



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

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

(11)



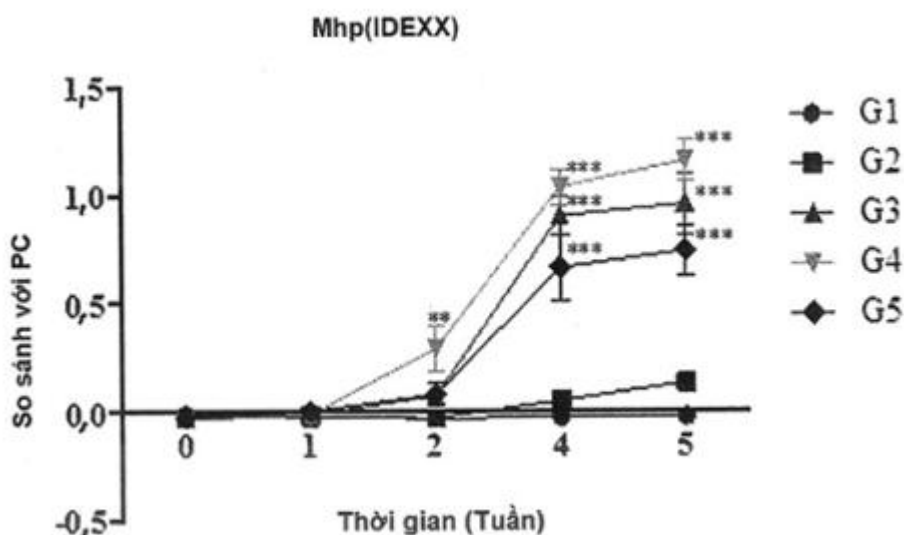
1-0033974

(51)⁷ C12N 15/74; C07K 14/30; A61K 39/00; (13) B
A61K 39/02

- (21) 1-2019-01135 (22) 14/08/2017
(86) PCT/KR2017/008851 14/08/2017 (87) WO2018/030878 15/02/2018
(30) 10-2016-0103259 12/08/2016 KR
(45) 25/11/2022 416 (43) 26/08/2019 377A
(73) INNOVAC (KR)
2F, 37, Useok-ro, Chuncheon-si, Gangwon-do 24326, Republic of Korea
(72) HAHN, Tae Wook (KR); BARATE, Kashinath Abhijit (IN); KIM, Ki Ju (KR);
SHIN, Woo Sung (KR).
(74) Công ty TNHH Trà và cộng sự (TRA & ASSOCIATES CO.,LTD)

(54) PROTEIN TÁI TỔ HỢP ĐỂ SẢN XUẤT VACXIN NGĂN NGỪA NHIỄM
MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE Ở LỢN VÀ CHẾ PHẨM VACXIN BAO
GỒM PROTEIN NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến protein tái tổ hợp để sản xuất chế phẩm vacxin ngăn ngừa nhiễm *Mycoplasma* ở lợn, và chế phẩm vacxin ngăn ngừa nhiễm *Mycoplasma hyopneumoniae* và *Mycoplasma hyorhinis* ở lợn bao gồm protein tái tổ hợp. Khi các protein tái tổ hợp để sản xuất vacxin theo sáng chế được thêm vào chế phẩm vacxin ngăn ngừa nhiễm *Mycoplasma* ở lợn, đáp ứng miễn dịch đối với chủng *Mycoplasma hyopneumoniae* và *Mycoplasma hyorhinis* ở lợn và đáp ứng miễn dịch đối với protein P97 tăng. Kết quả là vacxin này thể hiện tác dụng bảo vệ tốt hơn so với vacxin thương mại hiện có. Vì vậy, các protein tái tổ hợp để sản xuất vacxin theo sáng chế và các chế phẩm vacxin sử dụng các protein tái tổ hợp có thể ngăn một cách hiệu quả các bệnh gây ra do nhiễm *Mycoplasma hyopneumoniae* và *Mycoplasma hyorhinis*, đặc biệt là viêm phổi dẫn xuất *Mycoplasma* ở lợn và viêm khớp dẫn xuất *Mycoplasma* ở lợn.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến protein tái tổ hợp để sản xuất chế phẩm vacxin ngăn ngừa nhiễm *Mycoplasma* ở lợn, và cụ thể hơn sáng chế đề cập đến chế phẩm vacxin ngăn ngừa nhiễm *Mycoplasma hyopneumoniae* và *Mycoplasma hyorhinis* chứa protein tái tổ hợp.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Mycoplasma hyopneumoniae là tác nhân gây bệnh đường hô hấp kết hợp với bệnh hô hấp phức hợp ở lợn (PRDC) và viêm phổi động vật (EP). *Mycoplasma hyopneumoniae* có thể có các khuẩn lạc trên các tế bào lông rung đường hô hấp gây nhiễm trùng để hoạt động như một nguyên nhân gây viêm phổi *Mycoplasma* ở lợn.

Sự nhiễm trùng đơn *mycoplasma hyopneumoniae* gây ra các triệu chứng như ho khan. Tuy nhiên, khi *Mycoplasma hyopneumoniae* kết hợp nhiễm trùng với các tác nhân gây bệnh đường hô hấp khác, điều này gây ra các triệu chứng đường hô hấp nghiêm trọng, giảm sự hoạt động của các đại thực bào, và cũng gây ra việc mất chức năng bảo vệ cơ bản ngăn sự xâm nhập của các tác nhân gây bệnh khác, theo cách đó làm tăng rủi ro nhiễm tác nhân gây bệnh bổ sung.

Ngoài *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyorhinis* nổi lên như một tác nhân gây bệnh mới đối với các nhiễm trùng đường hô hấp ở lợn. *Mycoplasma hyorhinis* đã được báo cáo là sự nhiễm trùng hỗn hợp với virus đường hô hấp sinh dục lợn làm trầm trọng bệnh lý. *Mycoplasma hyorhinis* đơn cũng được biết đến gây ra các bệnh tích (thuộc gan) mycoplasma được biểu hiện dưới dạng *Mycoplasma hyopneumoniae*. Thêm vào đó, *Mycoplasma hyorhinis* cũng tạo ra các bệnh tích trong phổi giống các bệnh tích gan như liều lượng *Mycoplasma hyopneumoniae* và là tác nhân gây bệnh cao.

Để ngăn ngừa nhiễm *Mycoplasma hyopneumoniae* gây ra tổn hại lớn đối với các trang trại lợn, vacxin bất hoạt hiện tại đã được thương mại hóa và được sử dụng. Vacxin bất hoạt này là vacxin hiện tại duy nhất sẵn có cho viêm phổi do *Mycoplasma* ở lợn. Tuy nhiên, hầu hết các vacxin bất hoạt *Mycoplasma hyopneumoniae* có bán trên

thị trường không tạo ra các kháng thể sau khi tiêm chủng cho lợn. Mặc dù các triệu chứng lâm sàng có thể được giảm bớt bằng các vaccin bất hoạt *Mycoplasma hyopneumoniae* đang bán trên thị trường nhưng các vaccin bất hoạt *Mycoplasma hyopneumoniae* đang bán trên thị trường có hạn chế về kỹ thuật trong đó các vaccin bất hoạt *Mycoplasma hyopneumoniae* đang bán trên thị trường không thể ngăn sự nhiễm trùng tự nhiên và khuẩn lạc của *Mycoplasma hyopneumoniae* trên các tế bào lông rung đường hô hấp. Do đó, điều quan trọng phát triển một loại vaccin hiệu quả để khắc phục các hạn chế này.

Sự nhiễm *Mycoplasma hyopneumoniae* bắt đầu khi các tác nhân gây bệnh bám vào các lông rung của các tế bào biểu mô đường hô hấp. Adhesin P97 là protein bề mặt màng của *Mycoplasma hyopneumoniae* và được biết đến là một kháng nguyên miễn dịch cao. Tại đầu tận cùng C của P97, có các vị trí R1 và R2 được lặp lại. Vị trí R1 liên kết với vị trí gắn (AAKPV/E) của lông rung hô hấp vật chủ. *Mycoplasma hyopneumoniae* đã liên kết có thể thu được axit amin cần cho sự phát triển từ vật chủ. *Mycoplasma hyopneumoniae* có thể làm cho các phân tử của vật chủ để sắp xếp theo các hướng khác nhau để xâm nhập vào mô bị thương. Mặt khác, vật chủ có thể sinh ra các kháng thể ngăn việc *Mycoplasma hyopneumoniae* bám vào lông rung lợn hoặc có thể ức chế sự sinh trưởng của các tác nhân gây bệnh gắn vào. Tuy nhiên, các nghiên cứu trước báo cáo rằng các vaccin đang được bán trên thị trường thông thường không thể cảm ứng các kháng thể với P97.

Vì vậy, cần một vaccin mới có thể ngăn ngừa nhiễm trùng tự nhiên của việc nhiễm *Mycoplasma* ở lợn, đặc biệt là *Mycoplasma hyopneumoniae* và *Mycoplasma hyorhinis*, và tạo ra các kháng thể một cách hiệu quả.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Trong khi các tác giả sáng chế đang phát triển một loại vaccin ngăn ngừa *Mycoplasma hyopneumoniae* và *Mycoplasma hyorhinis* một cách hiệu quả, các tác giả sáng chế xác nhận rằng vaccin bao gồm protein P97 tái tổ hợp sử dụng protein P97 protein gắn kết dẫn xuất *Mycoplasma hyopneumoniae* thể hiện đáp ứng miễn dịch cao đáng kể so với các vaccin thương mại thông thường. Theo cách này, sáng chế đã được hoàn thành.

Do đó, mục đích của sáng chế là đề xuất một protein tái tổ hợp để sản xuất vaccin ngăn ngừa nhiễm *Mycoplasma hyopneumoniae* ở lợn, trong đó protein bao gồm một trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 1. Hơn nữa, mục đích của sáng chế cũng đề xuất chế phẩm vaccin ngăn ngừa nhiễm *Mycoplasma hyopneumoniae* bao gồm protein tái tổ hợp.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất protein tái tổ hợp để sản xuất vaccin ngăn ngừa nhiễm *Mycoplasma hyopneumoniae* ở lợn và *Mycoplasma hyorhinis* ở lợn, trong đó protein bao gồm một trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 13. Hơn nữa, mục đích của sáng chế cũng đề xuất chế phẩm vaccin ngăn ngừa nhiễm *Mycoplasma hyopneumoniae* và *Mycoplasma hyorhinis* bao gồm protein tái tổ hợp.

Để đạt được các mục đích trên đây, sáng chế đề xuất protein tái tổ hợp để sản xuất vaccin ngăn ngừa nhiễm *Mycoplasma hyopneumoniae* ở lợn, protein này bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 1.

Hơn nữa, sáng chế đề xuất các polynucleotit mã hóa protein tái tổ hợp.

Hơn nữa, sáng chế đề xuất chế phẩm vaccin ngăn ngừa nhiễm *Mycoplasma hyopneumoniae*, trong đó chế phẩm này bao gồm protein tái tổ hợp.

Hơn nữa, sáng chế đề xuất tá dược vaccin ngăn ngừa nhiễm *Mycoplasma hyopneumoniae* bao gồm protein tái tổ hợp.

Hơn nữa, sáng chế đề xuất chế phẩm vaccin ngăn ngừa bệnh do nhiễm *Mycoplasma hyopneumoniae* gây ra, chế phẩm bao gồm protein tái tổ hợp.

Hơn nữa, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất các tá dược vaccin ngăn ngừa nhiễm *Mycoplasma hyopneumoniae*, trong đó phương pháp này bao gồm 1) tạo ra vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa protein tái tổ hợp được nêu trong SEQ ID NO: 1; 2) biến nạp vật chủ sử dụng vectơ này; và 3) biểu hiện protein tái tổ hợp trong vật chủ đã được biến nạp.

Hơn nữa, sáng chế đề xuất phương pháp ngăn ngừa nhiễm *Mycoplasma hyopneumoniae* ở lợn, trong đó phương pháp bao gồm tiêm chủng chế phẩm vaccin cho lợn.

Hơn nữa, sáng chế đề xuất protein tái tổ hợp để sản xuất vaccin ngăn ngừa nhiễm *Mycoplasma hyopneumoniae* và *Mycoplasma hyorhinis* ở lợn, trong đó protein bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 13.

Hơn nữa, sáng chế đề xuất polynucleotit mã hóa protein tái tổ hợp.

Hơn nữa, sáng chế đề xuất chế phẩm vaccin ngăn ngừa nhiễm *Mycoplasma hyopneumoniae* và *Mycoplasma hyorhinis* ở lợn bao gồm protein tái tổ hợp.

Hơn nữa, sáng chế đề xuất tá dược vaccin ngăn ngừa nhiễm *Mycoplasma hyopneumoniae* và *Mycoplasma hyorhinis* ở lợn bao gồm protein tái tổ hợp.

Hơn nữa, sáng chế đề xuất chế phẩm vaccin ngăn ngừa bệnh do nhiễm *Mycoplasma hyopneumoniae* và *Mycoplasma hyorhinis* ở lợn gây ra, trong đó chế phẩm bao gồm protein tái tổ hợp.

Hơn nữa, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất tá dược vaccin ngăn ngừa nhiễm *Mycoplasma hyopneumoniae* và *Mycoplasma hyorhinis* ở lợn, phương pháp bao gồm 1) tạo ra vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa protein tái tổ hợp được nêu trong SEQ ID NO: 13; 2) biến nạp vật chủ sử dụng vectơ này; và 3) biểu hiện protein tái tổ hợp trong vật chủ đã được biến nạp.

Hơn nữa, sáng chế đề xuất phương pháp ngăn ngừa nhiễm *Mycoplasma hyopneumoniae* và *Mycoplasma hyorhinis* ở lợn, phương pháp bao gồm tiêm chủng chế phẩm vaccin cho lợn.

Ưu điểm của sáng chế

Khi các protein tái tổ hợp dùng cho việc sản xuất vaccin theo sáng chế được thêm vào chế phẩm vaccin ngăn ngừa nhiễm *Mycoplasma* ở lợn, đáp ứng miễn dịch với *Mycoplasma hyopneumoniae* ở lợn và chủng *Mycoplasma hyorhinis* ở lợn và đáp ứng miễn dịch với protein P97 tăng. Vì vậy, vaccin hiện tại thể hiện hiệu quả bảo vệ vượt trội so với vaccin hiện có trên thị trường. Do đó, các protein tái tổ hợp để sản xuất vaccin và các chế phẩm vaccin sử dụng các protein tái tổ hợp có thể ngăn ngừa được các bệnh do *Mycoplasma hyopneumoniae* và *Mycoplasma hyorhinis* gây ra một cách hiệu quả, đặc biệt là các bệnh viêm phổi do *Mycoplasma* ở lợn và chứng viêm khớp do *Mycoplasma* gây ra.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 minh họa các kết quả nhận biết các kháng thể đặc hiệu *Mycoplasma hyopneumoniae* sau khi tiêm vaccin Mycoplasma 1-giá lợn bao gồm protein rP97 cho lợn 3 tuần tuổi. Tất cả dữ liệu thử nghiệm được biểu thị bằng giá trị trung bình $\pm$ S.D. Các khác biệt đáng kể giữa vaccin và các nhóm PBS được biểu thị là * ($P < 0,05$) và ** ($P < 0,01$) (G1: dịch tan chứa protein tái tổ hợp Mhp HID3138 + rP97, G2: dịch tan chứa protein tái tổ hợp Mhp HID3117 + rP97, G3: dịch tan chứa protein tái tổ hợp rP97, G4: riêng nước muối, G5: vaccin thương mại Mycoflex®) (DPV: ngày sau khi tiêm vaccin)

Fig.2 minh họa các kết quả đánh giá các chuẩn độ kháng thể đặc hiệu rP97 sử dụng ELISA gián tiếp sau khi tiêm chủng vaccin Mycoplasma 1-giá ở lợn bao gồm protein rP97 cho lợn 3 tuần tuổi. Tất cả dữ liệu thử nghiệm được biểu thị bằng giá trị trung bình $\pm$ S.D. Các sự khác biệt đáng kể giữa vaccin và các nhóm PBS được biểu thị là *** ($P < 0,001$) (G1: dịch tan chứa protein tái tổ hợp Mhp HID3138 + rP97, G2: dịch tan chứa protein tái tổ hợp Mhp HID3117 + rP97, G3: dịch tan chứa protein tái tổ hợp rP97, G4: riêng nước muối, G5: vaccin được thương mại Mycoflex®) (DPV: ngày sau khi tiêm vaccin).

Fig.3A minh họa sự so sánh giữa các cấu trúc mẫu của protein tái tổ hợp rP97m được nêu trong SEQ ID NO: 1 và protein tái tổ hợp rP97m được nêu trong SEQ ID NO: 13.

Fig.3B minh họa sự so sánh giữa protein tái tổ hợp rP97m được nêu trong SEQ ID NO: 1 và protein tái tổ hợp rP97m được nêu trong SEQ ID NO: 13.

Fig.4 minh họa các kết quả kháng thể đặc hiệu *Mycoplasma hyopneumoniae* sử dụng IDEXX M. hyo ELISA với các huyết thanh thu được từ lợn trước khi tiêm vaccin Mycoplasma 2-giá ở lợn bao gồm protein tái tổ hợp rP97m, và lên đến 5 tuần sau khi tiêm. Tất cả dữ liệu thử nghiệm được biểu thị bằng giá trị trung bình $\pm$ S.D. Các sự khác biệt đáng kể giữa vaccin và các nhóm PBS được biểu thị là ** ($P < 0,01$) và *** ($P < 0,001$) (G1: riêng PBS, G2: vaccin thương mại Respire®), G3: Mhp HID3134 + Mhr HID3224 + rP97m, G4: Mhp HID3140 + Mhr HID3224 + rP97m, G5: Mhp HID3138 + Mhr HID3224 + rP97m).

Fig.5 minh họa các kết quả đánh giá các chuẩn độ kháng thể đặc hiệu rP97m sử dụng ELISA gián tiếp với các huyết thanh thu được từ lợn trước khi tiêm vaccin Mycoplasma 2-giá ở lợn bao gồm protein tái tổ hợp rP97m, và lên đến 5 tuần sau khi tiêm. Tất cả dữ liệu thử nghiệm được biểu thị bằng giá trị trung bình $\pm$ S.D. Các sự khác biệt đáng kể giữa vaccin và các nhóm PBS được thể hiện là *** ($P < 0,001$) (G1: riêng PBS, G2: vaccin thương mại Respisure®, G3: Mhp HID3134 + Mhr HID3224 + rP97m, G4: Mhp HID3140 + Mhr HID3224 + rP97m, G5: Mhp HID3138 + Mhr HID3224 + rP97m).

Fig.6 minh họa các kết quả đánh giá các chuẩn độ kháng thể đặc hiệu *Mycoplasma hyorhinis* sử dụng thử nghiệm ELISA gián tiếp với các huyết thanh thu được từ lợn trước khi tiêm vaccin Mycoplasma 2-giá ở lợn bao gồm protein tái tổ hợp rP97m, và lên đến 5 tuần sau khi tiêm, trong thử nghiệm ELISA, tất cả *Mycoplasma hyorhinis* đã được sử dụng làm các kháng nguyên. Tất cả dữ liệu thử nghiệm được biểu thị bằng giá trị trung bình $\pm$ S.D. Các sự khác biệt đáng kể giữa vaccin và các nhóm PBS được thể hiện là ** ($P < 0,01$) (G1: riêng PBS, G2: vaccin thương mại Respisure®, G3: Mhp HID3134 + Mhr HID3224 + rP97m, G4: Mhp HID3140 + Mhr HID3224 + rP97m, G5: Mhp HID3138 + Mhr HID3224 + rP97m).

Fig.7 minh họa các kết quả đánh giá việc tạo ra gama interferon sau khi PBMC (Tế bào Đơn nhân Máu Ngoại vi) được phân lập từ máu thu được sau 2 tuần sau khi tiêm cho lợn bằng vaccin Mycoplasma 2-giá ở lợn bao gồm protein tái tổ hợp rP97m, và, sau đó, PBMC được kích thích bằng chủng bất hoạt *Mycoplasma hyopneumoniae*. Tất cả dữ liệu thử nghiệm được biểu thị bằng giá trị trung bình $\pm$ S.D. Các sự khác nhau đáng kể giữa nhóm vaccin và nhóm vaccin thương mại là ** ($P < 0,05$) và *** ($P < 0,001$) (G1: riêng PBS, G2: vaccin thương mại Respisure®, G3: Mhp HID3134 + Mhr HID3224 + rP97m, G4: Mhp HID3140 + Mhr HID3224 + rP97m, G5: Mhp HID3138 + Mhr HID3224 + rP97m).

Fig.8 minh họa các kết quả so sánh sự thay đổi trọng lượng lợn trước và sau khi tiêm cho lợn bằng vaccin Mycoplasma 2-giá ở lợn bao gồm protein tái tổ hợp rP97m (G1: riêng PBS, G2: vaccin thương mại Respisure®, G3: Mhp HID3134 + Mhr HID3224 + rP97m, G4: Mhp HID3140 + Mhr HID3224 + rP97m, G5: Mhp HID3138 + Mhr HID3224 + rP97m).

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến protein tái tổ hợp để sản xuất vaccin ngăn ngừa nhiễm *Mycoplasma hyopneumoniae* ở lợn, protein bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 1, và đề cập đến polynucleotit mã hóa protein tái tổ hợp.

Hơn nữa, sáng chế đề cập đến protein tái tổ hợp để sản xuất vaccin ngăn ngừa nhiễm *Mycoplasma hyopneumoniae* và *Mycoplasma hyorhinis* ở lợn, protein này bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 13 và đề cập đến polynucleotit mã hóa protein tái tổ hợp.

Hơn nữa, sáng chế đề cập đến việc sử dụng protein tái tổ hợp để sản xuất vaccin ngăn ngừa nhiễm *Mycoplasma hyopneumoniae* ở lợn, protein này bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 1.

Hơn nữa, sáng chế đề cập đến việc sử dụng protein tái tổ hợp để sản xuất vaccin ngăn ngừa nhiễm *Mycoplasma hyopneumoniae* và *Mycoplasma hyorhinis* ở lợn, protein này bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 13.

Hơn nữa, sáng chế đề cập đến protein tái tổ hợp sử dụng trong việc sản xuất vaccin ngăn ngừa nhiễm *Mycoplasma hyopneumoniae* ở lợn, protein này bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 1.

Hơn nữa, sáng chế đề cập đến protein tái tổ hợp sử dụng để sản xuất vaccin ngăn ngừa nhiễm *Mycoplasma hyopneumoniae* và *Mycoplasma hyorhinis* ở lợn, protein này bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 13.

Khi protein tái tổ hợp bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 1 có trong vaccin 1-giá ngăn ngừa nhiễm *Mycoplasma hyopneumoniae*, P97, liên quan đến việc lây nhiễm sớm và sự xâm nhập của *Mycoplasma hyopneumoniae*, có thể cảm ứng hiệu quả hơn các đáp ứng miễn dịch tế bào và thể dịch chống lại *Mycoplasma hyopneumoniae* và do đó cảm ứng các đáp ứng miễn dịch hiệu quả hơn so với các vaccin thương mại. Trong bản mô tả này, protein tái tổ hợp này được gọi là “rP97”.

Khi protein tái tổ hợp bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 13 có trong vaccin 2-giá ngăn ngừa nhiễm *Mycoplasma hyopneumoniae* và *Mycoplasma hyorhinis*, P97, liên quan đến việc nhiễm sớm và sự xâm nhập của *Mycoplasma hyopneumoniae* và *Mycoplasma hyorhinis*, có thể cảm ứng hiệu quả hơn các đáp ứng

miễn dịch tế bào và thể dịch chống lại *Mycoplasma hyopneumoniae* và *Mycoplasma hyorhinis* và do đó cảm ứng hiệu quả hơn các đáp ứng miễn dịch so với các vaccin thương mại. Trong bản mô tả này, protein tái tổ hợp này được gọi là “rP97m”.

Các protein tái tổ hợp rP97 và rP97m có thể được tạo ra nhờ dung hợp protein P97 dẫn xuất từ *Mycoplasma hyopneumoniae* và gen B tiểu đơn vị độc tố ruột không bền nhiệt *E.coli* (eltb). Cụ thể hơn, các protein tái tổ hợp rP97 và rP97m có thể được tạo ra nhờ dung hợp các trình tự lặp lại đầu tận cùng C R1 và R1R2 của gen P97 *Mycoplasma hyopneumoniae* và gen *E.coli* (eltb) và, sau đó, khuếch đại ltbR1 và ltbR1R2 vì các gen P97 dung hợp với LTB thông qua sự phản ứng chuỗi polymeraza (PCR).

Protein tái tổ hợp theo sáng chế có thể bao gồm tất cả polypeptit có ít nhất 70%, 80%, 90%, 95%, 98% hoặc tốt hơn là ít nhất 99% tính tương đồng với trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 13. Như được sử dụng trong tài liệu này, “tính tương đồng” đề cập đến tiêu chuẩn tương tự giữa protein hoặc các trình tự polynucleotit. Các polypeptit này có thể có sự loại bỏ, thêm vào hoặc thay thế ít nhất một axit amin so với trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 13. Điểm tương đồng giữa hai trình tự dựa vào tỷ lệ phần trăm của tính đồng nhất và/hoặc sự bảo toàn thay thế của trình tự.

Khi protein tái tổ hợp theo sáng chế được sử dụng để sản xuất vaccin, các protein tái tổ hợp có thể được thêm vào vaccin ở dạng protein tinh chế hoặc có thể được biểu hiện trong *E.coli* và được bao gồm trong vaccin ở trạng thái dịch tan ở dạng chưa tinh chế. Khi protein tái tổ hợp được bao gồm ở trạng thái dịch tan, nồng độ của dịch tan có thể nằm trong khoảng từ 0,2 đến 0,3 mg/ml.

Hơn nữa, sáng chế tạo ra các polynucleotit mã hóa các protein tái tổ hợp. Polynucleotit có thể bao gồm tất cả các trình tự có thể mã hóa trình tự axit amin được trình bày tương ứng bởi SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 13. Tốt hơn là, polynucleotit có thể bao gồm trình tự bazơ được nêu trong SEQ ID NO: 2 hoặc SEQ ID NO: 14. Polynucleotit có thể có ít nhất 70%, 80%, 90%, 95%, 98% hoặc tốt hơn là ít nhất 99% tính tương đồng với trình tự bazơ được nêu trong SEQ ID NO: 2 hoặc SEQ ID NO: 14. Ngoài ra, polynucleotit có thể bao gồm tất cả các polynucleotit có khả năng duy trì hoạt tính sinh học của SEQ ID NO: 2 hoặc SEQ ID NO: 14.

Hơn nữa, sáng chế đề cập đến chế phẩm vaccin ngăn ngừa nhiễm *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyopneumoniae*) bao gồm protein tái tổ hợp rP97.

Chế phẩm vaccin ngăn ngừa nhiễm *Mycoplasma hyopneumoniae* theo sáng chế có thể đề cập đến chế phẩm vaccin 1-giá có thể ngăn ngừa nhiễm *Mycoplasma hyopneumoniae* ở lợn và ngăn ngừa nhiễm sớm *Mycoplasma hyopneumoniae*. Protein tái tổ hợp sử dụng để sản xuất vaccin ngăn ngừa nhiễm *Mycoplasma hyopneumoniae* ở lợn và bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 1 theo sáng chế có thể được bao gồm trong chế phẩm vaccin tạo ra kháng thể đặc hiệu P97 để thúc đẩy đáp ứng miễn dịch cảm ứng bởi *Mycoplasma hyopneumoniae* bất hoạt có trong vaccin.

Hơn nữa, sáng chế đề cập đến chế phẩm vaccin ngăn ngừa nhiễm *Mycoplasma hyopneumoniae* và *Mycoplasma hyorhinis* bao gồm protein tái tổ hợp rP97m.

Chế phẩm vaccin ngăn ngừa nhiễm *Mycoplasma hyopneumoniae* và *Mycoplasma hyorhinis* theo sáng chế có thể đề cập đến chế phẩm vaccin 2-giá có thể ngăn ngừa nhiễm *Mycoplasma hyopneumoniae* và *Mycoplasma hyorhinis* ở lợn và ngăn ngừa nhiễm sớm chúng. Protein tái tổ hợp sử dụng để sản xuất vaccin ngăn ngừa nhiễm *Mycoplasma hyopneumoniae* và *Mycoplasma hyorhinis* ở lợn và bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 13 theo sáng chế có thể bao gồm chế phẩm vaccin tạo ra kháng thể đặc hiệu P97 để thúc đẩy đáp ứng miễn dịch được cảm ứng bởi *Mycoplasma hyopneumoniae* và *Mycoplasma hyorhinis* bất hoạt có trong vaccin.

Vì vậy, chế phẩm vaccin theo sáng chế có thể bao gồm thêm *Mycoplasma hyopneumoniae* hoặc *Mycoplasma hyorhinis* bất hoạt.

Như được sử dụng trong tài liệu này, thuật ngữ “bất hoạt” có nghĩa là “*mycoplasma* đã bị chết”. *Mycoplasma* bất hoạt đó có thể được mua hoặc được tạo ra từ các tế bào sống theo cách đã được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng.

Mycoplasma bất hoạt, có trong chế phẩm vaccin theo sáng chế, có thể bao gồm cả hai chủng tiêu chuẩn có hiệu quả cảm ứng miễn dịch có thể được tăng cường bởi protein tái tổ hợp theo sáng chế hoặc tác nhân gây bệnh cao và sự biến màu chuẩn độ cao tạo ra kháng thể, trong đó tác nhân gây bệnh cao và sự biến màu chuẩn độ cao được phân lập từ lợn nhiễm *mycoplasma*. Ngoài ra, tốt hơn, *mycoplasma* bất hoạt có thể là một *mycoplasma* mà có thể cảm ứng một cách hiệu quả kháng thể với

mycoplasma toàn bộ và kháng nguyên quan trọng P97 khi tiêm chủng cùng với protein tái tổ hợp theo sáng chế.

Mycoplasma hyopneumoniae hoặc *Mycoplasma hyorhinis* trong chế phẩm vaccin có thể có trong vaccin ở nồng độ nằm trong khoảng từ $1,0 \times 10^6$ đến $1,0 \times 10^{10}$ CCU (đơn vị thay đổi màu)/ml. Tốt hơn, *Mycoplasma hyopneumoniae* hoặc *Mycoplasma hyorhinis* trong chế phẩm vaccin có thể có trong vaccin với nồng độ nằm trong khoảng từ $1,0 \times 10^7$ đến $1,0 \times 10^{10}$ CCU (đơn vị thay đổi màu)/ml. Tốt hơn nữa, *Mycoplasma hyopneumoniae* hoặc *Mycoplasma hyorhinis* trong chế phẩm vaccin có thể có trong vaccin với nồng độ nằm trong khoảng $1,0 \times 10^8$ đến $1,0 \times 10^{10}$ CCU (đơn vị thay đổi màu)/ml.

Chế phẩm vaccin theo sáng chế có thể bao gồm hỗn hợp tá dược có thể tăng cường miễn dịch của vaccin để cảm ứng miễn dịch bảo vệ ngay cả khi dùng tối thiểu, và có thể bao gồm một hoặc nhiều chất pha loãng, tá dược hoặc chất mang được dụng hoặc thú y. Thuật ngữ chế phẩm “được dụng hoặc thú y” như được sử dụng trong tài liệu này đề cập đến các chế phẩm có thể chấp nhận về sinh lý học và không thường gây ra dị ứng hoặc phản ứng tương tự như rối loạn dạ dày, hoặc chóng mặt khi dùng cho động vật. Các ví dụ về chất mang, tá dược và chất pha loãng có thể bao gồm đường sữa, đường nho, đường mía, sorbitol, manitol, xylitol, erytritol, maltitol, tinh bột, keo cao su, anginit, gelatin, canxi phosphat, canxi silicat, chất xơ, hợp chất hấp thụ nước, polyvinylpyrrolidon, nước, methylhydroxybenzoat, propylhydroxybenzoat, hoạt thạch, magie stearat và dầu khoáng. Hơn nữa, các chất đệm, các chất chống đông, các chất bôi trơn, các tác nhân làm ướt, các hương vị, các chất nhũ hóa và các chất bảo quản có thể cũng được thêm vào chế phẩm vaccin. Các chất mang phù hợp để sử dụng có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, nước muối, nước muối đệm phosphat, dung môi thiết yếu tối thiểu (MEM), hoặc dung môi ngâm nước bao gồm MEM của dung dịch đệm HEPES. Hỗn hợp tá dược để sử dụng trong chế phẩm vaccin theo sáng chế bao gồm dầu tăng cường đáp ứng miễn dịch và là có thể chuyển hóa được.

Hơn nữa, chế phẩm vaccin theo sáng chế có thể được bào chế sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng để tạo ra việc giải phóng nhanh chóng, bền vững hoặc chậm thành phần hoạt tính sau khi dùng chế phẩm cho động vật có vú. Các chế phẩm có thể dưới dạng bột, hạt nhỏ, viên, nhũ tương, sirô, các sol khí,

nang gelatin mềm hoặc cứng, các dung dịch có thể tiêm vô trùng, bột vô trùng và các chế phẩm tương tự. Chế phẩm vaccin theo sáng chế có thể được dùng thông qua bắp thịt, dưới da, qua da, tĩnh mạch, mũi, bụng hoặc đường miệng, tốt hơn là trong cơ hoặc dưới da. Theo sáng chế, trong một phương án thực hiện, vaccin có thể bao gồm *Mycoplasma hyopneumoniae* và *Mycoplasma hyorhinis* bất hoạt, dầu có thể chuyển hóa, chất đồng trùng hợp khối polyoxyetylen-polyoxypropylene và chất trùng hợp axit acrylic dưới dạng dung môi dầu trong nước. Lượng vaccin có thể được chọn thích hợp phụ thuộc vào các nhân tố khác nhau như lộ trình dùng thuốc, tuổi, giới tính, cân nặng, và sự nghiêm trọng của động vật.

Hơn nữa, chế phẩm vaccin theo sáng chế có thể được tạo ra theo các phương pháp tiêu chuẩn trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng, loại trừ quy trình đặc trưng theo sáng chế, như việc sản xuất protein tái tổ hợp rP97 hoặc rP97m. Ví dụ, sinh vật có thể được phát triển trong môi trường nuôi cấy như môi trường đầy đủ. Sự tăng sinh của sinh vật có thể được giám sát bởi các phương pháp kỹ thuật tiêu chuẩn như đo đơn vị thay đổi màu sắc (CCU). Các sinh vật có thể được thu thập khi đạt được chuẩn độ cao đủ. Nguyên liệu có thể được cô đặc hoặc làm khô lạnh thêm theo các phương pháp thông thường trước khi được đưa vào vaccin để bảo chế.

Hơn nữa, sáng chế tạo ra tá dược vaccin ngăn ngừa nhiễm *Mycoplasma hyopneumoniae* bao gồm protein tái tổ hợp rP97, hoặc tá dược vaccin ngăn ngừa nhiễm *Mycoplasma hyopneumoniae* và *Mycoplasma hyorhinis* bao gồm protein tái tổ hợp rP97m.

Tá dược vaccin có thể đề cập đến chất thúc đẩy sự miễn dịch và tăng cường tính hiệu quả của vaccin bất hoạt. Tá dược vaccin có thể được tiêm đồng thời hoặc sau với vaccin bao gồm *Mycoplasma hyopneumoniae* và/hoặc *Mycoplasma hyorhinis* bất hoạt để khuếch đại thêm đáp ứng miễn dịch trong đối tượng do *Mycoplasma hyopneumoniae* và/hoặc *Mycoplasma hyorhini* bất hoạt.

Hơn nữa, sáng chế đề cập đến chế phẩm vaccin ngăn ngừa bệnh do nhiễm *Mycoplasma hyopneumoniae* gây ra, chế phẩm bao gồm protein tái tổ hợp rP97, hoặc tạo ra chế phẩm vaccin ngăn ngừa bệnh do nhiễm *Mycoplasma hyopneumoniae* và *Mycoplasma hyorhinis* gây ra, chế phẩm bao gồm protein tái tổ hợp rP97m.

Bệnh do nhiễm *Mycoplasma hyopneumoniae* và/hoặc *Mycoplasma hyorhinis* gây ra có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các bệnh lâm sàng khác nhau do nhiễm mầm bệnh vào đối tượng. Tốt hơn, bệnh có thể bao gồm hội chứng hô hấp phức hợp ở lợn (PRCS), viêm phổi gây dịch ở lợn hoặc chứng viêm khớp dẫn xuất *Mycoplasma hyorhinis*.

Hơn nữa, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất tá dược vaccin ngăn ngừa nhiễm *Mycoplasma hyopneumoniae*. Phương pháp bao gồm: 1) tạo ra vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa protein tái tổ hợp được nêu trong SEQ ID NO: 1; 2) biến nạp vật chủ với vectơ này; và 3) biểu hiện protein tái tổ hợp trong vật chủ đã được biến nạp.

Hơn nữa, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất tá dược vaccin ngăn ngừa nhiễm *Mycoplasma hyopneumoniae* và *Mycoplasma hyorhinis* ở lợn. Phương pháp bao gồm 1) tạo ra vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa protein tái tổ hợp được nêu trong SEQ ID NO: 13; 2) biến nạp vật chủ với vectơ này; và 3) biểu hiện protein tái tổ hợp trong vật chủ đã được biến nạp.

Hơn nữa, sáng chế đề cập đến phương pháp ngăn ngừa nhiễm *Mycoplasma hyopneumoniae* ở lợn, phương pháp bao gồm việc tiêm chủng cho lợn chế phẩm vaccin ngăn ngừa nhiễm *Mycoplasma hyopneumoniae* bao gồm protein tái tổ hợp rP97.

Hơn nữa, sáng chế tạo ra phương pháp ngăn ngừa nhiễm *Mycoplasma hyopneumoniae* và *Mycoplasma hyorhinis* bao gồm việc tiêm chủng cho lợn chế phẩm vaccin ngăn ngừa nhiễm *Mycoplasma hyopneumoniae* ở lợn và *Mycoplasma hyorhinis* bao gồm protein tái tổ hợp rP97m.

Lợn có thể bao gồm các loại lợn, không giới hạn có thể, bị nhiễm *mycoplasma* tiềm tàng. Các phương pháp ngăn ngừa nhiễm đó có thể được sử dụng song song với các phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa khác đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng. Thuật ngữ “tiêm chủng” sử dụng trong tài liệu này có nghĩa là cung cấp cho vật chủ chế phẩm theo sáng chế bằng bất kỳ phương pháp thích hợp nào.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế được minh họa chi tiết hơn với việc tham chiếu đến Ví dụ. Tuy nhiên, nên hiểu rằng sáng chế không bị giới hạn ở Ví dụ này.

Ví dụ 1. Vacxin 1-giá bao gồm protein rP97

1.1. Điều chế chủng bất hoạt *Mycoplasma hyopneumoniae*

Chủng *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyopneumoniae*, Mhp) được phân lập từ lợn của các trang trại lợn gia đình. Sau đó, phân tích mẫu protein xác nhận rằng Mhp HID3117 và HID3138, được phân lập từ chủng là khác với chủng tiêu chuẩn, *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhp) J (ATCC 25934). Các chủng *mycoplasma hyopneumoniae*, HID3117 và HID3138, được nuôi cấy trong 3 tuần ở CO₂ 5% và 37°C sử dụng môi trường Friis. Chất nuôi cấy được bất hoạt bằng cách tăng độ pH tới khoảng 7,8. Sự bất hoạt vi khuẩn được thực hiện sử dụng chất phản ứng bất hoạt như ethylenimin hai thành phần (BEI) (Patent Mỹ số 5,565,205). BEI được sản xuất bằng cách thêm 2- bromoethylaminhydrobromua (BEA) (Sigma Aldrich, St.Louis, Mo., USA) vào chất lỏng nuôi cấy. Sau đó, BEI được trung hòa bằng cách thêm natri thiosulfat (Sigma Aldrich, St. Louis, Mo., USA) vào làm chất phản ứng trung hòa. Một phần chất lỏng nuôi cấy đã bất hoạt được thêm môi trường mới và được nuôi cấy ở 37°C, và được nuôi cấy trong ít nhất một tuần. Sau đó, trạng thái bất hoạt của chất lỏng nuôi cấy bất hoạt được kiểm tra. Sau đó, chất lỏng nuôi cấy bất hoạt được cô đặc bằng cách lọc hoặc quay ly tâm.

1.2. Sản xuất protein rP97 tái tổ hợp

Protein rP97 tái tổ hợp được tạo ra bằng cách dung hợp protein p97 của *Mycoplasma hyopneumoniae* và gen B tiểu đơn vị độc tố ruột không bền nhiệt *E.coli* (eltb). Cụ thể hơn, đối với các chủng Mhp HID3138 và Mhp HID3117 như các chủng phân lập nội địa, hệ gen ADN đã được chiết sử dụng kit nhỏ chiết ADN gen (RBC Biosciences). Hệ gen ADN của *Escherichia coli* được chiết bằng phương pháp đun sôi. Gen B tiểu đơn vị độc tố ruột không bền nhiệt *E.coli* (eltb) được dung hợp với các trình tự lặp lại đầu tận cùng C (R1 và R1R2) của gen P97. LtbR1 và ltbR1R2 như các gen P97 được dung hợp với LTB, được khuếch đại bằng phản ứng chuỗi polymeraza (PCR). Các mẫu sử dụng trong PCR được thể hiện trên Bảng 1 sau đây.

Bảng 1

Mục tiêu	Cặp mồi	Điều kiện phản ứng	Kích thước sản phẩm
Gen B tiêu đơn vị độc tố ruột không bền nhiệt <i>E.coli</i> <i>Escherichia coli</i> (eltb)	LTBF: 5'-CAC CAT GGC TCC CCA GAC TAT TAC A-3' LTBR: 5'-CTG GAT CCC CAT ACT GAT TGC-3'	95°C 20 giây, 57,5°C 40 giây, 72°C 15 giây, 30 chu kỳ	300 bp
<i>Gen P97 (r1)</i>	R1F: 5'-CAC CAT GGG GAT CCC TAC AAA AGA AG-3' R1R: 5'-GCC AAG CTT AGT AGC AAC TGG T-3'	95°C 20 giây, 56,5°C 40 giây, 72°C 15 giây, 30 chu kỳ	280 bp
<i>Gen P97 (r1r2)</i>	R1F: 5'-CAC CAT GGG GAT CCC TAC AAA AGA AG-3' 2RsR: 5'-GGT AGT TGG GCT TTG TTG-3'	95°C 20 giây, 49,5°C 40 giây, 72°C 30 giây, 30 chu kỳ	697 bp
<i>Ltbr1</i>	LTBF: 5'-CAC CAT GGC TCC CCA GAC TAT TAC A-3' R1R: 5'-GCC AAG CTT AGT AGC AAC TGG T-3'	95°C 20 giây, 56,5°C 40 giây, 72°C 30 giây, 30 chu kỳ	582 bp
<i>Ltbr1r2</i>	LTBF: 5'-CAC CAT GGC TCC CCA GAC TAT TAC A-3' 2RsR: 5'-GGT AGT TGG GCT TTG TTG-3'	95°C 20 giây, 49,5°C 40 giây, 72°C 40 giây, 30 chu kỳ	1000 bp

Mồi được thiết kế theo nghiên cứu này. Các trình tự mồi khác thu được từ các nghiên cứu trước (Conceicao *et al.*, 2006).

Các sản phẩm PCR được khuếch đại sử dụng các mồi LTBF và R1F bao gồm bốn trình tự bazơ (CACC) được đưa vào vector pENTR/SD (Gateway system, Invitrogen). Sau đó, lTb và R1 được dung hợp với nhau sử dụng các mồi LTBR và R1F bao gồm enzym giới hạn BamHI. Mỗi gen (R1, R1R2, lTbR1 và lTbR1R2) được đưa vào vector pENTR/SD và pDEST-42 (Gateway system, Invitrogen) theo chỉ dẫn từ mỗi công ty sản xuất gen đó. Để biểu hiện mỗi protein tái tổ hợp, mỗi gen được xen vào vector được biến nạp vào tế bào khả biến *E.coli* BL21 bằng cách điện di. Sau đó, mỗi tế bào khả biến *E.coli* BL21 được nuôi cấy trong môi trường 1 L LB chứa 100

$\mu\text{g/mL}$ ampicillin. Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) được thêm vào chất lỏng nuôi cấy để đạt được nồng độ cuối cùng là 1 mM. Do đó, biểu hiện protein được cảm ứng trong 3 giờ. Chất lỏng nuôi cấy được siêu âm, và sau đó ly tâm để thu được dịch thủy phân chứa protein tái tổ hợp. Các protein biểu hiện được tinh chế dùng sắc ký ái lực HisPur Ni-NTA (Thermo Scientific) theo hướng dẫn từ nhà sản xuất thiết bị. Trình tự axit amin của protein tái tổ hợp rP97 theo sáng chế như được sản xuất cuối cùng được mô tả trong SEQ ID NO: 1. Trình tự bazơ mã hóa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 1 được mô tả trong SEQ ID NO: 2. Hơn nữa, các trình tự motif như đã sử dụng được thể hiện trong SEQ ID NO: 3 đến SEQ ID NO: 12.

1.3. Sản xuất vacxin

Mycoplasma hyopneumoniae bất hoạt và cô đặc được trộn vô trùng với tá dược. Sau đó, hỗn hợp được pha loãng trong thùng chứa đã tiệt trùng như được thể hiện trên Bảng 2. Hỗn hợp đã pha loãng được thêm vào dịch thủy phân chứa rP97, mà, đến lượt nó, được trộn lẫn ít nhất 30 phút ở 4°C để sản xuất vacxin.

Bảng 2

Vacxin	Vacxin 1-valent
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	$2,5 \times 10^8$ CCU/liều (Mhp HID3138, HID3117)
rP97	Tổng dịch thủy phân 300 $\mu\text{g/mL}$
Tá dược	Gel Montanide: 20% Carbopol: 1 mg/mL
PBS	Tạo thể tích đến 1 mL
Thời gian trộn	Ít nhất 30 phút (4°C)

CCU = Đơn vị thay đổi màu (CCU)

1.4. Xác minh các tác dụng của vacxin thông qua chuẩn độ kháng thể

1.4.1. Chuẩn bị nhóm thử nghiệm

Lợn 3 tuần tuổi không bị nhiễm *Mycoplasma hyopneumoniae* được dùng để đo tính sinh miễn dịch của vacxin ứng viên. Việc có hoặc không bị nhiễm *Mycoplasma hyopneumoniae* đối với tất cả mẫu lợn được kiểm tra tại các khoảng thời gian đều nhau

sử dụng dữ liệu lâm sàng, việc có hay không bị viêm phổi, các thử nghiệm huyết thanh khác và dụng cụ ELISA (IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, ME, USA). Tất cả lợn được phân vào các nhóm, mỗi nhóm có 5 con. 0,3 mg/ml protein rP97, Montanide Gel, Carbopol, sản xuất trong Ví dụ 1.2 được trộn với Mhp HID3138 và Mhp HID3117 được bất hoạt bằng phương pháp theo Ví dụ 1.1 ở tỷ lệ trộn giống như được chỉ ra tại Bảng 2, theo cách đó sản xuất ra các vaccin này. Các vaccin hiện tại được tiêm chủng vào mỗi con lợn của nhóm thử nghiệm với 2 ml. Hơn nữa, 1 ml vaccin thương mại, Mycoflex® (Boehringer Ingelheim Animal Health, St. Joseph, MO, USA) được tiêm chủng vào mỗi con lợn của nhóm thử nghiệm so sánh. Hơn nữa, 2 ml dịch thủy phân chứa riêng protein tái tổ hợp rP97 như được sản xuất trong Ví dụ 1.2 được tiêm chủng cho nhóm thử nghiệm so sánh dịch thủy phân đã xử lý (dịch thủy phân r). 2 ml của riêng PBS được tiêm chủng vào nhóm đối chứng. Do đó, các thử nghiệm được thực hiện trên tổng 5 nhóm. Tất cả các nhóm được tiêm thêm 21 ngày sau lần tiêm chủng đầu tiên. Các mẫu huyết thanh được tách vào 0, 21, 42 và 63 ngày sau lần tiêm chủng vaccin đầu tiên và được lưu trữ ở -20°C cho đến khi sử dụng trong thử nghiệm. Các chi tiết về mỗi nhóm thử nghiệm được thể hiện trên Bảng 3 dưới đây.

Bảng 3

Nhóm thử nghiệm	Chất được dùng
G1	Dịch thủy phân chứa protein tái tổ hợp Mhp HID3138 và rP97
G2	Dịch thủy phân chứa protein tái tổ hợp Mhp HID3117 và rP97
G3	Dịch thủy phân chứa protein tái tổ hợp rP97
G4	Riêng nước muối
G5	Vaccin thương mại Mycoflex®

1.4.2. Phân tích chuẩn độ kháng thể sử dụng ELISA

Chuẩn độ kháng thể đặc hiệu *Mycoplasma hyopneumoniae* được đo sử dụng IDEXX M. hyo. ELISA (IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, ME, USA). Chuẩn độ kháng thể đặc hiệu đối với rP97 được kiểm tra sử dụng protein P97 đã biểu hiện và đã tinh chế làm kháng nguyên. RP97 (0,5 µg/giếng) được phủ lên đĩa vi chuẩn độ Maxi-Sorp 96-giếng (NUNC, Thermo Scientific, Penfield, NY, USA) và được lưu trữ ở 4°C trong 16 giờ. Đĩa được rửa bằng PBS (PBST) chứa Tween 20 0,05% , và sau đó được

chặn bằng PBS (PBSM) chứa 5% sữa không béo. Sau khi rửa đĩa ba lần bằng PBST, 100 μ l huyết thanh (1 : 100 PBSM) được thêm vào đĩa. Sau khi rửa đĩa ba lần bằng PBST, kháng thể IgG dê kháng lợn cộng hợp horseradish peroxidase (HRP) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) được thêm vào đĩa và được nuôi cấy. Sau khi rửa đĩa bằng PBST, phản ứng xảy ra với chất nền o-phenyldiamin (OPD) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Đo mức kháng thể huyết thanh đặc trưng *Mycoplasma hyopneumoniae*

Các kết quả của các mức kháng thể huyết thanh đặc trưng *Mycoplasma hyopneumoniae* như được cảm ứng bởi các vacxin ứng viên khác nhau được phân tích thống kê sử dụng phần mềm GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). ANOVA hai chiều kết hợp với việc kiểm tra sau Bonferroni được sử dụng để đánh giá các sự khác nhau trong các chuẩn độ kháng thể huyết thanh giữa các nhóm. Các sự khác nhau đáng kể được biểu hiện bởi $P < 0,05$. Các kết quả đo mức kháng thể được minh họa trên Fig.1.

Như được minh họa trên Fig.1, nhóm đối chứng đã điều trị PBS thể hiện đáp ứng âm suốt quá trình tiêm chủng. Mặt khác, các nhóm G1 và G2 thể hiện các đáp ứng dương từ 42 ngày sau khi tiêm chủng cho đến cuối thử nghiệm. Hơn nữa, nhóm tiêm vacxin hiện tại thể hiện mức kháng thể cao hơn nhóm đã điều trị MFlex G5, đây là nhóm tiêm chủng vacxin thương mại. Nhóm G2 thể hiện mức kháng thể tương tự với mức kháng thể của nhóm vacxin thương mại G5 ở 63 ngày sau khi tiêm chủng. Các nhóm G1 và G2 cảm ứng các mức kháng thể cao nhất tại 42 và 63 ngày sau khi tiêm chủng, đây là các giá trị thống kê quan trọng khi so sánh với nhóm điều trị PBS.

Đánh giá đáp ứng miễn dịch đặc trưng rP97

Để đánh giá đáp ứng miễn dịch đặc trưng rP97, ELISA gián tiếp được thực hiện sử dụng huyết thanh lợn đã tiêm vacxin. Các kết quả được minh họa trên Fig.2.

Như được minh họa trên Fig.2, các mức kháng thể đặc hiệu rP97 tăng liên tục trong các nhóm thử nghiệm G1, G2 và G3, thể hiện giá trị cao nhất tại 42 ngày sau khi tiêm chủng. Cụ thể, tại 42 ngày và 63 ngày sau khi tiêm chủng, các nhóm G1, G2 và G3 thể hiện các mức cao hơn đáng kể của chuẩn độ kháng thể so với nhóm đối chứng ($P < 0,001$), và không có sự khác biệt đáng kể giữa ba nhóm tiêm vacxin G1, G2 và G3. Tại ngày 42 sau khi tiêm chủng, các nhóm G1, G2 và G3 thể hiện tương ứng các

chuẩn độ kháng thể cao hơn 19, 20 và 16 lần so với chuẩn độ kháng thể của nhóm đối chứng. Mặt khác, nhóm đối chứng G4 và nhóm vacxin thương mại G5 thể hiện không có đáp ứng miễn dịch đặc trưng rP97. Từ các kết quả này, có thể xác nhận rằng các mức chuẩn độ kháng thể đối với protein P97 bám vào bằng không trong các vacxin thương mại có sẵn, trong khi đó vacxin sản xuất theo sáng chế thể hiện chuẩn độ kháng thể cao đối với rP97. Sự xác nhận này nhất quán với các báo cáo trước đây rằng các vacxin thương mại không có khả năng tạo ra các chuẩn độ kháng thể đặc hiệu P97. Do đó, vacxin sản xuất theo sáng chế có thể hiệu quả hơn qua việc cho phép chuẩn độ kháng thể cao đối với rP97 so với các vacxin thương mại thông thường.

1.5. Đánh giá tính hiệu quả của vacxin bất hoạt ở lợn

Để đánh giá hiệu quả của vacxin đã sản xuất, chúng tôi phân lập vi khuẩn từ lợn của trang trại nơi *mycoplasma* hiện diện. Các chuẩn độ kháng thể PCR đặc trưng *mycoplasma* và ELISA được kiểm tra để xác nhận rằng *mycoplasma* đang lan truyền trong các trang trại. Nhóm G1 bao gồm Mhp HID3138 và rP97 trong số các vacxin sản xuất trong Ví dụ 1.4.1 đã tiêm điều trị vacxin tại 1 và 4 tuần. Các triệu chứng lâm sàng (có hay không có chứng ho, sự suy nhược, bài tiết dịch mũi) của nhóm G1 được quan sát trong 3 tuần sau khi tiêm chủng. Sau 3 tuần, 5 đối tượng trong mỗi nhóm được lựa chọn ngẫu nhiên và chỉ số bệnh tích đại thể của các phổi của chúng được tính toán. Phương pháp đánh giá sử dụng chỉ số bệnh tích đại thể của phổi được phân tích bệnh tích đại thể của phổi liên quan đến bệnh đường hô hấp. Điều này hoàn thành bằng cách thiết lập toàn bộ thể tích phổi là 100 và chia 100 điểm dựa vào thể tích của mỗi lá phổi và sau đó phân tích có bệnh tích đại thể hay không có bệnh tích đại thể của mỗi phổi. Các kết quả được thể hiện trên Bảng 4.

Bảng 4

Nhóm kiểm tra	Số lượng các đối tượng được kiểm tra	Các triệu chứng lâm sàng			Chỉ số bệnh tích phổi*
		Chứng ho	Suy nhược	Tiết dịch mũi	
Nhóm tiêm chủng vacxin	10	2/10	0/10	1/10	13,8±4,9

Nhóm đối chứng	10	9/10	7/10	9/10	72,4±8,3
----------------	----	------	------	------	----------

*: 5 đối tượng trong mỗi nhóm được lựa chọn ngẫu nhiên và chỉ số bệnh tích đại thể của các phổi của chúng được đo

Như thể hiện trên Bảng 4, chứng ho, sự suy nhược, và tiết dịch mũi được quan sát trong nhóm đối chứng không tiêm vaccin, nhưng các triệu chứng lâm sàng đó không được quan sát trong nhóm tiêm vaccin. Có sự khác nhau đáng kể giữa các nhóm đối chứng và nhóm đã tiêm vaccin về chỉ số bệnh tích đại thể của phổi. Do đó, vaccin sản xuất theo sáng chế đã được thể hiện để giảm các triệu chứng đường hô hấp và các bệnh tích phổi khi tiêm chủng cho lợn trên các trang trại có *Mycoplasma*.

Các kết quả trên đề xuất rằng protein tái tổ hợp rP97 theo sáng chế có thể hữu ích cho vaccin chống lại *Mycoplasma hyopneumoniae*. Hơn nữa, vaccin bao gồm protein tái tổ hợp có thể bao gồm nhân tố gắn đáng kể P97, đây là một nhân tố quan trọng đối với việc nhiễm sớm *Mycoplasma hyopneumoniae*, khác với vaccin thông thường không có nhân tố gắn đáng kể P97. Do đó, điều này có thể cho phép sự hình thành rõ ràng kháng thể cho phép kiểm tra liệu đã tiêm vaccin hay chưa. Hơn nữa, điều này có thể ngăn việc truyền vi khuẩn đã nhiễm tự nhiên và khuẩn lạc của chúng trên lông rung hô hấp, điều này được chỉ ra như hạn chế kỹ thuật của các vaccin thương mại thông thường. Đó là, protein tái tổ hợp rP97 theo sáng chế có thể ngăn hiệu quả *mycoplasma* thông qua việc ngăn sự xâm nhập sớm của *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Ví dụ 2. Vaccin 2-giá bao gồm rP97m

2.1. Điều chế chủng *mycoplasma*

Các chủng *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhp) và *Mycoplasma hyorhinis* (Mhr) được phân lập từ các phổi thể hiện các bệnh tích phổi *Mycoplasma* ở lợn và được nuôi cấy trong 3 ngày ở CO₂ 5% và 37°C sử dụng môi trường Friis. Chúng tôi đã xác nhận qua việc phân tích mẫu protein mà các chủng Mhp HID3134, HID3140, HID3138, và Mhr HID3224 như đã phân lập là các chủng khác nhau so với các chủng tiêu chuẩn của *Mycoplasma hyopneumoniae* và *Mycoplasma hyorhinis*. Các chủng này được kỳ vọng là các chủng tác nhân gây bệnh cao và chuẩn độ cao cảm ứng các kháng thể. Chất nuôi cấy được điều chỉnh đến pH 7,8 và sau đó được bất hoạt sử dụng chất phản ứng bất hoạt như etylenimin hai thành phần (BEI) (Patent Mỹ số 5,565,205). BEI được

tạo ra bằng cách thêm L-bromoethylaminhydrobromit (BEA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) vào chất lỏng nuôi cấy. Sau đó, thực hiện việc trung hòa bằng cách thêm natri thiosulfat (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA) làm chất phản ứng trung hòa vào nó. Phần chất lỏng nuôi cấy bất hoạt được thêm vào dung môi mới và được nuôi cấy ở 37°C, và được nuôi cấy trong ít nhất một tuần. Sau đó, trạng thái bất hoạt của chất lỏng nuôi cấy đã bất hoạt được kiểm tra. Sau đó, chất lỏng nuôi cấy đã bất hoạt được cô đặc bằng cách quay ly tâm.

2.2. Điều chế protein rP97m

Protein tái tổ hợp rP97m được sản xuất bằng cách dung hợp protein P97 của *Mycoplasma hyopneumoniae* và gen B tiểu đơn vị độc tố ruột không bền nhiệt *E.coli* (eltb). RP97 trong Ví dụ 1 thu được từ Mhp không xử lý và sau đó được dung hợp với LTb. Tuy nhiên, rP97m được tạo ra bằng cách tạo riêng R1 và R2 sử dụng trình tự bazơ R1 và R2, như các vị trí lỗi của P97, và sự dung hợp R1 và R2 với LTb. Cụ thể hơn, sự tái tổ hợp của protein rP97m được thực hiện sử dụng hệ thống biểu hiện pET-30a (+) (Novagen, USA). Các plasmit biểu hiện được xen vào các tế bào cạnh tranh *E. coli* BL21 codon-plus RIL (Novagen) sử dụng sốc nhiệt, mà, đến lượt nó, được nuôi cấy trong 1 L môi trường Luria-Bertani (LB) chứa 50 µg/mL kanamycin. Sau đó biểu hiện protein được cảm ứng trong 3 giờ với 1 mM isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosit (IPTG). Chất lỏng nuôi cấy trải qua siêu âm, và sau đó quay ly tâm để thu được dịch thủy phân chứa protein tái tổ hợp. Cột Ni-NTA được sử dụng để làm sạch và cô đặc protein tái tổ hợp từ dịch thủy phân. Trình tự axit amin của protein tái tổ hợp rP97m theo sáng chế như được tạo ra mô tả trong SEQ ID NO: 13. Trình tự bazơ mã hóa axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO.: 13 được mô tả trong SEQ ID NO: 14.

Hơn nữa, các cấu trúc trình tự và tính tương đồng của rP97 và rP97m được so sánh với nhau để xác nhận sự tương tự của protein tái tổ hợp rP97 như được sản xuất theo Ví dụ 1.2 và protein tái tổ hợp rP97m như sản xuất theo Ví dụ 2.2. Các kết quả được minh họa trên Fig.3.

Như được minh họa trên Fig.3A, rP97 và rP97m có các cấu trúc khác nhau. Đặc biệt, rP97m do sự tổng hợp riêng R1 và R2 để tạo thành chỉ các vị trí cơ bản. Như

được minh họa trên Fig.3B, cả hai trình tự thể hiện 64,13% tính tương đồng và thể hiện tính tương đồng rất thấp.

2.3. Sản xuất vacxin

Mycoplasma hyopneumoniae và *Mycoplasma hyorhinis* bất hoạt và đã cô đặc được trộn vô trùng với tá dược. Sau đó, hỗn hợp được pha loãng trong bình chứa đã tiệt trùng như được thể hiện trên Bảng 5, và sau đó được trộn trong ít nhất 24 giờ.

Bảng 5

Vacxin	Vacxin 2-giá
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	$1,0 \times 10^9$ CCU/liều (Mhp HID3134, HID3140, hoặc HID3138)
<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	$1,0 \times 10^9$ CCU/liều (Mhr HID3224)
rP97m	Protein tinh chế 100 µg/liều
Tá dược	IMS1313: 50%
PBS	Tạo thể tích đến 2 ml
Thời gian trộn	Ít nhất 24 giờ (4°C)

CCU = Đơn vị thay đổi màu (CCU)

2.4. Xác minh hiệu quả vacxin

2.4.1. Chuẩn bị nhóm thử nghiệm

Lợn 3 tuần tuổi không bị nhiễm *Mycoplasma hyopneumoniae* và *Mycoplasma hyorhinis* được sử dụng để đo tính sinh miễn dịch của vacxin ứng viên. Có hay không việc nhiễm *Mycoplasma hyopneumoniae* và *Mycoplasma hyorhinis* với tất cả các mẫu lợn được kiểm tra tại các khoảng thời gian đều nhau sử dụng các triệu chứng lâm sàng, có hay không có viêm phổi, các thử nghiệm huyết thanh khác và dụng cụ ELISA (IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, ME, USA). Tất cả lợn được phân vào các nhóm, mỗi nhóm có 4 con. Mhp HID3134, Mhp HID3140, Mhp HID3138 và Mhr HID3224 được bất hoạt bằng phương pháp theo Ví dụ 2.1 và rP97 được trộn với nhau ở tỷ lệ trộn như trên Bảng 5 để sản xuất vacxin này. Sau đó, các vacxin này được dùng

cho mỗi con lợn của nhóm thử nghiệm với 2 ml mỗi lần. Các mẫu thử được lựa chọn 4 ngày trước khi tiêm chủng, và trong 1, 2, 4 và 5 tuần sau khi tiêm chủng. Các chi tiết về mỗi nhóm thử nghiệm được thể hiện trên Bảng 6 dưới đây. Nhóm thử nghiệm so sánh được thiết lập là nhóm được điều trị bằng Respisure® (Zoetis, USA), vaccin thương mại. Sau việc tiêm chủng vaccin, máu được thu thập và huyết thanh được tách riêng và lưu trữ ở -20°C.

Bảng 6

Nhóm thử nghiệm	Chất được dùng
Nhóm 1(G1)	Riêng PBS
Nhóm 2 (G2)	Vaccin thương mại Respisure®
Nhóm 3 (G3)	Mhp HID3134 + Mhr HID3224 + rP97m
Nhóm 4 (G4)	Mhp HID3140 + Mhr HID3224+ rP97m
Nhóm 5 (G5)	Mhp HID3138 + Mhr HID3224+ rP97m

2.4.2. Phân tích chuẩn độ kháng thể sử dụng ELISA

Chuẩn độ kháng thể đặc hiệu *Mycoplasma hyopneumoniae* được đo sử dụng dụng cụ IDEXX M. hyo +. ELISA (IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, ME, USA). Chuẩn độ kháng thể đặc hiệu P97m được đo bằng cách phủ protein tinh chế rP97m làm kháng nguyên. Chuẩn độ kháng thể đặc hiệu *Mycoplasma hyorhinis* được đo bằng cách phủ toàn bộ vaccin vi khuẩn *Mycoplasma hyorhins* làm kháng nguyên. Mỗi kháng nguyên (rP97m: 0,2 µg/giếng, vaccin vi khuẩn nguyên chất Mhr: 25 ng/giếng) được phủ lên đĩa vi chuẩn độ Maxi-Sorp 96-giếng (NUNC, Thermo Scientific, Penfield, NY, USA), mà, đến lượt nó, được lưu trữ trong 16 giờ ở 4°C và sau đó trong 2 giờ ở 37°C. Đĩa được rửa ba lần bằng PBS-T bổ sung thêm Tween 20 0,05% và được chặn lại bằng BSA 1% trong PBS ở 37°C trong 2 giờ. Sau khi rửa đĩa ba lần bằng PBS-T, 100 µl huyết thanh (pha loãng 1 : 100, BSA 0,1% trong PBS) được thêm vào đĩa. Phản ứng xảy ra ở 37°C trong 2 giờ. Sau 3 lần rửa đĩa bằng PBS-T, kháng thể IgG dê kháng lợn cộng hợp horseradish peroxidase (Abcam, UK) được thêm vào đĩa. Phản ứng xảy ra trong 1 giờ ở 37°C. Sau đó, đĩa được rửa bốn lần bằng PBS-T. BioFX® TMB One Component HRP Microwell Substrate (SurModics®, USA) được

thêm vào đó và phản ứng tối xảy ra trong 5 phút ở nhiệt độ phòng và chất dừng phản ứng được thêm vào đó để dừng phản ứng. Sau đó, khả năng hấp thụ được đo ở 450 nm và các kết quả được xác nhận.

Đo mức kháng thể huyết thanh đặc hiệu *Mycoplasma hyopneumoniae*

Trước khi tiêm chủng, tất cả mẫu lợn được kiểm tra huyết thanh và sau đó thể hiện đáp ứng âm và sau đó thử nghiệm được thực hiện. Các kết quả về các mức kháng thể huyết thanh đặc trưng *Mycoplasma hyopneumoniae* như được cảm ứng bởi các ứng viên vaccin Mycoplasma 2-giá ở lợn được phân tích thống kê sử dụng phần mềm GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). ANOVA hai chiều kết hợp với việc kiểm tra sau Bonferroni được sử dụng để đánh giá các sự khác nhau trong các chuẩn độ kháng thể huyết thanh giữa các nhóm. Các sự khác nhau đáng kể được biểu hiện bởi $P < 0,05$. Các kết quả đo mức kháng thể được minh họa trên Fig.4.

Như được minh họa trên Fig.4, nhóm G1 được điều trị bằng G1 PBS thể hiện đáp ứng âm trong suốt quá trình tiêm chủng. Mặc khác, đã xác nhận được rằng các nhóm G3, G4 và G5 thể hiện đáp ứng dương từ hai tuần sau khi tiêm chủng cho đến cuối thử nghiệm sao cho đáp ứng miễn dịch thể dịch xảy ra. Cụ thể, mức chuẩn độ kháng thể tăng mạnh mẽ từ 2 tuần đến 5 tuần sau khi tiêm chủng, thể hiện mức kháng thể cao hơn mức kháng thể của nhóm vaccin thương mại G2 qua toàn bộ vùng thời gian của thử nghiệm. Khi so sánh với nhóm G1 PBS, các nhóm G3, G4 và G5 thể hiện các giá trị quan trọng về thống kê. Các kết quả này đề xuất rằng vaccin *mycoplasma* 2-giá bao gồm protein rP97m đã sản xuất có thể cảm ứng kháng thể với hiệu suất lớn hơn so với vaccin thương mại hiện có cảm ứng. Kết quả này cho thấy rằng protein rP97m có thể đẩy mạnh hơn nữa phản ứng tạo thành kháng thể bằng chủng.

Đo mức kháng thể huyết thanh đặc trưng rP97

Để đánh giá các đáp ứng miễn dịch đặc trưng rP97m cảm ứng bởi các ứng viên vaccin khác nhau trong thử nghiệm sử dụng vaccin Mycoplasma 2-giá ở lợn, ELISA gián tiếp được thực hiện sử dụng các huyết thanh từ lợn đã tiêm vaccin. Các kết quả được minh họa trên Fig.5.

Như được minh họa trên Fig.5, các mức kháng thể đặc hiệu rP97m đối với các nhóm đã tiêm vaccin G3, G4 và G5 đã bắt đầu tăng từ ngày 14 sau khi tiêm chủng. Khi so sánh với nhóm G1 PBS, các mức kháng thể đặc hiệu rP97m đối với các nhóm

đã tiêm vaccin G3, G4 và G5 có các giá trị quan trọng về thống kê. Ngược lại, kháng thể đặc hiệu rP97m không được phát hiện trong nhóm G2 đã tiêm vaccin thương mại. Các kết quả này cho thấy rằng các vaccin thương mại không bao gồm protein P97, protein này đóng vai trò quan trọng đối với việc bảo vệ sớm chống lại *Mycoplasma* ở lợn.

Đo mức kháng thể huyết thanh đặc hiệu *Mycoplasma hyorhinis*

Vaccin *Mycoplasma* 2-giá ở lợn bao gồm *Mycoplasma hyorhinis*. Vì vậy, mức kháng thể chống lại *Mycoplasma hyorhinis* được đo. Các kết quả được minh họa trên Fig.6. Tương tự, tất cả mẫu lợn là âm tính về huyết thanh trước khi tiêm chủng và sau đó thử nghiệm được thực hiện.

Như được minh họa trên Fig.6, nhóm G1 PBS có đáp ứng âm trong suốt quá trình tiêm chủng. Mặt khác, nhóm G3, G4 và G5, các nhóm này được tiêm chủng bằng vaccin 2-giá thể hiện đáp ứng dương từ tuần thứ 4 sau khi tiêm chủng cho đến cuối thử nghiệm. Nhóm 4 nhóm điều trị có giá trị quan trọng về thống kê khi so sánh với nhóm PBS. Do đó, đã xác nhận được rằng Nhóm 4 nhóm điều trị thể hiện đáp ứng miễn dịch thể dịch. Mặt khác, *Mycoplasma hyorhinis* không bao gồm trong nhóm vaccin thương mại G2 sao cho kháng thể đặc hiệu *Mycoplasma hyorhinis* không được phát hiện trong đó. Nhóm G2 này chỉ đáp ứng âm cho đến 5 tuần sau khi tiêm chủng.

2.4.3. Nhận biết đáp ứng miễn dịch tế bào nhờ tiêm chủng bằng vaccin 2-giá

Để đánh giá miễn dịch tế bào của vaccin *Mycoplasma* 2-giá ở lợn, PBMC (Tế bào Đơn nhân Máu Ngoại vi) được phân lập từ mẫu máu lợn tại hai tuần sau khi tiêm chủng, đó là, tại thời điểm khi kháng thể bắt đầu được hình thành. Số lượng IFN- γ như được tạo ra sau khi kích thích bằng *Mycoplasma hyoneumoniae* được đánh giá sử dụng dụng cụ ELISA INF- γ lợn từ công ty Novex. Các kết quả được minh hoạt trên Fig.7.

Như được minh họa trên Fig.7, nhóm vaccin thương mại thể hiện duy nhất đáp ứng miễn dịch tế bào thấp, trong khi đó các nhóm G3, G4 và G5 được tiêm chủng với vaccin 2-giá như được tạo ra trong Ví dụ 2 có các giá trị sinh INF- γ cao hơn đáng kể về thống kê so với giá trị sinh của nhóm vaccin thương mại G2. Chúng tôi cũng nhận ra rằng vaccin 2-giá như sản xuất có thể cảm ứng đáp ứng miễn dịch tế bào tốt hơn so với nhóm vaccin thương mại.

2.4.4. Nhận dạng các tác dụng phụ do tiêm chủng Vacxin 2-giá

Để đánh giá các tác dụng phụ của vacxin *Mycoplasma* 2-giá ở lợn, trọng lượng cơ thể của các nhóm thử nghiệm được đo và so sánh với nhau. Nói chung, các tác dụng phụ do tiêm vacxin có thể bao gồm các triệu chứng như viêm, hoại tử da, các con tai biến, v.v. Khi tác dụng phụ dữ dội, điều này có thể làm chể và gây thiệt hại đối với trang trại. Thêm vào đó, khi các tác dụng phụ sau khi tiêm vacxin xuất hiện, lượng thức ăn lợn ăn vào sẽ giảm nhanh chóng và tốc độ tăng trưởng lợn sẽ giảm. Đánh giá liệu có hay không việc vacxin *Mycoplasma* 2-giá đã sản xuất gây ra các tác dụng có hại do việc tiêm vacxin đó, trọng lượng cơ thể của nhóm đối chứng G1, nhóm vacxin thương mại G2 và nhóm đã tiêm vacxin hiện tại G3, G4 và G5 được đo trong năm tuần sau khi tiêm chủng. Các kết quả được minh họa trên Fig.8.

Như được minh họa trên Fig.8, không có sự khác nhau về trọng lượng giữa các nhóm đã tiêm vacxin hiện tại G3, G4 và G5, nhóm đối chứng G1 và nhóm vacxin thương mại G2. Do đó, chúng tôi cũng nhận ra rằng vacxin *mycoplasma* 2-giá đã sản xuất bao gồm rP97m có thể được sử dụng làm vacxin an toàn mà không có các tác dụng phụ lên lợn.

Vacxin 2-giá bao gồm protein tái tổ hợp gồm có trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO: 13 dẫn đến mức đáp ứng miễn dịch thể dịch đặc hiệu *Mycoplasma hyopneumoniae* và *Mycoplasma hyorhinis* cao, và mức đáp ứng miễn dịch tế bào đặc hiệu *Mycoplasma hyopneumoniae* cao. Do đó, vacxin 2-giá bao gồm protein tái tổ hợp gồm có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 13 có thể hiệu quả hơn về việc cảm ứng đáp ứng miễn dịch hơn so với vacxin thương mại.

Yêu cầu bảo hộ

1. Protein tái tổ hợp để sản xuất vaccin ngăn ngừa nhiễm *Mycoplasma hyopneumoniae* ở lợn, protein này bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 1.
2. Polynucleotit mã hóa protein tái tổ hợp theo điểm 1.
3. Polynucleotit theo điểm 2, trong đó polynucleotit này bao gồm trình tự bazơ được nêu trong SEQ ID NO: 2.
4. Chế phẩm vaccin ngăn ngừa nhiễm *Mycoplasma hyopneumoniae*, chế phẩm này bao gồm protein tái tổ hợp theo điểm 1.
5. Chế phẩm theo điểm 4, trong đó chế phẩm này bao gồm thêm *Mycoplasma hyopneumoniae* bất hoạt.
6. Chế phẩm theo điểm 5, trong đó *Mycoplasma hyopneumoniae* bất hoạt được bao gồm với lượng nằm trong khoảng từ $1,0 \times 10^6$ đến $1,0 \times 10^{10}$ CCU (đơn vị thay đổi màu)/ml.
7. Tá dược vaccin ngăn ngừa nhiễm *Mycoplasma hyopneumoniae* bao gồm protein tái tổ hợp theo điểm 1.
8. Chế phẩm vaccin ngăn ngừa bệnh gây ra do nhiễm *Mycoplasma hyopneumoniae*, chế phẩm này bao gồm protein tái tổ hợp theo điểm 1.
9. Phương pháp sản xuất tá dược vaccin ngăn ngừa nhiễm *Mycoplasma hyopneumoniae*, phương pháp này bao gồm các bước:
 - 1) tạo ra vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa protein tái tổ hợp được nêu trong SEQ ID NO: 1;
 - 2) biến nạp vật chủ sử dụng vectơ này; và
 - 3) biểu hiện protein tái tổ hợp trong vật chủ đã được biến nạp.
10. Protein tái tổ hợp để sản xuất vaccin ngăn ngừa nhiễm *Mycoplasma hyopneumoniae* và *Mycoplasma hyorhinis* ở lợn, protein này bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 13.
11. Polynucleotit mã hóa protein tái tổ hợp theo điểm 11.

12. Polynucleotit theo điểm 12, trong đó polynucleotit gồm có trình tự bazơ được nêu trong SEQ ID NO: 14.
13. Chế phẩm vaccin ngăn ngừa nhiễm *Mycoplasma hyopneumoniae* và *Mycoplasma hyorhinis* ở lợn bao gồm protein tái tổ hợp theo điểm 11.
14. Chế phẩm theo điểm 14, trong đó chế phẩm này bao gồm thêm *Mycoplasma hyopneumoniae* bất hoạt và *Mycoplasma hyorhinis* bất hoạt.
15. Chế phẩm theo điểm 15, trong đó *Mycoplasma hyopneumoniae* bất hoạt hoặc *Mycoplasma hyorhinis* bất hoạt bao gồm với nồng độ nằm trong khoảng từ $1,0 \times 10^6$ đến $1,0 \times 10^{10}$ CCUs (Đơn vị thay đổi màu)/ml.
16. Tá dược vaccin ngăn ngừa nhiễm *Mycoplasma hyopneumoniae* và *Mycoplasma hyorhinis* ở lợn bao gồm protein tái tổ hợp theo điểm 11.
17. Chế phẩm vaccin ngăn ngừa bệnh gây ra do nhiễm *Mycoplasma hyopneumoniae* và *Mycoplasma hyorhinis* ở lợn, chế phẩm này bao gồm protein tái tổ hợp theo điểm 11.
18. Phương pháp sản xuất tá dược vaccin ngăn ngừa nhiễm *Mycoplasma hyopneumoniae* và *Mycoplasma hyorhinis* ở lợn, phương pháp này bao gồm các bước:
- 1) tạo ra vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa protein tái tổ hợp được nêu trong SEQ ID NO: 13;
 - 2) biến nạp vật chủ sử dụng vectơ này; và
 - 3) biểu hiện protein tái tổ hợp trong vật chủ đã được biến nạp.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Innovac

<120> PROTEIN TÁI TỔ HỢP ĐỂ SẢN XUẤT VACXIN NGĂN NGỪA NHIỄM MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE Ở LỢN VÀ CHẾ PHẨM VACXIN BAO GỒM PROTEIN NÀY

<130> INNOVAC1-1P-1

<150> 2016-0103259

<151> 2016-08-12

<160> 14

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 274

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> Mycoplasma hyopneumoniae rP97 protein sequence

<400> 1

Met Gly Ile Pro Thr Lys Glu Gly Lys Arg Glu Glu Val Asp Lys Lys
1 5 10 15

Val Lys Glu Leu Asp Asn Lys Ile Lys Gly Ile Leu Pro Gln Pro Pro
20 25 30

Ala Ala Lys Pro Glu Ala Ala Lys Pro Val Ala Ala Lys Pro Glu Ala
35 40 45

Ala Lys Pro Val Ala Ala Lys Pro Glu Ala Ala Lys Pro Glu Ala Ala
50 55 60

Lys Pro Val Ala Ala Lys Pro Glu Ala Ala Lys Pro Val Ala Ala Lys
65 70 75 80

Pro Glu Ala Ala Lys Pro Val Ala Thr Asn Thr Asn Thr Gly Phe Ser
85 90 95

Leu Thr Asn Lys Pro Lys Glu Asp Tyr Phe Pro Met Ala Phe Ser Tyr
100 105 110

Lys Leu Glu Tyr Thr Asp Glu Asn Lys Leu Ser Leu Lys Thr Pro Glu
 115 120 125

Ile Asn Val Phe Leu Glu Leu Val His Gln Ser Glu Tyr Glu Glu Gln
 130 135 140

Lys Ile Ile Lys Glu Leu Asp Lys Thr Val Leu Asn Leu Gln Tyr Gln
 145 150 155 160

Phe Gln Glu Val Lys Val Thr Ser Glu Gln Tyr Gln Lys Leu Ser His
 165 170 175

Pro Met Met Thr Glu Gly Ser Pro Asn Gln Gly Lys Lys Gly Glu Gly
 180 185 190

Thr Pro Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala Pro Asn Gln Gly Lys
 195 200 205

Lys Ala Glu Gly Ala Pro Ser Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala Ser
 210 215 220

Asn Gln Gln Ser Pro Thr Thr Lys Gly Gly Arg Ala Asp Pro Ala Phe
 225 230 235 240

Leu Tyr Lys Val Val Ile Asn Ser Lys Leu Glu Gly Lys Pro Ile Pro
 245 250 255

Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr Arg Thr Gly His His His His
 260 265 270

His His

<210> 2
 <211> 825
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> Mycoplasma hyopneumoniae rP97 DNA sequence

<400> 2
 atggggatcc ctacaaaaga aggtaaaaga gaagaagtag ataaaaaagt taaagaatta 60

gataataaaa taaaaggtat attacctcag cccccagcag ctaaaccaga agcagcaaaa 120
 ccagtagcag ctaaacctga agcagcaaaa ccagtagcgg ctaaacctga agcagcaaaa 180
 cctgaagcag caaaaccagt agcggctaaa cctgaagcag caaaaccagt agcagctaaa 240
 cctgaagcag caaaaccagt tgctactaat actaatactg gcttttctact tacaataaaa 300
 ccaaaagaag actattttccc aatggctttt agttataaat tagaatatac tgacgaaaat 360
 aaattaagcc taaaaacacc ggaaattaat gtatttttag aactagttca tcaaagcgag 420
 tatgaagaac aaaaaataat aaaggaacta gataaaactg ttttaaatct tcaatatcaa 480
 ttccaggaag tcaaggtaac tagtgaacaa tatcagaaac ttagccaccc aatgatgacc 540
 gagggatctc ctaatcaagg taaaaaagga gaaggaactc ctaaccaagg caaaaaagcc 600
 gaaggcgctc ctaaccaagg caaaaaagcc gaaggcgcac ctagtcaagg gaaaaagca 660
 gagggtgctt ctaatcaaca aagcccaact accaagggtg ggcgcgccga cccagctttc 720
 ttgtacaaag tggatgatcaa ttcgaagctt gaaggtaagc ctatccctaa ccctctcctc 780
 ggtctcgatt ctacgcgtac cggatcatcat caccatcacc attga 825

<210> 3
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> LTB Forward primer

<400> 3
 caccatggct cccagacta ttaca 25

<210> 4
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> LTB Reverse primer

<400> 4
 ctggatcccc atactgattg c 21

<210> 5
 <211> 26

<212> DNA
 <213> artificial sequence

 <220>
 <223> R1 Forward primer

 <400> 5
 caccatgggg atccctacaa aagaag 26

 <210> 6
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

 <220>
 <223> R1 Reverse primer

 <400> 6
 gccaaagctta gtagcaactg gt 22

 <210> 7
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

 <220>
 <223> R1 Forward primer

 <400> 7
 caccatgggg atccctacaa aagaag 26

 <210> 8
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

 <220>
 <223> 2Rs Reverse primer

 <400> 8
 ggtagttggg ctttggtg 18

 <210> 9
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

 <220>
 <223> LTB Forward primer

<400> 9
caccatggct cccagacta ttaca 25

<210> 10
<211> 22
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> R1 Reverse primer

<400> 10
gccaaagctta gtagcaactg gt 22

<210> 11
<211> 25
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> LTB Forward primer

<400> 11
caccatggct cccagacta ttaca 25

<210> 12
<211> 18
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> 2RsR

<400> 12
ggtagttggg ctttgttg 18

<210> 13
<211> 380
<212> PRT
<213> artificial sequence

<220>
<223> Mycoplasma hyopneumoniae rP97m protein sequence

<400> 13

Met His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro Arg Gly Ser
1 5 10 15

Gly Met Lys Glu Thr Ala Ala Ala Lys Phe Glu Arg Gln His Met Asp
 20 25 30

Ser Pro Asp Leu Gly Thr Asp Asp Asp Lys Ala Met Ala Asp Ile
 35 40 45

Gly Ser Glu Phe Ala Pro Gln Thr Ile Thr Glu Leu Cys Ser Glu Tyr
 50 55 60

Arg Asn Thr Gln Ile Tyr Thr Ile Asn Asp Lys Ile Leu Ser Tyr Thr
 65 70 75 80

Glu Ser Met Ala Gly Lys Arg Glu Met Val Ile Ile Thr Phe Lys Ser
 85 90 95

Gly Ala Thr Phe Gln Val Glu Val Pro Gly Ser Gln His Ile Asp Ser
 100 105 110

Gln Lys Lys Ala Ile Glu Arg Met Lys Asp Thr Leu Arg Ile Ala Tyr
 115 120 125

Leu Thr Glu Thr Lys Ile Asp Lys Leu Cys Val Trp Asn Asn Lys Thr
 130 135 140

Pro Asn Ser Ile Ala Ala Ile Ser Leu Glu Gly Ile Pro Thr Lys Glu
 145 150 155 160

Gly Lys Arg Glu Glu Val Asp Lys Lys Val Lys Glu Leu Asp Asn Lys
 165 170 175

Ile Lys Gly Ile Leu Pro Gln Pro Pro Ala Ala Lys Pro Glu Ala Ala
 180 185 190

Lys Pro Val Ala Ala Lys Pro Glu Ala Ala Lys Pro Val Ala Ala Lys
 195 200 205

Pro Glu Ala Ala Lys Pro Glu Ala Ala Lys Pro Val Ala Ala Lys Pro
 210 215 220

Glu Ala Ala Lys Pro Val Ala Ala Lys Pro Glu Ala Ala Lys Pro Val
 225 230 235 240

Ala Thr Asn Glu Gly Thr Pro Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala
245 250 255

Pro Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala Pro Ser Gln Gly Lys Lys
260 265 270

Ala Glu Gly Ala Ser Asn Gln Gln Ser Pro Thr Thr Glu Leu Thr Asn
275 280 285

Tyr Leu Pro Glu Leu Gly Lys Lys Ile Asp Glu Ile Ile Lys Lys Gln
290 295 300

Gly Lys Asn Trp Lys Thr Glu Val Glu Leu Ile Glu Asp Asn Ile Ala
305 310 315 320

Gly Asp Ala Lys Leu Leu Tyr Phe Val Leu Arg Asp Asp Ser Lys Ser
325 330 335

Gly Asp Pro Lys Lys Ser Ser Leu Lys Val Lys Ile Thr Val Lys Gln
340 345 350

Ser Asn Asn Asn Gln Glu Leu Lys Ser Lys Gln Ala Cys Gly Arg Thr
355 360 365

Arg Ala Pro Pro Pro Pro Pro Leu Arg Ser Gly Cys
370 375 380

```
<210> 14
<211> 1143
<212> DNA
<213> artificial sequence
```

<220>
<223> Mycoplasma hyopneumoniae rP97m DNA sequence

```
<400> 14
atgcaccatc atcatcatca ttcttctggt ctggtgccac gcggttctgg tatgaaagaa 60
accgctgctg ctaaattcga acgccagcac atggacagcc cagatctggg taccgacgac 120
gacgacaagg ccatggctga tatcggatcc gaattcgctc cccagactat tacagaacta 180
tgttcgggaat atcgcaacac acaaatatat acgataaatg aaaaaatact atcatatacg 240
```

gaatcgatgg caggcaaaag agaaatggtt atcattacat ttaagagcgg cgcaacattt	300
caggtcgaag tcccgggcag tcaacatata gactcccaa aaaaagccat tgaaaggatg	360
aaggacacat taagaatcgc atatctgacc gagacaaaaa ttgataaatt atgtgtatgg	420
aataataaaa cccccaattc aattgcggca atcagtctcg aggggatccc tacaaaagaa	480
ggtaaaagag aagaagtaga taaaaaagtt aaagaattag ataataaaat aaaaggata	540
ttacctcagc ccccgagcgc taaaccagaa gcagcaaaac cagtagcagc taaacctgaa	600
gcagcaaaac cagtagcggc taaacctgaa gcagcaaaac ctgaagcagc aaaaccagta	660
gcggctaaac ctgaagcagc aaaaccagta gcagctaaac ctgaagcagc aaaaccagtt	720
gctactaatg aaggaactcc taaccaaggc aaaaaagccg aaggcgctcc taaccaaggc	780
aaaaaagccg aaggcgccacc tagtcaaggg aaaaaagcag agggtgcttc taatcaacaa	840
agcccaacta ccgaattaac taattacctt cctgaattag gtaaaaaaat tgacgaaatc	900
attaaaaaac aaggtaaaaa ttggaaaaca gaggttgaac taatcgagga taatatcgct	960
ggagatgcta aattgctata ctttgtccta agggatgatt caaatccgg tgatcctaaa	1020
aatcaagtc taaaagttaa aataacagta aaacaaagta ataataatca ggaattaaaa	1080
tctaaacaag cttgcggccg cactcgagca ccaccaccac caccactgag atccggctgc	1140
taa	1143

Fig. 1

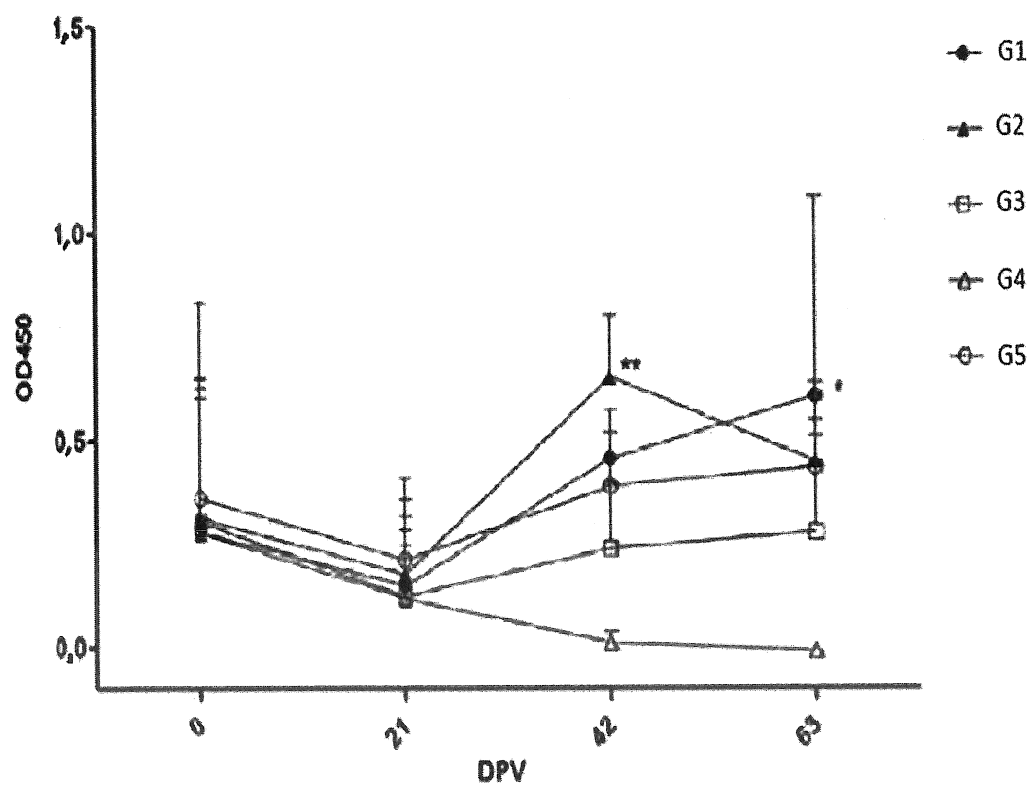


Fig. 2

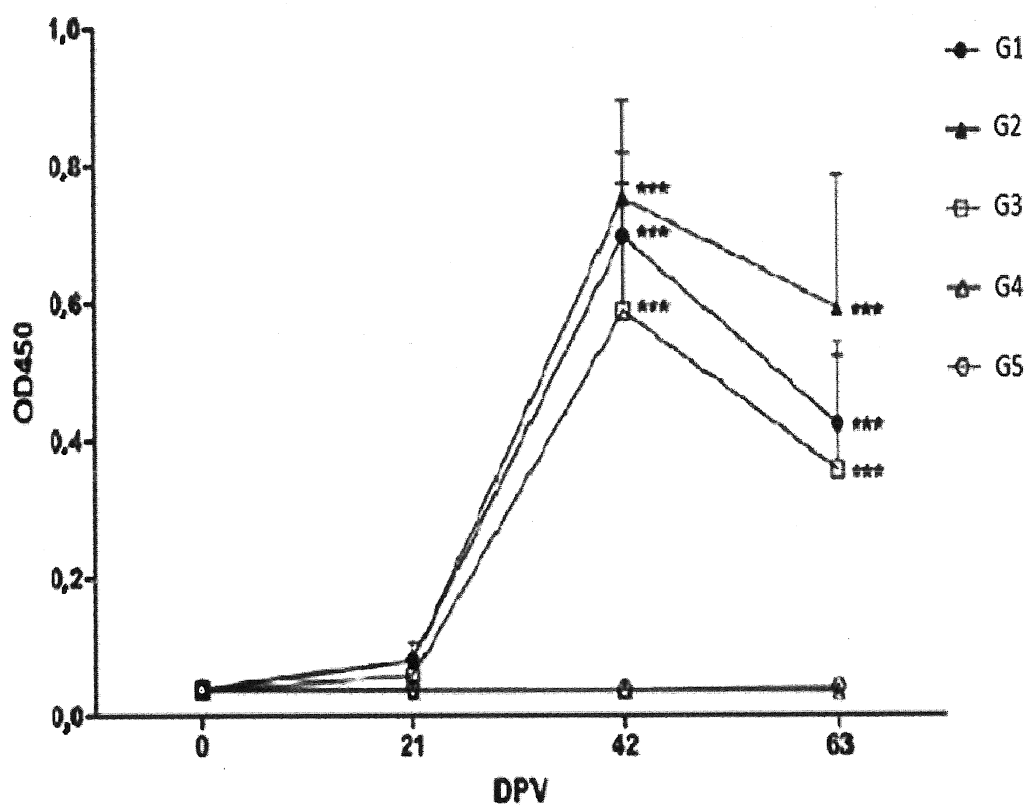


Fig. 3A

P97

ATG	LTB	R1		R2		His-Taq	TAG
-----	-----	----	--	----	--	---------	-----

P97m

ATG	His-Taq	LTB	R1	R2	tail	TAG
-----	---------	-----	----	----	------	-----

Fig. 3B

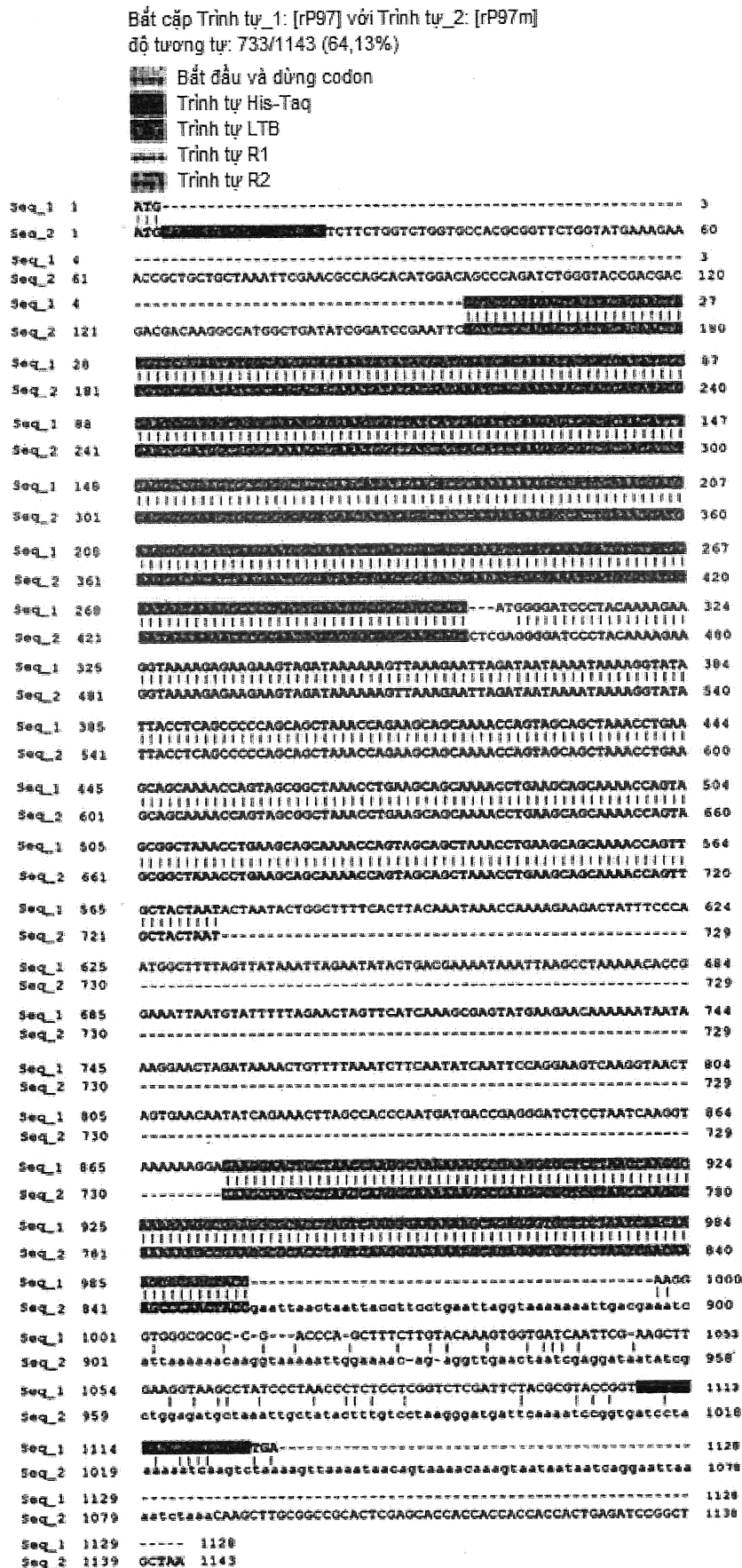


Fig. 4

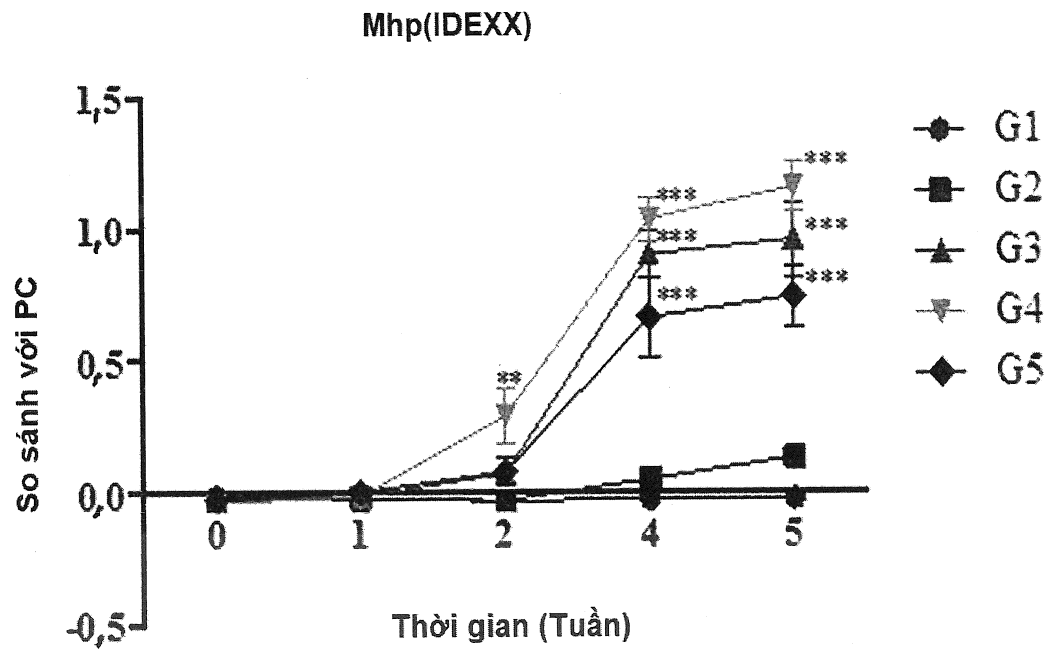


Fig. 5

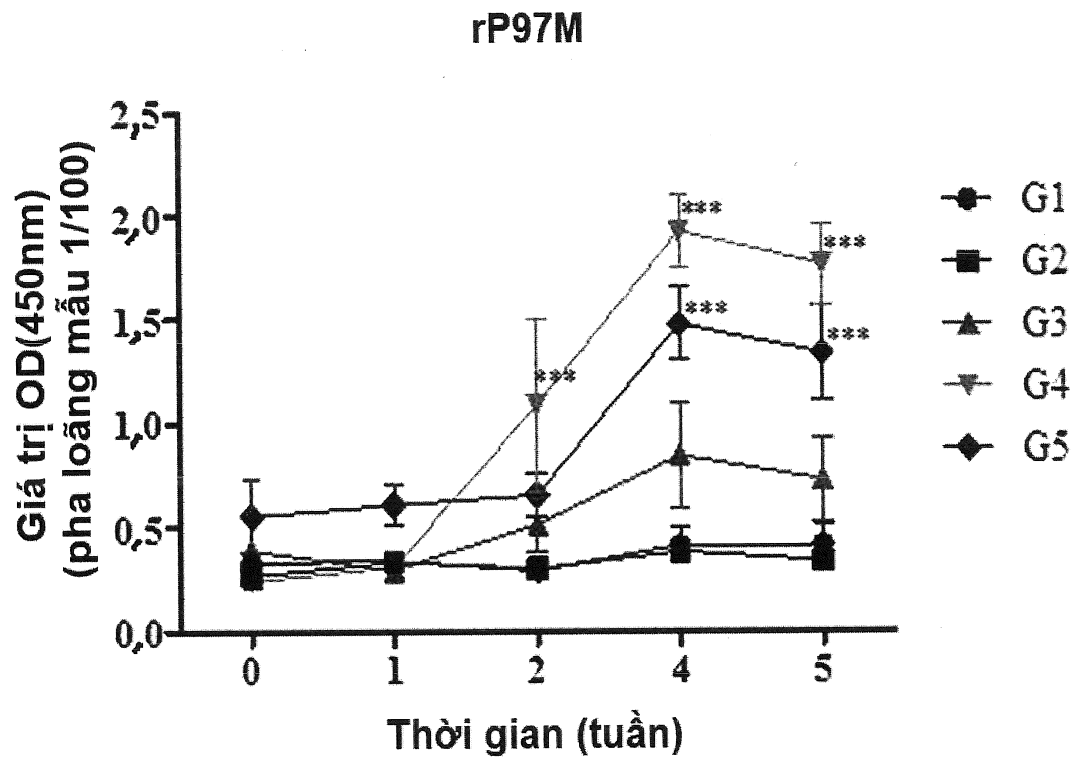


Fig. 6

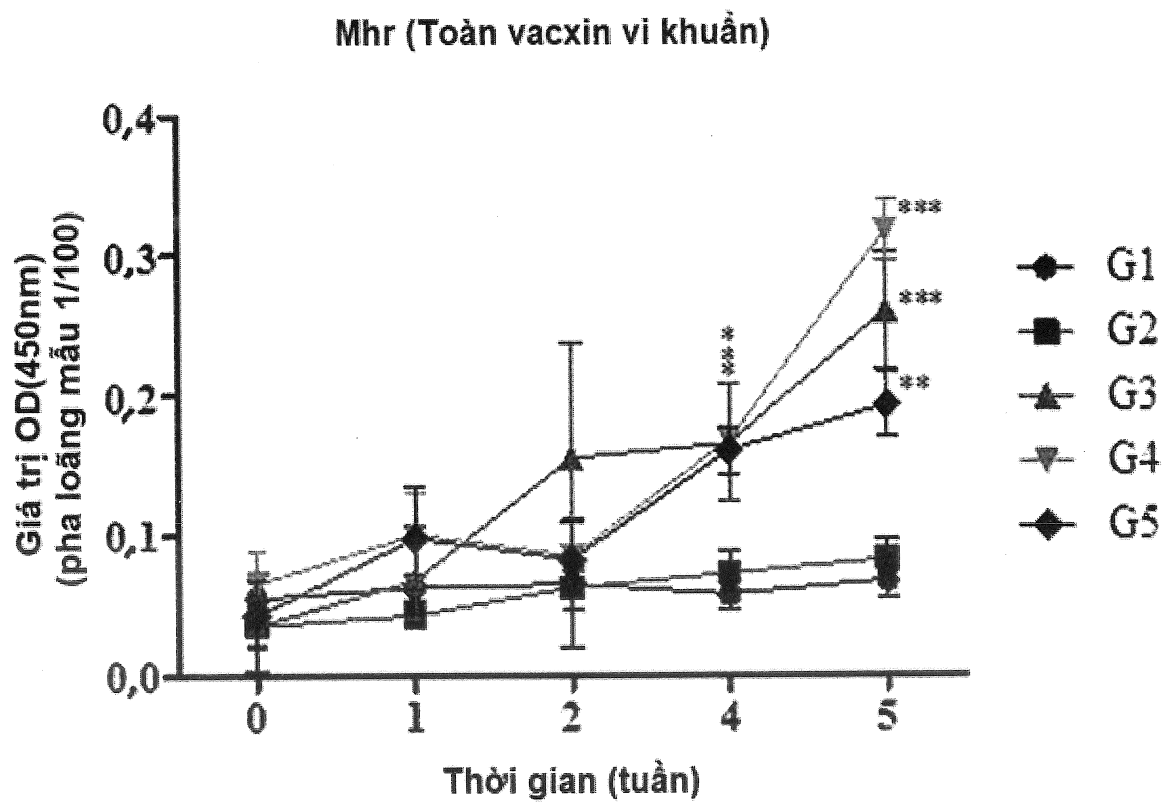


Fig. 7

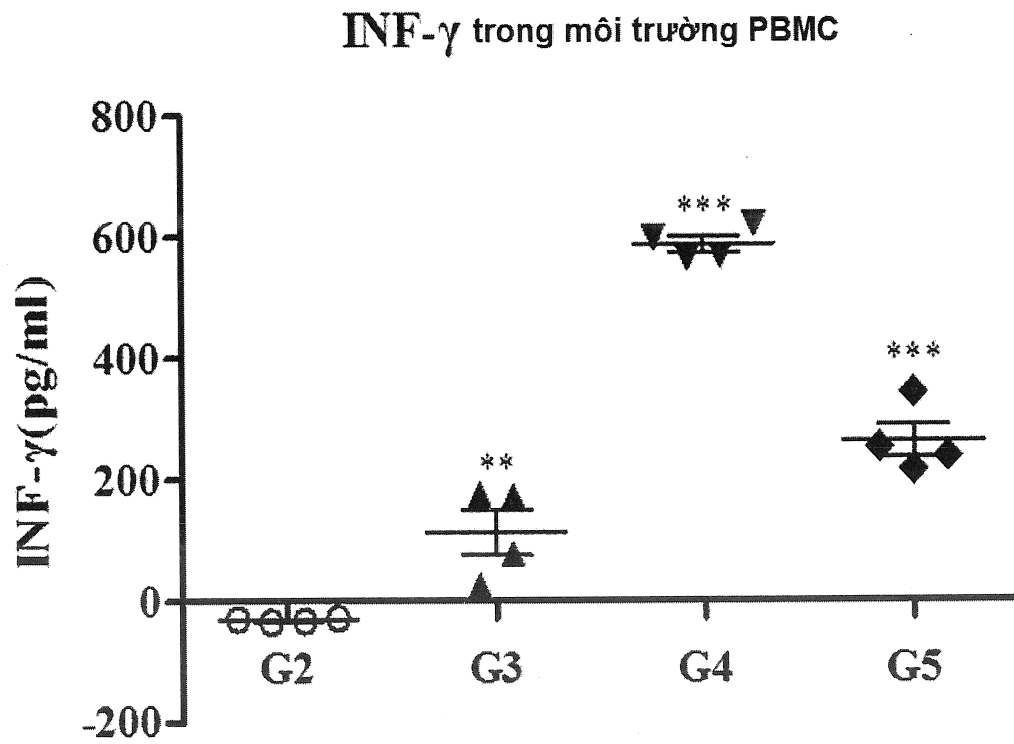


Fig. 8

