



(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)



1-0032557

(51)<sup>2013.01</sup> A61K 39/39; A61K 39/205; A61K  
39/002; A61K 39/12

(13) B

(21) 1-2014-00948

(22) 24/08/2012

(86) PCT/CU2012/000004 24/08/2012

(87) WO2013/029570 07/03/2013

(30) 2011-0167 26/08/2011 CU

(45) 25/07/2022 412

(43) 25/08/2014 317A

(73) CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA (CU)

Avenida 31 entre 158 y 190, Playa, La Habana 11600, Cuba

(72) LUGO GONZÁLEZ, Juana, María (CU); CARPIO GONZÁLEZ, Yamila (CU);  
ESTRADA GARCÍA, Mario, Pablo (CU).

(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) CHẾ PHẨM VACXIN VÀ TỔ HỢP VACXIN CHỨA PEPTIT HOẠT HÓA  
ADENYLAT XYCLAZA TUYẾN YÊN

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm vaccin và tổ hợp vaccin chứa peptit hoạt hóa adenylat xyclaza tuyến yên (PACAP - pituitary adenylate cyclase activating peptide) làm chất bổ trợ vaccin. Trong số các ứng dụng khác, các vaccin này có thể được dùng để phòng ngừa các tác nhân như là virus, vi khuẩn và ký sinh trùng gây bệnh trên động vật có vú, gia cầm và cá. Khi PACAP được sử dụng đồng thời với kháng nguyên cụ thể, đã chứng tỏ được tác dụng bổ trợ của nó là làm tăng đáp ứng miễn dịch ở vật chủ chống lại kháng nguyên này. Đáp ứng này có thể thu được khi tổ hợp vaccin hoặc chế phẩm vaccin chứa PACAP theo sáng chế được sử dụng theo đường miệng, đường tiêm hoặc qua bề ngấm.

### **Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Sáng chế đề cập đến chế phẩm vacxin và tổ hợp vacxin chứa peptit hoạt hóa adenylat cyclaza tuyến yên (PACAP-pituitary adenylate cyclase activating peptide) làm chất bổ trợ vacxin.

### **Tình trạng kỹ thuật của sáng chế**

Mục đích chính của việc tiêm phòng là để tạo ra đáp ứng miễn dịch đặc hiệu và hiệu quả chống lại tác nhân gây bệnh, cũng như để tạo ra tác dụng bảo vệ chống lại và loại bỏ tình trạng nhiễm trùng và/hoặc bệnh lý liên quan. Quan điểm cho rằng đáp ứng miễn dịch chống lại kháng nguyên cụ thể có thể được cải thiện bằng cách bổ sung một số hoạt chất vào chế phẩm vacxin đã được đưa ra khoảng 100 năm trước, khi muối nhôm được bổ sung vào các chế phẩm vacxin và được gọi là “chất bổ trợ” (G. Leroux-Roels (2010) *Vaccine* 28S C25-C36). Các vacxin truyền thống chứa tác nhân gây bệnh đã được bất hoạt hoặc làm giảm độc lực, hoặc độc tố có nguồn gốc từ các vi sinh vật này. Mặc dù việc sử dụng các tác nhân gây bệnh đã được bất hoạt hoặc giảm độc lực có thể tạo ra đáp ứng miễn dịch mạnh, nhưng hiện nay các chế phẩm này đã không còn được ưa chuộng trong lĩnh vực vacxin do chúng có độc tính cao.

Do đó, các hoạt chất bổ trợ ngày càng thu hút được nhiều sự quan tâm trong lĩnh vực nghiên cứu phát triển vacxin thế hệ mới có bản chất là các tiểu đơn vị protein tái tổ hợp, peptit tổng hợp và plasmid ADN. Mặc dù các biến thể vacxin thế hệ mới này có độc tính thấp, nhưng hầu hết chúng có khả năng miễn dịch yếu khi không được sử dụng đồng thời với chất bổ trợ kích thích miễn dịch. Vì lý do này, trong những năm gần đây, nhu cầu nghiên cứu phát triển chất bổ trợ có hoạt lực và độ an toàn cao đã trở nên cấp thiết (Saenz et al. (2010) *Vaccine* 28 (47): 7556-7562). Mặc dù chất bổ trợ đã được sử dụng nhiều, nhưng cơ chế tác dụng của chúng vẫn chưa được làm rõ. Nhìn chung, các chất bổ trợ được cho là làm tăng hiệu lực của vacxin thông qua một số cơ chế sau: 1) làm tăng quá trình xử lý và nhận diện kháng nguyên bởi tế bào đuôi gai, 2) tạo ra tín hiệu “nguy hiểm” bằng các con đường truyền tín hiệu qua trung gian thụ thể nhận diện cấu trúc tác

nhân truyền nhiễm liên quan, như là thụ thể “Toll”, và 3) bằng cách kích hoạt các tín hiệu đồng kích thích hoạt hóa các tế bào lymphô. Các cơ chế này được hoạt hóa bởi quá trình cảm ứng xytokin và điều hòa tăng sự biểu hiện của các tín hiệu đồng kích thích thích hợp (Secombes (2010) *Fish & Shellfish Immunology*, 409-416).

Một số protein và phân tử nội sinh (Yin and Kwang (2000) *Fish & Shellfish Immunology* 10, 375-378; Lingnau et al. (2007) *Expert Rev Vaccines* 6 (5): 741-6; Zhang et al. (2010) *Vaccine* 28: 5114-5127) đã được nghiên cứu làm chất bổ trợ. Cũng được biết rằng một số peptit kích thích miễn dịch có thể đóng vai trò làm chất bổ trợ *in vivo*, có tác dụng kích thích đáp ứng miễn dịch với kháng nguyên peptit hoặc protein (Saenz et al. (2010) *Vaccine* 28 (47): 7556-7562). PACAP thuộc hệ peptit đường ruột có hoạt tính tạo mạch/secretin/glucagon (Miyata et al (1989) *Biochem Biophys Res Commun* 164: 567-574). PACAP là peptit thần kinh đa chức năng đóng vai trò quan trọng làm yếu tố dinh dưỡng thần kinh, kích thích tuyến yên, làm chất dẫn truyền thần kinh, điều hòa thần kinh và gây giãn mạch ở động vật có vú (Arimura A. (1998) *Japanese Journal of Physiology* 48: 301-31). Vai trò của PACAP trong quá trình phân chia, biệt hóa và chết tế bào đã được kiểm chứng (Sherwood et al. (2000) *Endocrine Review* 21: 619-670). PACAP tồn tại ở hai dạng phân tử gồm 38 axit amin (PACAP38) và 27 axit amin (PACAP27) (Miyata et al. (1990) *Biochemical and Biophysical Research Communications* 170:643-8). Hoạt tính sinh học của PACAP được tạo ra bởi ba thụ thể của VIP/PACAP - thuộc nhóm thụ thể ghép cặp protein-G secretin: thụ thể typ I rất đặc hiệu đối với PACAP và được đặt tên là PAC-1; và thụ thể typ II có ái lực với PACAP tương đương với peptit đường ruột có hoạt tính tạo mạch (VIP- vasoactive intestinal peptide), được đặt tên là VPAC-1 và VPAC-2 (Vaudry et al. (2000) *Pharmacol Rev* 52: 269-324).

PACAP được phân bố nhiều ở các mô khác nhau, bao gồm cả các mô miễn dịch, mặc dù sự phân bố của PACAP và các thụ thể của nó ở tế bào miễn dịch của động vật có vú mới chỉ được làm sáng tỏ một phần (Gaytan et al. (1994) *Cell Tissue Res* 276:223-7, Abad et al. (2002) *Neuroimmunomodulation* 10:177-86). PACAP điều hòa đáp ứng viêm thông qua quá trình điều hòa interleukin-6 (IL-6) và interleukin-10 (IL-10) (Martinez et al. (1996) *J Immunol* 156 (11):4128-36; Martinez et al. (1998) *J Neuroimmunol* 85 (2) :155-67), Martinez et al. (1998) *J Leukoc Biol* 63 (5) :591-601).

Ở đại thực bào đã được hoạt hóa, PACAP ức chế sản sinh xytokin tiền viêm và kích thích sản sinh xytokin chống viêm, tạo ra trạng thái cân bằng nội mô miễn dịch. Ngoài ra, đã biết rằng PACAP làm giảm sự biểu hiện các phân tử đồng kích thích B7.2/B7.1 và do đó hoạt hóa tế bào hỗ trợ T (Th). Mặt khác, PACAP ức chế sản sinh IL-6 thông qua thụ thể PAC-1 của nó ở đại thực bào đã được hoạt hóa, do đó ức chế tình trạng viêm (Martinez et al. (1998) *J Neuroimmunol* 85 (2): 155 - 67, Martinez et al. (1998) *J Leukoc Biol* 1998, 63 (5): 591-601). Tác dụng ức chế của PACAP đối với quá trình phiên mã IL-6 đáp ứng với kích thích viêm mạnh sẽ giúp bảo vệ mô và tạo ra trạng thái cân bằng nội mô miễn dịch (Martínez et al. (1998) *J Neuroimmunol* 85(2):155-67; Martínez et al. (1998) *J Leukoc Biol*. 1998 May; 63(5):591-601). Trái lại, PACAP kích thích sự biểu hiện B7.2 và thúc đẩy sự biệt hóa tế bào Th2 ở đại thực bào chưa bị kích thích (Delgado and Ganea (2001) *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 49(2):101-10). Sự có mặt của PACAP ở các cơ quan lymphô của vịt đã được ghi nhận (Squillacioti et al. (2005) *Anatomia, Histologia, Embryologia*. Volume 34, Issue Supplements 1, page 49). Việc sử dụng PACAP làm hoạt chất điều trị các bệnh tự miễn ở động vật có vú, như là bệnh sốc nhiễm trùng, viêm khớp dạng thấp và bệnh Crohn đã được đề xuất (Gomariz et al. (2006) *Ann. NY Acad. Sci* 1070: 51 - 74). Đã biết rằng, ở các bệnh tự miễn có đáp ứng miễn dịch không kiểm soát chống lại các chất và mô của cơ quan cơ thể. Về mặt này, PACAP có tác dụng phòng ngừa tình trạng viêm trên mô hình động vật mắc bệnh tự miễn qua việc tạo ra trạng thái cân bằng ổn định giữa xytokin, chemokin và các thụ thể của chúng, làm phục hồi các tế bào miễn dịch và điều hòa sự hình thành và hoạt hóa các tế bào Th1- là tế bào bài tiết xytokin.

Hơn nữa, đã biết rằng các phân tử tham gia vào quá trình cân bằng nội môi miễn dịch, như là các thụ thể “Toll”, là cần thiết để hoạt hóa đáp ứng miễn dịch bẩm sinh, và tăng cường đáp ứng miễn dịch thu được. Tuy nhiên, đáp ứng này có thể làm phát sinh tình trạng viêm cấp tính và/hoặc tình trạng viêm mãn tính, bệnh tự miễn và bệnh ung thư (Gomariz et al. (2010) *Current Pharmaceutical Design* 16: 1063-1080). Về mặt này, đã biết rằng phức hệ VIP-PACAP tham gia vào quá trình điều hòa sự biểu hiện gen mã hóa thụ thể “Toll” (Gomariz et al. (2006) *Ann. NY Acad. Sci* 1070: 51-74). Do đó, cả hai peptit này có thể gây rối loạn các quá trình điều hòa sản sinh các thụ thể này. PACAP làm giảm mức độ tuần hoàn và ức chế sự giải phóng xytokin qua trung gian phân tử HMGB1 nội sinh (nhóm hợp 1 có độ linh động cao) (Tang et al. (2008) *International*

*Immunopharmacology* 8 (12): 1646-1651), và ức chế sự giải phóng chúng. Đã biết rằng phân tử HMGB1 và các peptit thu được từ nó có khả năng đóng vai trò hỗ trợ, cải thiện đáp ứng miễn dịch chống lại kháng nguyên peptit và protein (Saenz et al. (2010) *Vaccine* 28 (47): 7556-7562).

Các tác giả sáng chế này đã nghiên cứu chức năng của PACAP trong sự điều hòa. Các tác giả sáng chế đã chứng tỏ được rằng PACAP tái tổ hợp của *Clarias gariepinus* được sử dụng qua bể ngâm hoặc đường tiêm không chỉ thúc đẩy sự tăng trưởng mà còn hoạt hóa các yếu tố miễn dịch bẩm sinh (lysozym, các chất chuyển hóa thu được từ nitric oxit và các chất bảo vệ chống oxy hóa) và miễn dịch thu được (IgM) ở ấu trùng và cá con (Carpio et al. (2008) *Fish and Shellfish Immunology* 25:439-45; Lugo et al. (2010) *Fish and Shellfish Immunology* 29:513-520). Đặc tính này của PACAP được mô tả trong Công bố đơn quốc tế WO2007/059714, “*Neuropéptidos para el cultivo de organismos acuáticos*”.

Hiện tại, trong lĩnh vực y tế và thú y, vẫn có nhu cầu nghiên cứu và phát triển các hợp chất dùng làm chất hỗ trợ có độ an toàn và hiệu lực cao hơn để kết hợp vào vaccin.

### **Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

Để giải quyết vấn đề nêu trên, mục đích của sáng chế là đề xuất chất hỗ trợ thể hệ mới có khả năng tạo ra đáp ứng miễn dịch mạnh với kháng nguyên được sử dụng đồng thời với nó, do đó tạo ra chất hỗ trợ có hiệu lực cao.

Theo mục đích chính, sáng chế đề xuất chế phẩm vaccin chứa peptit hoạt hóa adenylat xyclaza tuyến yên (PACAP- pituitary adenylate cyclase activating peptide), ít nhất một kháng nguyên vaccin đặc hiệu đối với tác nhân truyền nhiễm, và chất mang hoặc tá dược pha loãng được dùng, trong đó chế phẩm vaccin này chứa PACAP và kháng nguyên vaccin ở lượng đủ để tạo ra tác dụng phòng ngừa bệnh truyền nhiễm do các tác nhân truyền nhiễm gây ra ở cá.

Sáng chế cũng đề xuất tổ hợp vaccin chứa peptit hoạt hóa adenylat xyclaza tuyến yên (PACAP- pituitary adenylate cyclase activating peptide), và ít nhất một kháng nguyên vaccin đặc hiệu đối với tác nhân truyền nhiễm, trong đó tổ hợp vaccin này chứa PACAP và kháng nguyên vaccin ở lượng đủ để tạo ra tác dụng phòng ngừa bệnh truyền

nhiễm do các tác nhân truyền nhiễm gây ra ở cá và được sử dụng trong cùng phác đồ tiêm phòng.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp sử dụng peptit hoạt hóa adenylat cyclaza tuyến yên (PACAP-pituitary adenylate cyclase activating peptide) làm chất bổ trợ các kháng nguyên chứa trong vaccin sử dụng trong tiêm phòng khác nhau. Theo một phương án, vaccin theo sáng chế chứa chất bổ trợ PACAP, được thiết kế để tạo ra miễn dịch chống lại các tác nhân truyền nhiễm. Các tác nhân truyền nhiễm này có thể là virus, vi khuẩn, ký sinh trùng, và các tác nhân truyền nhiễm khác. Theo phương án cụ thể, các tác nhân này gây bệnh trên động vật có vú, gia cầm và cá.

### Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là biểu đồ thể hiện tổng nồng độ của globulin miễn dịch G (IgG) (Fig.1A), IgG1 (Fig.1B) và IgG2a (Fig.1C) ở chuột được chủng ngừa đồng thời bằng albumin trứng (OVA) và PACAP38. Hai nhóm thử nghiệm, mỗi nhóm gồm 6 chuột được sử dụng. Nhóm đối chứng âm được tiêm màng bụng ở ngày thứ 0 và thứ 7 với liều 6 $\mu$ g OVA trong 0,2mL dung dịch đệm muối phosphat (PBS-phosphate buffered saline). Nhóm thử nghiệm được tiêm màng bụng ở ngày thứ 0 và thứ 7 với liều 6 $\mu$ g OVA + 0,5 $\mu$ g PACAP38 trong 0,2mL PBS. Các chữ cái khác nhau chỉ mức độ khác biệt có ý nghĩa thống kê.

Fig.2 là biểu đồ thể hiện kết quả đánh giá đáp ứng miễn dịch tế bào ở lợn được chủng ngừa bằng chế phẩm vaccin chứa glycoprotein E2 và PACAP38. Đáp ứng miễn dịch được đánh giá trên tế bào lymphô của lợn, được phân lập sau 5 ngày chủng ngừa bằng glycoprotein E2 (nhóm 1), bằng glycoprotein E2 và PACAP38 (nhóm 2) và bằng giả dược (nhóm 3). Fig.2 A là biểu đồ thể hiện kết quả đánh giá mức độ tăng sinh tế bào lymphô: được thể hiện dưới dạng chỉ số kích thích miễn dịch (SI- stimulation index), được xác định bằng tỷ số giữa số đếm/phút (cpm) của nhóm đã được chủng ngừa với cpm của nhóm đối chứng không được chủng ngừa. Kết quả được coi là dương tính khi đáp ứng tăng sinh tế bào lymphô có  $SI \geq 2$ . Fig.2B là biểu đồ thể hiện kết quả định lượng IFN- $\gamma$  tiết bằng phương pháp PCR. Các trị số phân tích được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . (\*\* )  $p < 0,01$ .

Fig.3 là biểu đồ thể hiện mức độ ức chế sự hemagglutinin hóa ở gà được chủng ngừa bằng hemagglutinin hoặc hemagglutinin và PACAP27. Fig.3A là biểu đồ thể hiện nồng độ trung bình của kháng thể được biểu diễn dưới dạng  $\text{Log}_2$  giá trị nghịch đảo của tỷ lệ pha loãng huyết thanh cao nhất gây ra ức chế sự hemagglutinin hóa. Fig.3B là biểu đồ thể hiện kết quả đánh giá đáp ứng miễn dịch tế bào ở gà đã được chủng ngừa. Định lượng IFN- $\gamma$  tiết bằng phương pháp PCR. Các trị số phân tích được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ . (\*\*) $p < 0,01$ .

Fig.4 là biểu đồ thể hiện kết quả phân tích biểu hiện bằng phương pháp PCR định lượng hoạt tính *in vitro* của PACAP38 đối với quá trình phiên mã IL 1 $\beta$  ở tế bào bạch cầu máu ngoại vi (Fig.4A) và tế bào tiền thận (Fig.4B) của cá hồi cầu vồng. Hoạt tính của PACAP38 ở nồng độ bằng  $10^{-10}\text{M}$ ,  $10^{-9}\text{M}$  và  $10^{-8}\text{M}$  được đánh giá ở thời điểm 48 giờ sau khi chủng ngừa. Thử nghiệm được lặp lại 4 lần. Các dòng bạch cầu được xử lý lặp lại hai lần và quá trình PCR được thực hiện lặp lại ba lần. Dữ liệu thử nghiệm được thể hiện dưới dạng trị số biểu hiện tương đối trung bình IL 1 $\beta$  cộng với yếu tố kéo dài nội sinh EF1 $\alpha \pm$  độ lệch chuẩn (SD). (\*)  $p < 0,05$ . \* ( $p < 0,05$ ) cho thấy mức độ biểu hiện tương đối của gen mong muốn có ý nghĩa thống kê nhiều hơn so với sự biểu hiện tương đối của nó ở dòng bạch cầu không được chủng ngừa (mẫu đối chứng âm)

Fig.5 là biểu đồ thể hiện kết quả phân tích biểu hiện bằng phương pháp PCR định lượng hoạt tính *in vitro* của PACAP38 đối với quá trình phiên mã IL 15 ở tế bào bạch cầu máu ngoại vi (Fig.5A) và tế bào tiền thận (Fig.5B) của cá hồi cầu vồng. Hoạt tính của PACAP38 ở nồng độ bằng  $10^{-10}\text{M}$ ,  $10^{-9}\text{M}$  và  $10^{-8}\text{M}$  được đánh giá ở thời điểm 48 giờ sau khi chủng ngừa. Thử nghiệm được lặp lại 4 lần. Các tế bào bạch cầu được xử lý lặp lại hai lần và quá trình PCR được thực hiện lặp lại ba lần. Dữ liệu được thể hiện dưới dạng giá trị biểu hiện tương đối trung bình IL 15 cộng với yếu tố kéo dài nội sinh EF1 $\alpha \pm$  độ lệch chuẩn (SD). (\*)  $p < 0,05$ .

Fig.6 là biểu đồ thể hiện nồng độ kháng thể dính kết kháng *A. hydrophila* ở cá chép. Các trị số trên trục Y biểu diễn nồng độ trung bình của kháng thể  $\pm$  độ lệch chuẩn. (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$ . Nhóm 1: được tiêm bằng PBS, Nhóm 2: được tiêm bằng tế bào *A. hydrophila* được bất hoạt bằng formalin, Nhóm 3: được tiêm bằng tế bào *A. hydrophila* được bất hoạt bằng formalin cộng với PACAP38 ( $1\mu\text{g}/\text{cá}$ ).

Fig.7 là biểu đồ thể hiện hiệu quả của việc sử dụng đồng thời vaccin ADN (pP-IPNV) ở liều bằng 1µg/cá với plasmit ADN chứa PACAP của *Clarias gariepinus* và vùng khởi đầu của *cytomegalovirus* ở người (pCMV và PACAP) theo đường tiêm bắp. Ở ngày thứ 30 sau khi chủng ngừa, cá được lây nhiễm virus này bằng cách tiêm màng bụng 100µL IPNV ( $1 \times 10^7$  (TCID<sub>50</sub>) mL<sup>-1</sup>/cá). Ở ngày thứ 7 sau khi lây nhiễm, 10 cá/nhóm được giết chết để xác định số lượng virus ở tế bào tiền thận bằng phương pháp PCR định lượng. Các trị số phân tích được biểu diễn dưới dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn. Mức độ khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm được thể hiện bằng các ký tự chữ cái khác nhau. Nhóm 1: được tiêm bằng PBS, Nhóm 2: được tiêm bằng pP-IPNV ở liều bằng 1µg/cá, Nhóm 3: được tiêm đồng thời bằng pP-IPNV (1µg/cá) và pCMV và PACAP (0,5µg/cá), Nhóm 4: được tiêm đồng thời bằng pP-IPNV (1µg/cá) và pCMV (0,5µg/cá), Nhóm 5: được tiêm đồng thời bằng pP-IPNV (1µg/cá) và pCMV và PACAP (0,05µg/cá), Nhóm 6: được tiêm đồng thời bằng pP-IPNV (1µg/cá) và pCMV (0,05µg/cá).

Fig.8 là biểu đồ thể hiện tỷ lệ chết ở cá hồi cầu vồng được chủng ngừa bằng vaccin ADN chứa gen mã hóa glycoprotein G của VHSV (pG-VHSV) và PACAP. 4 tuần sau khi chủng ngừa, cá được lây nhiễm virus ( $1 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub> mL<sup>-1</sup>/cá) bằng bể ngâm. Tỷ lệ chết được đánh giá trong thời gian 4 tuần sau khi lây nhiễm. Nhóm 1: được tiêm bằng PBS. Nhóm 2: được tiêm bằng pG-VHSV (0,01µg/cá), Nhóm 3: được tiêm bằng pG-VHSV (0,01µg/cá) và PACAP (0,1µg/cá), Nhóm 4: được tiêm bằng pG-VHSV (0,01µg/cá) và PACAP (0,5µg/cá).

### Mô tả chi tiết sáng chế

Thuật ngữ “polypeptit hoạt hóa adenylat xyclaza tuyến yên” hoặc “PACAP” sử dụng trong sáng chế để chỉ dạng biến thể bất kỳ của peptit này bao gồm PACAP27 hoặc PACAP38 được phân lập từ nguồn tự nhiên, tổng hợp bằng phương pháp hóa học, hoặc công nghệ ADN tái tổ hợp; và bao gồm cả việc sử dụng nó dưới dạng peptit hoặc dạng axit nucleic.

Thuật ngữ “chất bổ trợ” được sử dụng trong sáng chế để chỉ phân tử protein bất kỳ có khả năng điều hòa đáp ứng miễn dịch chống lại kháng nguyên vaccin, và tăng cường đáp ứng miễn dịch này.

Cho đến nay vẫn chưa có nghiên cứu về việc sử dụng PACAP làm chất bổ trợ vaccin. Như đã nêu trên, đã có đề xuất sử dụng peptit này làm hoạt chất dùng để điều trị các bệnh tự miễn, như là bệnh sốc nhiễm trùng, bệnh viêm khớp dạng thấp và bệnh Crohn cho động vật có vú (Gomariz et al. (2006) *Ann. NY Acad. Sci.* 1070: 51-74). Theo đó, PACAP có tác dụng phòng ngừa tình trạng viêm trên mô hình động vật mắc bệnh tự miễn qua việc tạo ra trạng thái cân bằng ổn định giữa các xytokin, chemokin và thụ thể của chúng, tạo ra sự phục hồi tế bào miễn dịch và điều hòa sự hình thành và hoạt hóa tế bào Th1-là tế bào bài tiết xytokin. Trên cơ sở đó, nghiên cứu của các tác giả sáng chế này đã bất ngờ phát hiện thấy rằng việc sử dụng kết hợp PACAP với kháng nguyên sẽ làm tăng đáp ứng miễn dịch chống lại chính kháng nguyên đó, qua việc hoạt hóa xytokin tiền kích thích và các yếu tố khác của đáp ứng miễn dịch dịch thể.

Hơn nữa, đã biết rằng phức hệ VIP-PACAP tham gia vào quá trình điều hòa biểu hiện gen mã hóa thụ thể “Toll” (Gomariz et al. (2006) *Ann. NY Acad. Sci.* 1070: 51-74). Theo quan điểm này, cả hai peptit nêu trên đều có thể gây rối loạn quá trình điều hòa sản sinh các thụ thể “Toll”, do đó làm cho tác dụng bổ trợ của peptit PACAP đối với vaccin không được thể hiện rõ. Một yếu tố khác đối lập với việc sử dụng PACAP theo sáng chế này là peptit này sẽ giảm thiểu mức độ tuần hoàn và ức chế sự giải phóng xytokin qua trung gian phân tử HMGB1 nội sinh (Tang et al. (2008) *International Immunopharmacology* 8 (12 ): 1646-1651).

Các tác giả sáng chế này lần đầu tiên đã chứng tỏ được rằng khi phối hợp đồng thời PACAP với kháng nguyên vaccin sẽ làm tăng đáp ứng miễn dịch đặc hiệu với chính kháng nguyên này ở cả mức độ đáp ứng miễn dịch dịch thể lẫn đáp ứng miễn dịch tế bào.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm vaccin chứa chất bổ trợ PACAP, ít nhất một kháng nguyên vaccin, và chất mang hoặc tá dược pha loãng được dùng. Chế phẩm vaccin theo sáng chế chứa chất bổ trợ PACAP và ít nhất một kháng nguyên cần thiết sẽ tạo ra đáp ứng miễn dịch tại chỗ hoặc toàn thân chống lại kháng nguyên hoặc các kháng nguyên này. Vaccin hoặc chế phẩm vaccin theo sáng chế có thể chứa protein tái tổ hợp, vi sinh vật giảm độc lực hoặc axit nucleic. Theo một phương án, chế phẩm vaccin theo sáng chế được sử dụng qua đường miệng, đường tiêm hoặc qua bề ngấm.

Trong chế phẩm vaccin theo sáng chế, PACAP được sử dụng dưới dạng peptit được phân lập từ nguồn tự nhiên, tổng hợp bằng phương pháp hóa học, hoặc công nghệ ADN tái tổ hợp. PACAP cũng có thể được sử dụng dưới dạng axit nucleic.

Theo các phương án khác, khi cho động vật có vú, gia cầm và cá dùng chế phẩm vaccin chứa PACAP kết hợp với một số kháng nguyên lần đầu tiên, đã quan sát thấy tác dụng bổ trợ của PACAP. Thực sự bất ngờ, khi thấy rằng việc sử dụng đồng thời PACAP với kháng nguyên đã làm tăng nồng độ kháng thể đặc hiệu chống lại kháng nguyên này ở động vật có vú, gia cầm và cá. Ngoài ra, đã chứng tỏ được rằng, trong điều kiện *in vitro*, PACAP đã làm tăng đáng kể số lượng bản sao phiên mã của interleukin 1 beta (IL 1  $\beta$ ) và interleukin 15 (IL15) ở tế bào bạch cầu của cá.

Theo các phương án khác, sáng chế đề xuất hỗn hợp hoặc tổ hợp vaccin chứa chất bổ trợ PACAP và các kháng nguyên khác nhau, như là albumin trứng (ovalbumin-OVA), glycoprotein E2 của virus gây bệnh dịch tả ở lợn thể cổ điển (CSFV- *Classical Swine Fever Virus*), hemagglutinin (HA) của virus cúm gia cầm, polypeptit my32 của *Caligus rogercresseyi*, tế bào *Aeromonas hydrophila* bất hoạt, polyprotein NH2-VP2-VP4VP3-COOH, có trọng lượng phân tử bằng 106 kDa của virus gây hoại tử tuyến tụy (IPNV- *Infectious Pancreatic Necrosis Virus*), glycoprotein G của virus gây bệnh nhiễm trùng xuất huyết (VHSV- *Viral Hemorrhagic Septicemia Virus*) và ký sinh trùng có lông *Ichthyophthirius multifiliis*.

Theo phương án cụ thể, trong chế phẩm vaccin theo sáng chế, PACAP được sử dụng dưới dạng thức ăn chăn nuôi, ở liều nằm trong khoảng từ 50 $\mu$ g/kg đến 750 $\mu$ g/kg thức ăn. Theo phương án thứ hai, PACAP được sử dụng theo đường tiêm, ở liều nằm trong khoảng từ 0,1 $\mu$ g/g đến 10 $\mu$ g/g thể trọng. Theo một phương án khác, PACAP được đưa vào cá qua bể ngâm, ở liều nằm trong khoảng từ 50 $\mu$ g/L đến 1000 $\mu$ g/L nước.

Theo một phương án khác, kháng nguyên và chất bổ trợ PACAP có thể là thành phần của tổ hợp vaccin chứa các thành phần được sử dụng đồng thời, riêng biệt hoặc liên tiếp trong cùng phác đồ tiêm phòng. Theo phương án cụ thể, tổ hợp vaccin theo sáng chế được sử dụng để phòng ngừa bệnh do virus, vi khuẩn và ký sinh trùng. Trong tổ hợp vaccin theo sáng chế, PACAP và các kháng nguyên được sử dụng qua đường miệng, đường tiêm hoặc qua bể ngâm.

Theo phương án cụ thể, trong tổ hợp vacxin theo sáng chế, PACAP được sử dụng dưới dạng thức ăn chăn nuôi, ở liều nằm trong khoảng từ 50 $\mu$ g/kg đến 750 $\mu$ g/kg thức ăn. Theo phương án thứ hai, PACAP được sử dụng theo đường tiêm, ở liều nằm trong khoảng từ 0,1 $\mu$ g/g đến 10 $\mu$ g/g thể trọng. Theo một phương án khác, PACAP được đưa vào cá qua bề ngấm, ở liều nằm trong khoảng từ 50 $\mu$ g/L đến 1000 $\mu$ g/L nước.

Ngoài ra, sáng chế mô tả phương pháp tăng cường đáp ứng miễn dịch chống lại kháng nguyên, bằng cách dùng tổ hợp vacxin chứa chất bổ trợ PACAP cho kháng nguyên này. Theo phương pháp của sáng chế, chất bổ trợ PACAP và kháng nguyên có thể được sử dụng đồng thời, riêng biệt hoặc liên tiếp trong cùng phác đồ tiêm phòng. Chất bổ trợ PACAP được sử dụng trong phương pháp của sáng chế là peptit thu được từ nguồn tự nhiên, được tổng hợp bằng phương pháp hóa học, hoặc bằng công nghệ ADN tái tổ hợp. Theo phương pháp của sáng chế, chất bổ trợ PACAP cũng được sử dụng dưới dạng axit nucleic. Theo phương pháp của sáng chế, PACAP được sử dụng đồng thời với kháng nguyên vacxin sẽ làm tăng đáp ứng miễn dịch đặc hiệu với chính kháng nguyên này theo cả hai cơ chế đáp ứng miễn dịch dịch thể lẫn đáp ứng miễn dịch tế bào.

Một số phương án của sáng chế đã chứng tỏ được rằng sự tăng cường đáp ứng miễn dịch chống lại kháng nguyên quan tâm được thể hiện qua mức độ bảo vệ cao hơn chống lại các tác nhân truyền nhiễm; bao gồm cả virus, vi khuẩn và vật ký sinh trùng.

### **Ví dụ thực hiện sáng chế**

#### **Ví dụ 1**

Hiệu quả của việc sử dụng đồng thời albumin trứng và PACAP đối với đáp ứng miễn dịch dịch thể ở chuột

Chuột BALB/c (n=12) có trọng lượng cơ thể bằng 20g được chia thành hai nhóm thử nghiệm, mỗi nhóm gồm 6 con chuột. Nhóm đối chứng âm (PBS/OVA) được tiêm màng bụng ở ngày thứ 0 và ngày thứ 7 với liều 6 $\mu$ g albumin trứng trong 0,2mL PBS. Nhóm thử nghiệm (PBS/OVA+peptit) được tiêm màng bụng ở ngày thứ 0 và ngày thứ 7 với liều 6 $\mu$ g albumin trứng + 0,5 $\mu$ g PACAP38 trong 0,2mL PBS. Ở ngày thứ 15 sau khi chủng ngừa, lấy máu ở mỗi con chuột để định lượng nồng độ IgG, IgG1 và IgG2a tổng số.

Fig.1A, Fig.1B và Fig.1C là biểu đồ thể hiện tương ứng tổng nồng độ IgG, IgG1 và IgG2a thu được ở chuột được chủng ngừa đồng thời bằng albumin trứng và PACAP38. Chuột ở nhóm được chủng ngừa bằng PBS/OVA và peptit PACAP38 có tổng nồng độ IgG đặc hiệu với albumin trứng cao hơn so với nhóm đối chứng (Fig.1A). Tương tự, chuột ở nhóm được chủng ngừa bằng albumin trứng và PACAP38 có tổng nồng độ IgG1 và IgG2a đặc hiệu với albumin trứng cao hơn so với nhóm chỉ được chủng ngừa bằng albumin trứng (Fig.1B và Fig.1C).

## Ví dụ 2

Đánh giá đáp ứng miễn dịch tế bào ở lợn được chủng ngừa bằng chế phẩm vaccin chứa glycoprotein E2 và PACAP

Kháng nguyên E2 là glycoprotein vỏ của virus CSFV. Để đánh giá đáp ứng miễn dịch tế bào ở lợn được chủng ngừa bằng chế phẩm vaccin chứa glycoprotein E2 và PACAP38, và so sánh với đáp ứng miễn dịch tế bào ở lợn chỉ được chủng ngừa bằng kháng nguyên E2, 18 con lợn khỏe mạnh có trọng lượng trung bình bằng 20kg và có mẫu huyết thanh âm tính với virus CSFV được chọn từ trang trại không có tiền sử nhiễm bệnh virus này và chưa được chủng ngừa để chống lại CSFV trong 3 năm trước đó. Các lợn được chia thành 3 nhóm khác nhau, mỗi nhóm gồm 6 lợn, và được cho ăn uống đầy đủ. Mỗi chế phẩm vaccin được sử dụng để chủng ngừa một lần như sau: 25µg glycoprotein tái tổ hợp E2 (Nhóm 1) và 25µg glycoprotein tái tổ hợp E2 và 25µg PACAP38 (Nhóm 2). Nhóm 3 được chủng ngừa bằng giả dược. Kháng nguyên E2 được bào chế dưới dạng nhũ tương chứa chất bổ trợ PACAP38 dạng dầu và chủng ngừa theo đường tiêm bắp ở nồng độ cuối cùng bằng 2 mL. Ở ngày thứ 8 sau khi chủng ngừa, các con lợn này được thử thách bằng virus CSFV ( $10^5$  LD<sub>50</sub> của virus CSFV phân lập được từ năm “*Margarita*”) theo đường tiêm bắp. Phân tích triệu chứng lâm sàng được thực hiện hàng ngày và các mẫu máu được phân tích ở ngày thứ 3 và thứ 5 để đánh giá mức độ tăng sinh tế bào lymphô và mức độ biểu hiện của chất chỉ thị đáp ứng miễn dịch tế bào- IFN-γ. Đáp ứng miễn dịch tế bào lymphô tăng (Fig.2A) và mức độ biểu hiện IFN-γ mạnh nhất ở ngày thứ 5 ở nhóm lợn được chủng ngừa bằng glycoprotein E2 và PACAP38, so với các nhóm còn lại (Fig.2B). Kết quả thử nghiệm này cho thấy việc sử dụng đồng thời kháng nguyên glycoprotein E2 và PACAP38 đã tạo ra đáp ứng miễn dịch tế bào chống lại virus CSFV ở lợn.

### Ví dụ 3

Hiệu quả của việc sử dụng đồng thời hemagglutinin của virus cúm gia cầm (virus cúm A xuất hiện ngày 12/03/2004 tại Việt Nam) và PACAP27 đối với đáp ứng miễn dịch dịch thể và tế bào ở gà

Gà lùn trắng 3 tuần tuổi được sử dụng để chủng ngừa. Ba nhóm thử nghiệm, mỗi nhóm gồm 10 con gà.

Nhóm 1: được tiêm bằng 20 $\mu$ g hemagglutinin

Nhóm 2: được tiêm bằng 20 $\mu$ g hemagglutinin + 0,5 $\mu$ g PACAP27

Nhóm 3: được tiêm bằng 20 $\mu$ g albumin huyết thanh bò

Hemagglutinin được điều chế bằng cách biểu hiện tái tổ hợp ở tế bào động vật có vú. Các chế phẩm vacxin được bào chế với chất nhũ hóa Montanide 888 và sử dụng ở thể tích cuối cùng bằng 0,5mL theo đường tiêm dưới da. Các con gà này được chủng ngừa lại ở ngày thứ 28 sau khi chủng ngừa. Các mẫu máu được lấy ở ngày thứ 0, 14, 28, 35, 42 và 49, để định lượng nồng độ các kháng thể bảo vệ bằng cách sử dụng thử nghiệm ức chế hemagglutinin hóa và phân lập các tế bào bạch cầu để đánh giá đáp ứng miễn dịch tế bào được tạo ra bởi các chế phẩm vacxin trong điều kiện *in vitro*.

Nhóm gà được chủng ngừa hemagglutinin và PACAP27 có đáp ứng miễn dịch kháng thể mạnh hơn rất nhiều so với nhóm chỉ được chủng ngừa bằng hemagglutinin, từ ngày thứ 35 sau khi chủng ngừa lại (Fig.3A). Nhóm gà được chủng ngừa bằng hemagglutinin và PACAP27 có đáp ứng miễn dịch tế bào mạnh hơn đo bằng kích thích sản sinh IFN- $\gamma$ , so với nhóm chỉ được chủng ngừa bằng hemagglutinin hoặc nhóm đối chứng (Fig.3B).

### Ví dụ 4

Hiệu quả của PACAP38 đối với sự biểu hiện IL1- $\beta$  và IL15 ở tế bào bạch cầu tiền thân và tế bào bạch cầu máu ngoại vi của cá hồi cầu vồng *Oncorhynchus mykiss*.

Cá hồi cầu vồng (*O. mykiss*) có trọng lượng xấp xỉ 50g, âm tính với virus VHSV và virus IPNV. Các cá (n=5) được gây mê bằng muối metansulfonat (Sigma, USA) và

máu ngoại vi từ tĩnh mạch đuôi của mỗi cá được lấy vô trùng, sau đó thu lấy các tế bào bạch cầu tiền thận.

Các tế bào bạch cầu tiền thận và máu ngoại vi được phân lập theo phương pháp được Graham và Secombes mô tả trong tài liệu: Graham and Secombes (1998) *Immunology* 65:293-7.

Các tế bào này được tạo hỗn dịch lại trong môi trường L-15 có bổ sung 5% FCS ở mật độ bằng  $5 \times 10^6$  tế bào/mL và cấy chuyển vào đĩa 24-giếng với thể tích 1mL/giếng. Các tế bào bạch cầu được xử lý bằng PACAP38 của *Clarias gariepinus*, thu được bằng phương pháp tổng hợp hóa học, ở 3 nồng độ bằng  $10^{-10}$ M,  $10^{-9}$ M và  $10^{-8}$ M, mỗi mẫu phân tích được lặp lại hai lần. Các tế bào bạch cầu không được xử lý bằng PACAP38 được sử dụng làm mẫu đối chứng âm, mỗi mẫu phân tích cũng được lặp lại hai lần.

Mức độ biểu hiện IL 1 $\beta$  và IL 15 được đánh giá ở thời điểm 48 giờ sau xử lý. Để đạt được mục tiêu này, ARN tổng số được tinh chế từ các dòng bạch cầu được xử lý bằng PACAP38 theo phương pháp được Chomczynski và Sacchi mô tả trong tài liệu: Chomczynski and Sacchi (1987) *Anal. Biochem.* 162:156-9.

Do các đoạn mồi được thiết kế để khuếch đại IL 1  $\beta$  và IL 15 không phân biệt được sự khác nhau giữa ADN bổ sung và ADN bộ gen, nên ARN tổng số được tinh chế từ các mô khác nhau được xử lý bằng ADN nucleaza, đặc biệt là bằng ADN nucleaza không chứa ARNza RQ1 (Promega).

Để tổng hợp ADN bổ sung, kit chứa transcriptaza phiên mã ngược SuperScript III được sử dụng (Invitrogen). Cuối cùng, để định lượng bằng phương pháp PCR (qPCRs) hỗn hợp chứa Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) được sử dụng. Kết quả định lượng qPCR được hiệu chỉnh đối với gen biểu hiện cấu trúc nội sinh, đặc biệt với yếu tố kéo dài 1 $\alpha$  (EF 1 $\alpha$ ) và thực hiện lặp lại ba lần. Kết quả thử nghiệm được biểu diễn dưới dạng trị số  $2^{-\Delta Ct}$ , trong đó  $\Delta Ct$  được xác định bằng cách lấy trị số Ct của gen đích trừ đi trị số Ct của gen EF 1 $\alpha$  đã được hiệu chỉnh. Sau 48 giờ, mức độ biểu hiện protein IL 1 $\beta$  đã tăng ở tế bào bạch cầu máu ngoại vi được xử lý bằng  $10^{-10}$ M PACAP38. Ở liều  $10^{-9}$  M, PACAP38 cũng có tác dụng kích thích miễn dịch đối với quá trình phiên mã IL 1  $\beta$  so với nhóm đối chứng âm, nhưng trong trường hợp này, mức độ biểu hiện protein IL 1 $\beta$  yếu hơn so với mức độ biểu hiện thu được ở nồng độ bằng  $10^{-10}$ M. Kết quả

này cho thấy tác dụng hỗ trợ của PACAP38 đối với quá trình phiên mã IL 1  $\beta$  ở nồng độ thấp ( $10^{-9}$ M và  $10^{-10}$ M) (Fig.4A). Ở tế bào bạch cầu tiền thận, tác dụng kích thích miễn dịch của PACAP38 đối với quá trình phiên mã IL 1  $\beta$  là tương đương với tác dụng thu được ở tế bào bạch cầu máu ngoại vi, và chỉ có tác dụng kích thích miễn dịch ở liều bằng  $10^{-9}$ M (Fig.4B). Ngoài ra, PACAP38 cũng có tác dụng kích thích miễn dịch đối với sự biểu hiện IL 15 ở tế bào bạch cầu máu ngoại vi được kích thích bằng peptit này ở nồng độ bằng  $10^{-10}$ M và  $10^{-9}$ M. Mức độ biểu hiện IL 15 mạnh nhất thu được ở liều  $10^{-10}$  M (Fig.5A). Ở tế bào bạch cầu tiền thận, tương tự như IL1  $\beta$ , tác dụng kích thích miễn dịch của PACAP38 đối với quá trình phiên mã IL 15 $\beta$  là tương đương với tác dụng thu được ở tế bào bạch cầu máu ngoại vi. Mức độ biểu hiện IL 15 ở nhóm được chủng ngừa bằng PACAP38 mạnh hơn rất nhiều so với nhóm đối chứng âm ở nồng độ bằng  $10^{-9}$ M (Fig.5B).

#### Ví dụ 5

Thử nghiệm thử thách miễn dịch có đối chứng ở cá hồi *Caligus rogercresseyi*, họ *Salmo salar* được chủng ngừa trước bằng kháng nguyên my32, và kháng nguyên my32 phối hợp với PACAP38 theo đường tiêm màng bụng.

Protein my32 thu được ở dạng hạt tế bào *E. coli* được chuyển nạp BL21(DE3)-pET28a-my32 tái tổ hợp giảm độc lực. Đã biết rằng khi protein này được sử dụng theo đường tiêm màng bụng, nó ức chế 57% tình trạng nhiễm ký sinh trùng ở thể hệ hai khi thực hiện thử nghiệm thử thách miễn dịch trên cá hồi *C. rogercresseyi*, họ *S. salar* (Carpio et al. (2011) *Vaccine*. 29 (15):2810-20). Để kiểm chứng tác dụng hỗ trợ của PACAP đối với protein này, thử nghiệm thử thách miễn dịch có đối chứng trên cá hồi *S. salar* đã được thực hiện. Trong thử nghiệm này, 6 nhóm thử nghiệm, mỗi nhóm gồm 25 cá (trọng lượng trung bình 80g) được sử dụng.

Nhóm 1: Được tiêm màng bụng bằng PBS.

Nhóm 2: Được tiêm màng bụng bằng PACAP38 ở liều bằng 1 $\mu$ g/cá

Nhóm 3: Được tiêm màng bụng bằng my32 ở liều bằng 3 $\mu$ g/g thể trọng cá.

Nhóm 4: Được tiêm màng bụng đồng thời protein my32 ở nồng độ bằng 3 $\mu$ g/trọng lượng cơ thể cá và PACAP38 ở liều bằng 1 $\mu$ g/cá

Nhóm 5: Được tiêm màng bụng bằng protein my32 ở nồng độ bằng 3µg/trọng lượng cơ thể cá và cho ăn hàng ngày PACAP38 với lượng 250µg/kg thức ăn, trong một tuần trước và sau khi chủng ngừa bằng protein my32.

Trong quá trình thử nghiệm, cá được cho ăn hai lần một ngày với chế phẩm không chứa PACAP ở lượng bằng 1% trọng lượng cơ thể của cá, ngoại trừ nhóm 5 được cho ăn bằng chế phẩm tương tự chứa PACAP, một tuần trước và sau khi chủng ngừa như được mô tả trong tài liệu: Adelman et al. ((2008) Vaccine 26, 837-844) để sử dụng qua đường miệng chủng virus VHSV đã giảm độc lực.

Sau 500 đơn vị nhiệt bất kỳ, cá được cho thích ứng với môi trường nước biển trong hai tuần. Sau đó, cá được thử thách miễn dịch bằng 2000 ± 200 ấu trùng chân chèo ở mỗi thùng. Cá được giữ ở điều kiện không có dòng nước trong bóng tối và ở điều kiện nhiệt độ, độ muối, và oxy như được mô tả trong tài liệu: Stone et al. (*Dis Aquat Organ*, 2000, 41: 141-149) trong 24 ngày. Nước được lọc và thay mới bằng tay 48 giờ một lần. Ở ngày thứ 24, cá được gây mê và giết chết để đếm số lượng ấu trùng bằng kính hiển vi soi nổi. Kết quả được thể hiện trong Bảng 1 cho thấy mức độ nhiễm ấu trùng đã giảm ở các nhóm được chủng ngừa bằng PACAP38, my32, và PACAP38 cộng với my32. Mức độ nhiễm ký sinh trùng giảm mạnh nhất ở các nhóm 4 và nhóm 5, thể hiện tác dụng hỗ trợ của PACAP đối với kháng nguyên my32.

Bảng 1. Số lượng ấu trùng chân chèo ở cá hồi *C. rogersesseyi* sau 24 ngày thử thách miễn dịch.

| Nhóm thử nghiệm                                                     | Số lượng ấu trùng chân chèo/cá | Tỷ lệ ức chế sự nhiễm ấu trùng chân chèo (%) |
|---------------------------------------------------------------------|--------------------------------|----------------------------------------------|
| PBS                                                                 | 37 ± 3 <sup>a</sup>            | -                                            |
| PACAP38                                                             | 29 ± 5 <sup>b</sup>            | 22                                           |
| my32                                                                | 17 ± 8 <sup>c</sup>            | 55                                           |
| PACAP38-tiêm màng bụng + my32-tiêm màng bụng                        | 8 ± 3 <sup>d</sup>             | 79                                           |
| PACAP38-đường miệng + my32-tiêm màng bụng                           | 5 ± 2 <sup>e</sup>             | 86                                           |
| Mức độ khác biệt có ý nghĩa thống kê được thể hiện qua các chữ cái. |                                |                                              |

Tỷ lệ ức chế sự nhiễm ấu trùng chân chèo được tính theo công thức:  $(1 - T/C) \times 100$  (T: số lượng ấu trùng chân chèo/cá, ở nhóm được chủng ngừa, C: số lượng ấu trùng chân chèo/cá, ở nhóm giả được).

## Ví dụ 6

Tác dụng bổ trợ của PACAP đối với đáp ứng miễn dịch thể kháng lại *Aeromonas hydrophila* ở cá chép *Cyprinus carpio*

Thử nghiệm được thực hiện với cá chép *C. carpio* có trọng lượng bằng  $40 \pm 10$ g. Cá được nuôi trong bể có thể tích 600L ở nhiệt độ bằng  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ . Ba nhóm thử nghiệm, mỗi nhóm gồm 10 cá được sử dụng và tiêm màng bụng bằng các kháng nguyên sau:

Nhóm 1: PBS.

Nhóm 2: Tế bào *A. hydrophila* bất hoạt.

Nhóm 3: Tế bào *A. hydrophila* bất hoạt cộng với PACAP38 ở liều bằng  $1\mu\text{g}/\text{cá}$ .

Cá được tiêm ở ngày thứ 0 và ngày thứ 14, và mẫu máu ở tĩnh mạch đuôi được lấy ở ngày thứ 0 và 21. Kết quả thử nghiệm cho thấy nồng độ kháng thể kết dính ở nhóm được chủng ngừa bằng vi khuẩn *A. hydrophila* cộng với PACAP38 cao hơn nhiều so với nhóm được chủng ngừa chỉ bằng vi khuẩn *A. hydrophila* (Fig.6). Kết quả này đã chứng tỏ được tác dụng bổ trợ của PACAP. Số lượng tế bào *A. hydrophila* và nồng độ kháng thể được định lượng theo phương pháp được mô tả trong tài liệu: Yin et al. ((1996) Fish & Shellfish Immunology 6, 57-69).

## Ví dụ 7

Thử nghiệm thử thách miễn dịch có đối chứng ở cá chép *C. carpio* được chủng ngừa trước bằng *A. hydrophila* bất hoạt và *A. hydrophila* bất hoạt cộng với PACAP, theo đường tiêm màng bụng.

Thử nghiệm được thực hiện trên cá chép *C. carpio* có trọng lượng bằng  $30 \pm 5$  g. Các cá được nuôi trong bể có thể tích bằng 250 L ở nhiệt độ bằng  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ . Ba nhóm thử nghiệm, mỗi nhóm gồm 20 cá được sử dụng và tiêm màng bụng bằng các kháng nguyên sau:

Nhóm 1: PBS.

Nhóm 2: Tế bào *A. hydrophila* bất hoạt.

Nhóm 3: Tế bào *A. hydrophila* bất hoạt cộng với PACAP38 ở liều bằng 1µg/cá.

Cá được tiêm ở ngày thứ 0 và ngày thứ 14. Ở ngày thứ 21, cá được thử thách miễn dịch bằng vi khuẩn *A. hydrophila* ở liều LD<sub>50</sub> theo đường tiêm màng bụng và tỷ lệ chết được ghi trong 7 ngày. Tỷ lệ sống sót được tính theo công thức sau:

Tỷ lệ sống sót (%) = (tỷ lệ cá chết ở nhóm đối chứng (%) – tỷ lệ cá chết ở nhóm được chủng ngừa (%))/(tỷ lệ cá chết ở nhóm đối chứng (%))x100

Kết quả thử nghiệm cho thấy tỷ lệ sống sót của cá ở nhóm 2 bằng 65% và tỷ lệ sống sót của cá ở nhóm 3 bằng 95%, điều này chứng tỏ rằng việc sử dụng PACAP đã làm tăng tỷ lệ sống sót của cá được chủng ngừa và thử thách miễn dịch lại bằng vi khuẩn *A. hydrophila*.

#### Ví dụ 8

Hiệu quả của việc sử dụng đồng thời PACAP với vacxin ADN chứa gen mã hóa polyprotein VP2-VP4VP3-NH2-COOH có trọng lượng phân tử bằng 106 kDa của virus IPNV, ở cá hồi cầu vồng *Oncorhynchus mykiss* đã được thử thách miễn dịch bằng virus này.

Thử nghiệm được thực hiện để đánh giá hiệu quả của việc sử dụng đồng thời theo đường tiêm bắp PACAP với vacxin ADN chứa gen mã hóa polyprotein VP2-VP4VP3-NH2-COOH có trọng lượng phân tử bằng 106 kDa của virus IPNV, ở cá hồi cầu vồng *Oncorhynchus mykiss* đã được thử thách miễn dịch bằng virus này. Sáu nhóm thử nghiệm, mỗi nhóm gồm 15 cá có trọng lượng cơ thể bằng 12±1g được sử dụng và nuôi trong nước có nhiệt độ nằm trong khoảng từ 10°C đến 12°C.

Nhóm 1: Cá được tiêm bằng PBS.

Nhóm 2: Cá được tiêm bằng vacxin ADN (pP-IPNV) ở liều bằng 1µg/cá.

Nhóm 3: Cá được tiêm đồng thời bằng vacxin ADN (pP-IPNV) ở liều bằng 1µg/cá và plasmid chứa trình tự ADN bổ sung mã hóa cho PACAP của *C. gariepinus* và vùng khởi đầu của *xytomegalovirus* gây bệnh ở người (pCMV-PACAP) ở liều bằng 0,5µg/cá.

Nhóm 4: Cá được tiêm đồng thời bằng vaccin pP-IPNV ( $1\mu\text{g}/\text{cá}$ ) và plasmit đối chứng âm pCMV ở liều bằng  $0,5\mu\text{g}/\text{cá}$ .

Nhóm 5 Cá được tiêm đồng thời bằng vaccin ADN (pP-IPNV) ở liều bằng  $1\mu\text{g}/\text{cá}$  và plasmit chứa trình tự ADN bổ sung mã hóa cho PACAP của *C. gariepinus* và vùng khởi đầu của *xytomegalovirus* gây bệnh ở người (pCMV-PACAP) ở liều bằng  $0,05\mu\text{g}/\text{cá}$ .

Nhóm 6: Cá được tiêm đồng thời bằng vaccin pP-IPNV ( $1\mu\text{g}/\text{cá}$ ) với plasmit đối chứng âm pCMV ở liều bằng  $0,05\mu\text{g}/\text{cá}$ .

Ở ngày thứ 30 sau khi chủng ngừa, cá được thử thách miễn dịch bằng cách tiêm màng bụng  $100\mu\text{L}$  virus IPNV ( $1 \times 10^7 \text{ TCID}_{50} \text{ mL}^{-1}/\text{cá}$ ). 7 ngày sau khi lây nhiễm, 10 cá ở mỗi nhóm được giết chết và số lượng virus IPNV được đếm ở tế bào tiên thận. Để đếm số lượng virus IPNV, ARN được phân lập từ các mẫu riêng biệt và thực hiện phản ứng PCR định lượng từ  $1\mu\text{g}$  ARN này. Mức độ biểu hiện gen VP1 được đánh giá bằng phương pháp PCR định lượng. Kết quả được thể hiện trên Fig.7. Việc sử dụng đồng thời pP-IPNV và pCMV-PACAP đã làm giảm đáng kể số lượng virus IPNV so với nhóm được tiêm đồng thời bằng pP-IPNV và vector virus trống. Không có sự khác biệt giữa các liều pCMV-PACAP được thử nghiệm.

#### Ví dụ 9

Hiệu quả của việc sử dụng đồng thời PACAP và vaccin ADN chứa gen mã hóa glycoprotein của virus VHSV, ở cá hồi cầu vồng *Oncorhynchus mykiss* đã được thử thách miễn dịch bằng virus này.

Thử nghiệm được thực hiện để đánh giá hiệu quả của việc sử dụng đồng thời theo đường tiêm bắp PACAP của *C. gariepinus* với vaccin ADN chứa gen mã hóa glycoprotein của virus VHSV, ở cá hồi cầu vồng *Oncorhynchus mykiss* đã được thử thách miễn dịch bằng virus này. Bốn nhóm thử nghiệm, mỗi nhóm gồm 20 cá có trọng lượng cơ thể bằng  $10 \pm 2 \text{ g}$ , được sử dụng và nuôi trong nước có nhiệt độ nằm trong khoảng từ  $10^\circ\text{C}$  đến  $12^\circ\text{C}$ .

Nhóm 1: Cá được tiêm bằng PBS.

Nhóm 2: Cá được tiêm bằng vaccin ADN pG-VHSV ở liều bằng  $0,01\mu\text{g}/\text{cá}$ .

Nhóm 3: Cá được tiêm đồng thời bằng vaccin ADN pG-VHSV ở liều 0,01µg/cá và PACAP của *C. gariepinus* ở liều bằng 0,1µg/cá.

Nhóm 4: Cá được tiêm đồng thời bằng vaccin ADN pG-VHSV ở liều bằng 0,01µg/cá và PACAP của *C. gariepinus* ở liều bằng 0,5µg/cá.

Ở tuần thứ 4 sau khi chủng ngừa, cá được thử thách miễn dịch bằng virus VHSV bằng cách đưa vào bể ngâm. Quá trình thử thách miễn dịch được thực hiện trong 2 giờ trong nước chứa virus VHSV ở liều bằng  $1 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/cá mL<sup>-1</sup>. Tỷ lệ cá chết được đánh giá ở tuần thứ 4 sau khi thử thách miễn dịch và kết quả thử nghiệm được thể hiện trên Fig.8.

Kết quả cho thấy việc sử dụng đồng thời PACAP với vaccin ADN pG-VHSV đã làm giảm tỷ lệ cá chết xuống còn 15% và 29% so với việc chỉ sử dụng riêng vaccin ADN pG-VHSV, ở liều tương ứng bằng 0,1µg và 0,5µg PACAP/cá.

#### Ví dụ 10

Hiệu quả của việc sử dụng đồng thời PACAP đối với tỷ lệ sống sót của cá nheo đốm *Ictalurus punctatus* sau khi chủng ngừa bằng ấu trùng của ký sinh trùng có lông *Ichthyophthirius multifiliis*.

Thử nghiệm được thực hiện để đánh giá hiệu quả của việc sử dụng PACAP đối với tỷ lệ sống sót của cá nheo đốm *I. punctatus*, sau khi chủng ngừa bằng ấu trùng của ký sinh trùng có lông *I. multifiliis*. Quá trình chủng ngừa và thử thách miễn dịch được thực hiện theo phương pháp được Wang và Dickerson mô tả trong tài liệu : ((2002) *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 9 (1), 176-181). Bốn nhóm thử nghiệm, mỗi nhóm gồm 25 cá có trọng lượng bằng  $12 \pm 5$ g được sử dụng:

Nhóm 1: Cá được chủng ngừa ở các ngày thứ 1 và thứ 35 bằng PBS.

Nhóm 2: Cá được chủng ngừa ở ngày thứ 1 bằng 8.000 ấu trùng sống của ký sinh trùng có lông *I. multifiliis* và ở ngày thứ 35 bằng 10.000 ấu trùng sống của ký sinh trùng có lông *I. multifiliis*.

Nhóm 3: Cá được chủng ngừa ở ngày thứ 1 bằng 8.000 ấu trùng sống của ký sinh trùng có lông *I. multifiliis* và ở ngày thứ 35 bằng 10.000 ấu trùng sống của ký sinh trùng có lông *I. multifiliis*. Các cá này cũng được chủng ngừa bằng PACAP qua bể ngâm ở liều bằng 100µg/L nước. Quá trình chủng ngừa được thực hiện trong 1 giờ, vào những ngày còn lại, trong hai tuần trước khi thực hiện quá trình thử thách miễn dịch (sáu lần qua bể ngâm).

Nhóm 4: Cá được chủng ngừa ở ngày thứ 1 bằng 8.000 ấu trùng sống của ký sinh trùng có lông *I. multifiliis* và ở ngày thứ 35 bằng 10.000 ấu trùng sống của ký sinh trùng có lông *I. multifiliis*. Các cá này cũng được chủng ngừa trong 1 giờ nhưng không bằng PACAP, theo quy trình được thực hiện tương tự như đối với nhóm 3.

Trước khi chủng ngừa, các cá được xử lý bằng formalin để loại bỏ các ký sinh trùng. Các cá được nuôi ở nhiệt độ  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$  và cung cấp nước liên tục. Ở ngày thứ 84, các cá được thử thách miễn dịch bằng 15.000 ấu trùng sống của ký sinh trùng có lông *I. multifiliis*. Tỷ lệ cá chết được đánh giá trong vòng 30 ngày sau khi thử thách miễn dịch. Kết quả thử nghiệm được thể hiện trên Bảng 2 cho thấy tỷ lệ sống sót của cá được chủng ngừa đồng thời bằng PACAP và ấu trùng sống của ký sinh trùng có lông *I. multifiliis* đã tăng 27%.

Bảng 2. Tỷ lệ sống sót của cá nheo đốm *I. punctatus* được chủng ngừa và thử thách miễn dịch bằng ấu trùng sống của ký sinh trùng có lông *I. multifiliis*, sau khi chủng ngừa bằng PACAP qua bể ngâm.

| Nhóm thử nghiệm                                                                                                                                     | Cá được thử thách miễn dịch/Cá sống sót | Tỷ lệ sống sót (%) |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------|
| PBS                                                                                                                                                 | 25/0                                    | 0                  |
| Ấu trùng sống                                                                                                                                       | 25/15                                   | 60                 |
| Ấu trùng sống và PACAP <sup>ib</sup>                                                                                                                | 25/22                                   | 87                 |
| Ấu trùng sống + <sup>ib</sup>                                                                                                                       | 25/14                                   | 56                 |
| ib: Các cá được chủng ngừa trong 1 giờ, sau 6 lần qua bể ngâm, ở các ngày còn lại trong hai tuần trước khi thực hiện quá trình thử thách miễn dịch. |                                         |                    |

**YÊU CẦU BẢO HỘ**

1. Chế phẩm vacxin chứa peptit hoạt hóa adenylat xyclaza tuyến yên (PACAP- pituitary adenylate cyclase activating peptide), ít nhất một kháng nguyên vacxin đặc hiệu đối với tác nhân truyền nhiễm, và chất mang hoặc tá dược pha loãng được dụng, trong đó chế phẩm vacxin này chứa PACAP và kháng nguyên vacxin ở lượng đủ để tạo ra tác dụng phòng ngừa bệnh truyền nhiễm do các tác nhân truyền nhiễm gây ra ở cá.
2. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm này được bào chế để dùng qua đường miệng, đường tiêm hoặc qua bể ngâm.
3. Chế phẩm theo điểm 2, trong đó (1) PACAP được sử dụng ở liều nằm trong khoảng từ 50µg/kg đến 750µg/kg thức ăn dưới dạng thức ăn chăn nuôi, (2) ở liều nằm trong khoảng từ 0,1µg/g đến 10µg/g thể trọng theo đường tiêm, hoặc (3) ở liều nằm trong khoảng từ 50µg/L đến 1000µg/L nước qua bể ngâm.
4. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó PACAP thu được bằng cách: a) phân lập từ nguồn tự nhiên, b) bằng phương pháp tổng hợp hóa học, hoặc c) bằng công nghệ ADN tái tổ hợp.
5. Chế phẩm theo điểm 4, trong đó (1) PACAP được sử dụng ở liều nằm trong khoảng từ 50µg/kg đến 750µg/kg thức ăn dưới dạng thức ăn chăn nuôi, (2) ở liều nằm trong khoảng từ 0,1µg/g đến 10µg/g thể trọng theo đường tiêm, hoặc (3) ở liều nằm trong khoảng từ 50µg/L đến 1000µg/L nước qua bể ngâm.
6. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó PACAP được điều bằng cách sử dụng vectơ chứa ADN bổ sung mã hóa PACAP.
7. Tổ hợp vacxin chứa peptit hoạt hóa adenylat xyclaza tuyến yên (PACAP- pituitary adenylate cyclase activating peptide), và ít nhất một kháng nguyên vacxin đặc hiệu đối với tác nhân truyền nhiễm, trong đó tổ hợp vacxin này chứa PACAP và kháng nguyên vacxin ở lượng đủ để tạo ra tác dụng phòng ngừa bệnh truyền nhiễm do các tác nhân truyền nhiễm gây ra ở cá và được sử dụng trong cùng phác đồ tiêm phòng.
8. Tổ hợp theo điểm 7, trong đó PACAP và kháng nguyên vacxin được sử dụng đồng thời, riêng biệt hoặc liên tiếp trong cùng phác đồ tiêm phòng.

9. Tổ hợp theo điểm 8, trong đó (1) PACAP được sử dụng ở liều nằm trong khoảng từ 50µg/kg đến 750µg/kg thức ăn dưới dạng thức ăn chăn nuôi, (2) ở liều nằm trong khoảng từ 0,1µg/g đến 10µg/g thể trọng theo đường tiêm, hoặc (3) ở liều nằm trong khoảng từ 50µg/L đến 1000µg/L nước qua bể ngâm.

Fig.1

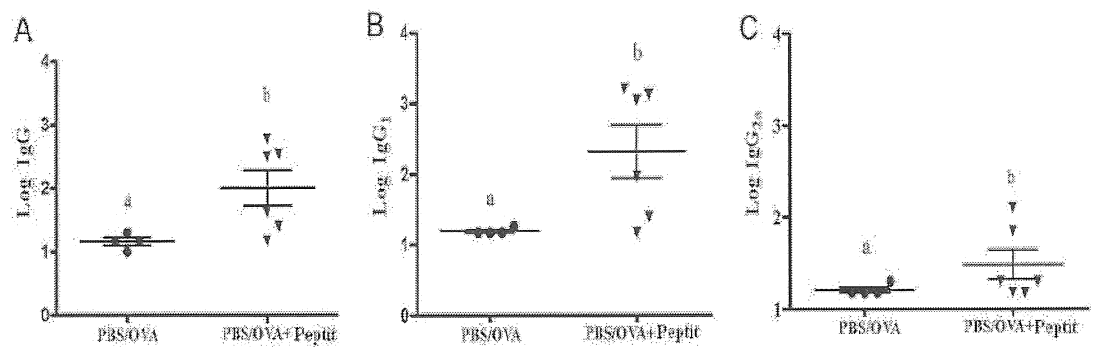


Fig.2

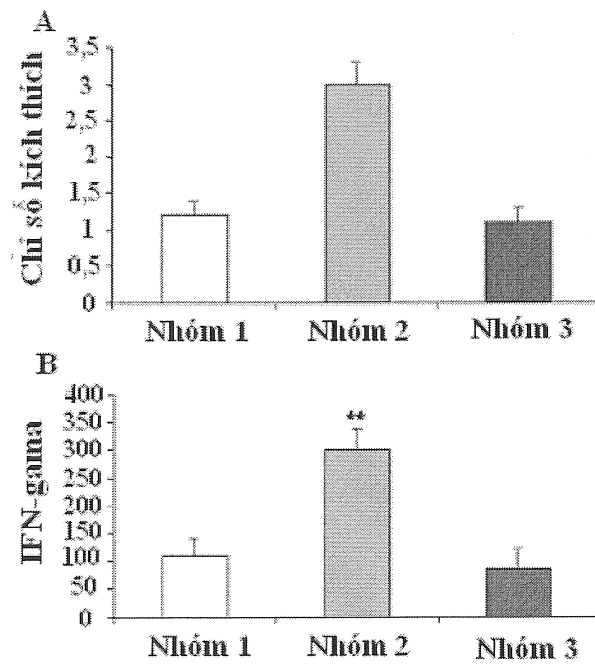


Fig.3

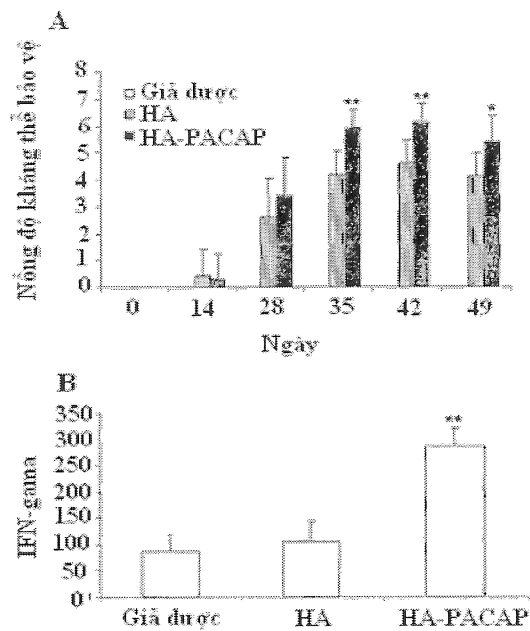


Fig.4

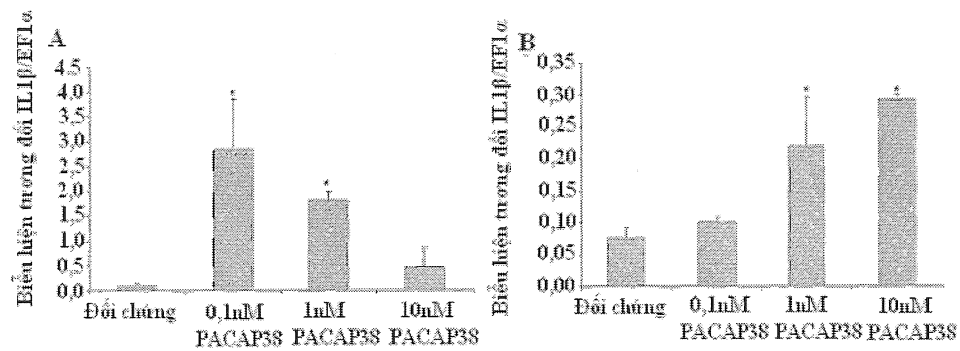


Fig.5

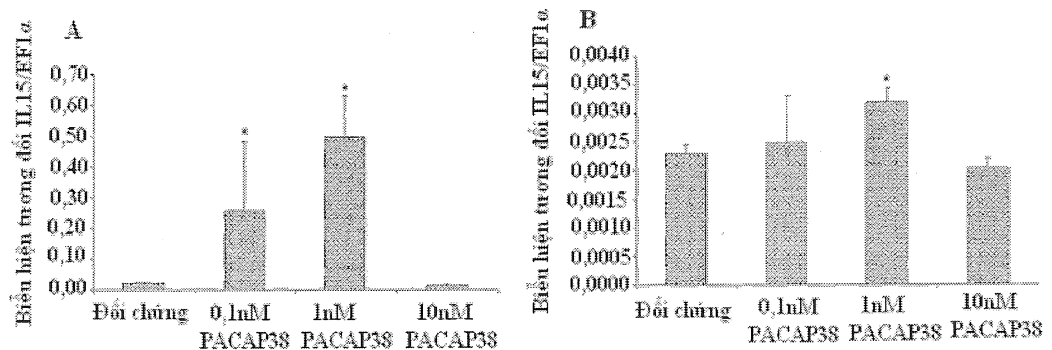


Fig.6

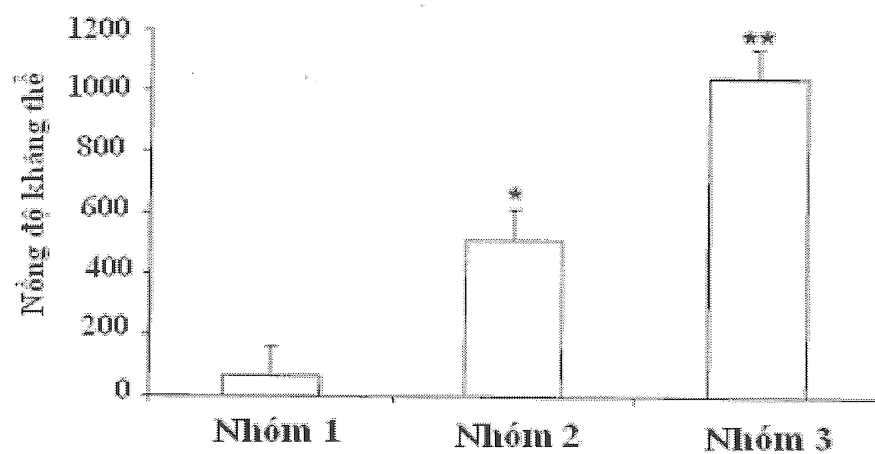


Fig.7

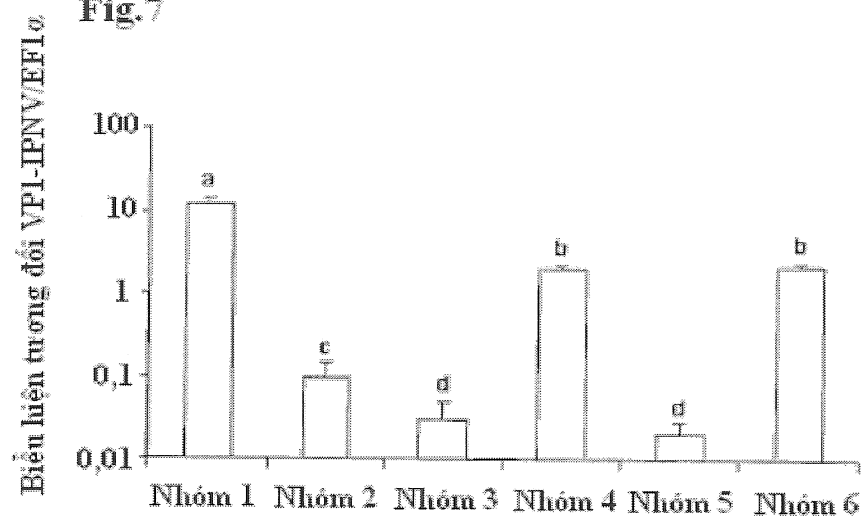


Fig.8

