng hợp: Km-r; Gen I-SceI/Kmr
 <400> 34
 gctgcggcat aacgggaaat gtaggctgga gctgcttcg 39
 <210> 35
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>

<223> Đoạn mỗi tổng hợp: Kan4f; Gen Kmr bên trong
 <400> 35
 caaaagcgct ctgaagttcc 20
 <210> 36
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi tổng hợp: Kan4r; Gen Kmr bên trong
 <400> 36
 gcgtgagggg atcttgaagt 20
 <210> 37
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi tổng hợp: lam 3f; Các vùng ngoài của vòng 9
 <400> 37
 gccatctcgc ttggtgataa 20
 <210> 38
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi tổng hợp: lam 3r; Các vùng ngoài của vòng 9
 <400> 38
 cgctggtatt ttgcggtaca 20
 <210> 39
 <211> 84
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi tổng hợp: Cj0113f; Đoạn chèn có vùng trước của vòng 9
 <400> 39
 ttcacggtgta cccattcat cacagttacc ttcaacggtg atgctaacac cggaggagga 60
 gttatcgccg tctttgatat agcc 84
 <210> 40
 <211> 100
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>

<223> Đoạn mỗi tổng hợp: Cj0113r; Đoạn chèn có vùng sau của vòng 9
 <400> 40
 atgaatggggg taccgatgaa tataaccagg cgtcctcctc ctggatgacc acctcctatg 60
 cgccgacctc ctcctcctcc atttcccgtt atgccgcagc 100
 <210> 41
 <211> 84
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi tổng hợp: Cj0420f; Đoạn chèn có vùng trước của vòng 9
 <400> 41
 atctttacct ttcgcaacac caccgatttc cgcattccaga acgatatctt tggaggagga 60
 gttatcgccg tctttgatat agcc 84
 <210> 42
 <211> 100
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi tổng hợp: Cj0420r; Đoạn chèn có vùng sau của vòng 9
 <400> 42
 gtgttgcgaa aggtaaagat ggtaaagaaa aatcctcctc ctggatgacc acctcctatg 60
 cgccgacctc ctcctcctcc atttcccgtt atgccgcagc 100
 <210> 43
 <211> 105
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi tổng hợp: Cj0982c-f; Đoạn chèn có vùng trước của vòng 9
 <400> 43
 ggttttatct ttcagatctt caacgctggg gatgttgcta tctttcggaa ccgcaacacc 60
 cagcgcaact ttggaggagg agttatcgcc gtctttgata tagcc 105
 <210> 44
 <211> 121
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi tổng hợp: Cj0982c-r; Đoạn chèn có vùng sau của vòng 9
 <400> 44
 aagatctgaa agataaaacc ctgctgctga acaaaggtag caccgcggat gcgtcctcct 60
 cctggatgac cacctcctat gcgccgacct ctcctcctc catttcccgt tatgccgcag 120
 c 121