



(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)



1-0036817

(51)^{2015.01} A61K 35/63; A61K 35/64

(13) B

(21) 1-2017-02280

(22) 19/11/2015

(86) PCT/GB2015/000302 19/11/2015

(87) WO 2016/079463 26/05/2016

(30) 1420515.7 19/11/2014 GB; 1519523.3 05/11/2015 GB

(45) 25/09/2023 426

(43) 25/09/2017 354A

(73) IMMUNE MACRO-BIOTIC TECHNOLOGY UK LIMITED (GB)

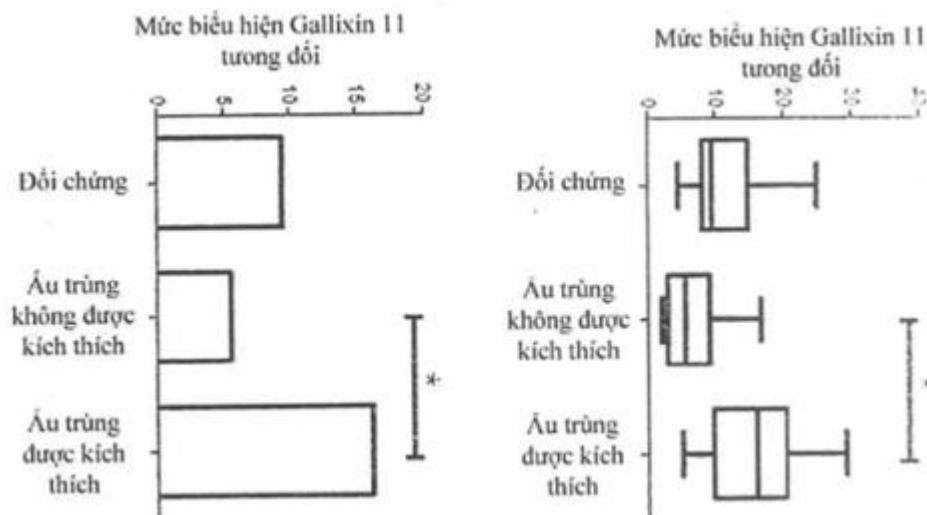
First Floor, CEF Building, Broomhill Way, Torquay, TQ2 7QN, United Kingdom

(72) LEONARD, Christopher Jeremy (GB).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT THUỐC DỰA TRÊN SỰ BIỂU HIỆN ĐƯỢC ĐIỀU BIẾN CỦA PEPTIT KHÁNG KHUẨN

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp được cải thiện để sản xuất thuốc, phương pháp này bao gồm việc sử dụng mô, các dạng ấu trùng hoặc các dẫn xuất của côn trùng được cho ăn thức ăn chứa mầm bệnh, khác biệt ở chỗ biểu hiện của các peptit kháng khuẩn được điều biến bằng cách thay đổi có chọn lọc số lượng hoặc bản chất của mầm bệnh được sử dụng. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp được cải thiện để sản xuất thuốc, phương pháp này bao gồm việc sử dụng mô, các dạng ấu trùng hoặc các dẫn xuất của côn trùng được cho ăn thức ăn chứa mầm bệnh, khác biệt ở chỗ ấu trùng được thử thách với *Pseudomonas syringae* được sử dụng.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp hình thành miễn dịch.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế Anh số 2 368 016 đã mô tả phương pháp sản xuất thuốc, phương pháp này bao gồm việc sử dụng mô, các dạng ấu trùng hoặc các dẫn xuất của côn trùng được cho ăn thức ăn chứa mầm bệnh. Phương pháp này sau đây gọi là “phương pháp đã được xác định” và dẫn đến biểu hiện của các peptit kháng khuẩn mà sau đây gọi là AMP.

Mục đích của sáng chế là đề xuất sự cải thiện cho phương pháp đã được xác định.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phương pháp đã được xác định trong đó biểu hiện của AMP được điều biến (được tối đa hóa) bằng cách thay đổi có chọn lọc số lượng hoặc bản chất của mầm bệnh được sử dụng.

Nhờ sử dụng cách cho ấu trùng ăn vi khuẩn, đã phát hiện ra rằng, các AMP khác nhau được kích thích tối đa bằng các liều dùng vi khuẩn khác nhau. Do đó, biểu hiện Dipterixin có lợi ở liều dùng cao, trong khi Sapexin thì ở liều dùng thấp.

Cho đến nay kết hợp vi khuẩn/ấu trùng tối ưu được phát hiện là *Lucilia serritica* được kích thích bởi *Pseudomonas syringae*, loại vi khuẩn mà không gây bệnh cho con người hoặc động vật khác và được tìm thấy trong môi trường.

Do đó, theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề xuất phương pháp đã được xác định mà bao gồm việc kích thích *Lucilia serritica* bằng *Pseudomonas syringae*.

Phơi nhiễm ấu trùng 4 ngày tuổi ra vi khuẩn này trong mười hai giờ phát hiện thấy tăng biểu hiện AMP lên đến 30 lần so với ấu trùng không được kích thích. Ấu trùng có thể được kích thích với vi khuẩn còn sống hoặc đã chết mà không tác động đến việc tiêu thụ thức ăn ấu trùng hoặc trọng lượng cuối.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 thể hiện số lượng vi khuẩn *Camphylobacter* trong ruột tịt của gia cầm được cho ăn khẩu phần có bổ sung đậu nành, ấu trùng không được kích thích (không kích thích) hoặc ấu trùng được kích thích (kích thích). Các thanh chỉ ra sự khác biệt đáng kể giữa các nhóm,

Hình 2 thể hiện số lượng vi khuẩn axit lactic trong ruột tịt của gia cầm được cho ăn khẩu phần có bổ sung đậu nành, ấu trùng không được kích thích (không kích thích) hoặc ấu trùng được kích thích (kích thích). Không thấy sự khác biệt đáng kể giữa các nhóm,

Hình 3 thể hiện số lượng vi khuẩn đường ruột trong ruột tịt của gia cầm được cho ăn khẩu phần có bổ sung đậu nành, ấu trùng không được kích thích (không kích thích) hoặc ấu trùng được kích thích (kích thích). Không thấy sự khác biệt đáng kể giữa các nhóm.

Hình 4 thể hiện các mức trung bình về biểu hiện Gallixin 11 trong hạch manh tràng ở gia cầm được cho ăn khẩu phần đối chứng hoặc ấu trùng không được kích thích hoặc ấu trùng được kích thích. Phương pháp Asterisk chỉ ra sự khác biệt đáng kể bằng cách sử dụng thử nghiệm phân tích hậu kiểm Dunn.

Mô tả chi tiết sáng chế

Gà giò Ross theo ngày tuổi được nhốt trong các phương tiện an toàn sinh học và được cho ăn thức ăn cho gà được bán trên thị trường bổ sung với 10% hoặc là bột xay đậu nành, ấu trùng *Lucilia* không được kích thích được nghiền hoặc ấu trùng *Lucilia* không được kích thích được nghiền.

Ấu trùng côn trùng nuôi trong hỗn hợp bột sữa/đường/mầm lúa mạch/aga trong 4 ngày được lấy ra khỏi môi trường này và rửa. Sau đó đưa chúng vào trong môi trường tăng trưởng mới không có bổ sung vi khuẩn (không được kích thích) hoặc chứa khoảng 5×10^7 *Pseudomonas syringae* cho một gam (được kích thích). Sau 24 giờ ở trong môi trường này, ấu trùng được lấy ra, rửa để loại đi tất cả các vết của môi trường tăng trưởng và làm khô lạnh. Khi đã khô, chúng được nghiền bằng cách sử dụng chày và cối giã để thu được bột thô để bổ sung vào thức ăn cho gà.

Ở 3 ngày tuổi, gia cầm được gây nhiễm theo đường miệng với 10^5 cfu chủng *Campylobacter jejuni* M1.

Ở 8 ngày tuổi, gia cầm được gây chết và ruột tịt được lấy ra và được xét nghiệm về *Campylobacter*, vi khuẩn axit lactic và vi khuẩn đường ruột bằng cách pha loãng theo dãy và đặt trải ra trên aga mCCDA, MRS, và VRBG tương ứng. Sự khác nhau về mức vi khuẩn được tìm thấy trong các gia cầm được phân tích bằng cách sử dụng thử nghiệm Kruskal-Wallis cùng với thử nghiệm phân tích hậu kiểm Dunn với $P < 0,05$ được xem là đáng kể.

Việc sử dụng thức ăn chứa ấu trùng được kích thích dẫn đến giảm *Campylobacter* trong ruột tịt (Hình 1); không thấy tác dụng trên số vi khuẩn lactic hoặc vi khuẩn đường ruột (các hình vẽ Hình 2 và Hình 3).

Về sự cư trú của vi khuẩn, 13% gia cầm cho ăn đậu nành là âm tính đối với *Campylobacter* trong ruột tịt sau 8 ngày, 18% gia cầm được cho ăn ấu trùng không được kích thích và 41% gia cầm được cho ăn ấu trùng được kích thích. Thức ăn chứa ấu trùng được kích thích dẫn đến giảm đáng kể ($P < 0,05$) về số lượng của gia cầm có cư trú của vi khuẩn *Campylobacter* trong ruột tịt so với đối chứng được bổ sung đậu nành.

Ấu trùng của *Lucillia serricata*, *Calliphora vicinae* và *Musca domestica* được đánh giá về biểu hiện peptit kháng khuẩn của chúng (AMP) sau khi kích thích với ba loài vi khuẩn khác nhau. Do sự kích thích của vi khuẩn được thấy là làm tăng biểu hiện AMP, các thực nghiệm được tiến hành để khảo sát các thông số tối ưu để kích thích ấu trùng.

Kết hợp vi khuẩn/ấu trùng tối ưu được thấy là ấu trùng của *Lucillia serricata* được kích thích bằng *Pseudomonas syringae*, loại vi khuẩn mà không gây bệnh cho động vật hoặc con người. Phơi nhiễm ấu trùng bốn ngày tuổi ra vi khuẩn này trong mười hai giờ được thấy là làm tăng biểu hiện AMP lên đến ba mươi lần cao hơn so với ấu trùng không được kích thích.

Ấu trùng có thể được kích thích với vi khuẩn sống hoặc chết và điều này không tác động đến việc tiêu thụ thức ăn ấu trùng hoặc trọng lượng cuối. Còn có bằng chứng về tương tác giữa khả năng gây bệnh của vi khuẩn, thời gian và liều dùng tác động đến biểu hiện AMP.

Các thử nghiệm trong ống nghiệm được tiến hành bằng cách sử dụng bột được chuẩn bị từ ấu trùng của *Lucillia serricata* được kích thích bằng *Pseudomonas*

syringae thử nghiệm về hiệu quả của nó làm tác nhân kháng khuẩn kháng *Campylobacter jejuni*, với bột từ ấu trùng không được kích thích được sử dụng làm đối chứng.

Qua khoảng thời gian ba giờ, vi khuẩn *Campylobacter* được ủ với bột từ ấu trùng không được kích thích có khả năng tăng trưởng trong khi môi trường nuôi cấy vi khuẩn được phơi nhiễm ra 1% trọng lượng/thể tích bột từ ấu trùng được kích thích với *Pseudomonas syringae* thể hiện sự chết vi khuẩn đáng kể ($P=0,0015$).

Ấu trùng *Lucillia serricata* được thử thách với *Pseudomonas syringae* được cho gà giò ăn. Sau đó gây nhiễm gà theo đường miệng để thử nghiệm khả năng miễn dịch của chúng.

Lucillia serricata trưởng thành được để cho đẻ trứng trong hỗn hợp 1:1:1 gồm mầm lúa mạch, nấm men và bột sữa mà được hóa rắn với aga. Hỗn hợp chứa trứng này được tách thành các phần và khi nở thành ấu trùng hoặc là được thử thách với *Pseudomonas syringae* hoặc để lại không được thử thách. Sau 4 ngày, gom ấu trùng, rửa để loại đi thức ăn và làm khô lạnh đến hàm lượng ẩm bằng 15%. Ấu trùng sau đó được nghiền mịn thành bột mịn trong chày và cối giã lạnh.

Các nhóm gà giò Ross 18 ngày tuổi được nhốt trong các phương tiện an toàn sinh học và được cho ăn thức ăn gia cầm bán trên thị trường được bổ sung với 10% trọng lượng/trọng lượng hoặc là bột xay đậu nành (để cân bằng các mức protein với thức ăn chứa ấu trùng), 10% trọng lượng/trọng lượng ấu trùng *Lucilia* không được kích thích được nghiền hoặc 10% trọng lượng/trọng lượng ấu trùng *Lucilia* được kích thích được nghiền.

Ở 3 ngày tuổi, gia cầm được gây nhiễm theo đường miệng với 10^5 cfu chủng *Campylobacter jejuni* M1.

Ở 8 ngày tuổi, gia cầm được gây chết và hạch manh tràng được đặt ngay sau đó vào ARN. mARN được chiết bằng cách sử dụng bột kit Qiagen và xét nghiệm về biểu hiện Gallixin 11 bằng phương pháp RT-PCR định lượng sử dụng các đoạn mồi D11F cagaattgcagaaagccaca và D11R ttctacgtgtgcgtgtgtga với beta actin gà làm gen giữ nhà. Biểu hiện của Gallixin 11 được biểu hiện so với biểu hiện beta actin.

Sự khác nhau giữa các nhóm gia cầm được xét nghiệm về dấu hiệu sử dụng thử nghiệm Kruskal-Wallis với thử nghiệm phân tích hậu kiểm Dunn làm dữ liệu không được phân bố bình thường.

Các kết quả của thử nghiệm được thể hiện trên Hình 4 của phần hình vẽ. Hình A là biểu đồ hộp và râu trong đó mỗi hộp thể hiện điểm tứ phân vị từ thứ nhất đến thứ ba với ở giữa là đường bên trong hộp. Các râu thể hiện khoảng giá trị dữ liệu. Hình B là đường tần suất thể hiện mức biểu hiện trung bình.

Gallixin 11 được chọn sao cho nó được thấy là được biểu hiện trong ruột bởi các loại khác (Hong và cộng sự Poult. Sci. (2012) 1082).

Khẩu phần ăn có ảnh hưởng đáng kể đến biểu hiện Gallixin 11 ($P=0,0007$). Ở gia cầm được cho ăn khẩu phần chứa mức độ biểu hiện Gallixin 11 tương đối của ấu trùng được kích thích trong ruột tịt là cao hơn rõ rệt so với ở gia cầm được cho ăn khẩu phần chứa ấu trùng không được kích thích. Điều này thể hiện rằng việc cho ăn ấu trùng được kích thích, mà chứa lượng AMP của côn trùng lớn hơn, kích thích biểu hiện AMP ở vật chủ. Điều này có thể tạo ra sự kích thích hoạt tính kháng khuẩn bổ sung trong ruột vượt và cao hơn dự tính cho AMP của ruồi trong chính thức ăn.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất thuốc, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

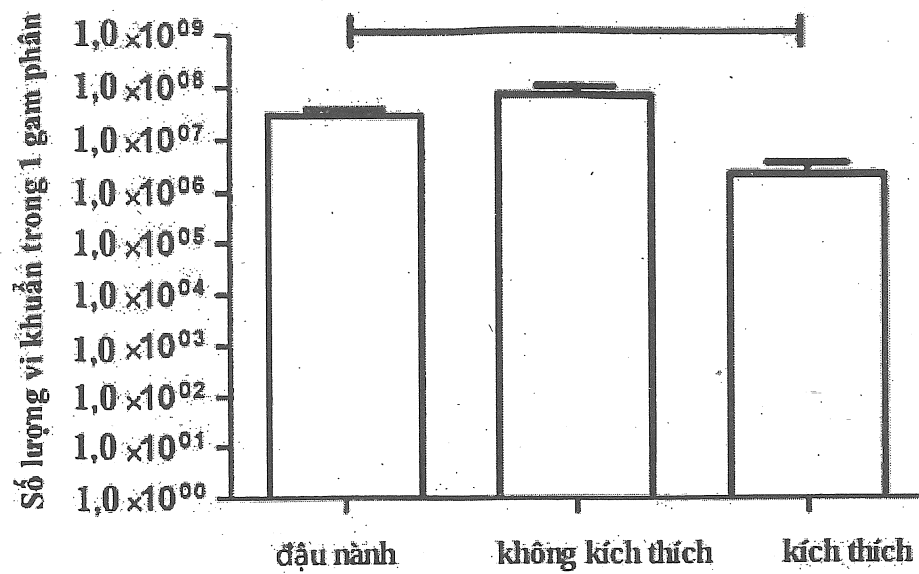
phơi nhiễm các dạng ấu trùng của côn trùng với thức ăn chứa mầm bệnh trong khoảng thời gian kéo dài, trong đó các dạng ấu trùng của các côn trùng này ít nhất là bốn ngày tuổi, và trong đó thời gian kéo dài ít nhất là mười hai giờ;

tối đa hóa sự biểu hiện của các peptit kháng khuẩn bằng cách thay đổi có chọn lọc số lượng hoặc bản chất của mầm bệnh:

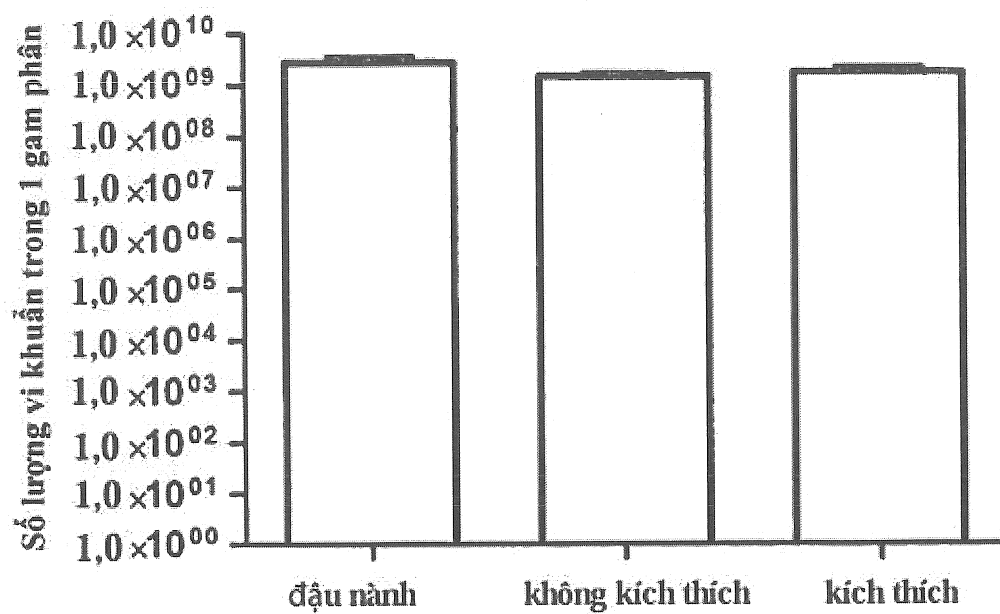
trong đó các dạng ấu trùng của côn trùng được phơi nhiễm với *Pseudomonas syringae*; và

trong đó các dạng ấu trùng của côn trùng là *Lucillia serricata*.

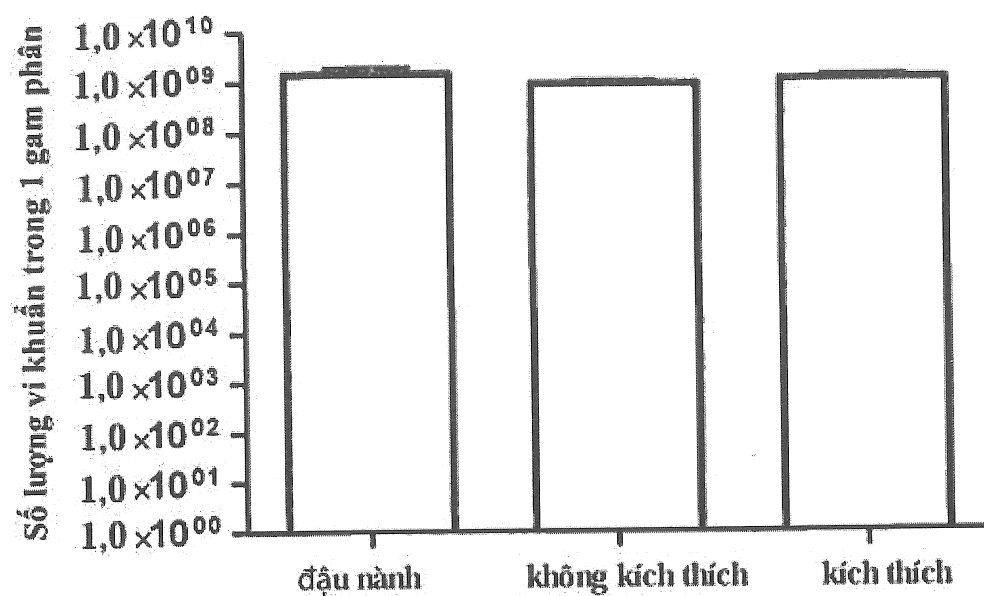
2. Phương pháp sản xuất thuốc theo điểm 1, trong đó thời gian kéo dài là hai mươi tư giờ.



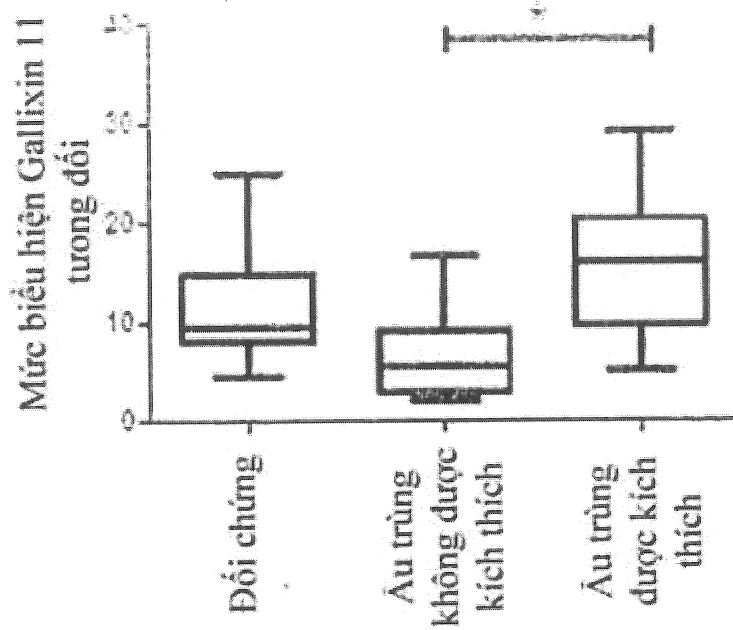
Hình 1: Số lượng vi khuẩn *Campylobacter* trong ruột tịt của gia cầm được cho ăn khẩu phần có bổ sung đậu nành, ấu trùng không được kích thích (không kích thích) hoặc ấu trùng được kích thích (kích thích). Các thanh chỉ ra sự khác biệt đáng kể giữa các nhóm.



Hình 2: Số lượng vi khuẩn axit lactic trong ruột tịt của gia cầm được cho ăn khẩu phần cỏ bổ sung đậu nành, ấu trùng không được kích thích (không kích thích) hoặc ấu trùng được kích thích (kích thích). Không thấy sự khác biệt đáng kể giữa các nhóm.



Hình 3: Số lượng vi khuẩn đường ruột trong ruột tịt của gia cầm được cho ăn khẩu phần có bổ sung đậu nành, ấu trùng không được kích thích (không kích thích) hoặc ấu trùng được kích thích (kích thích). Không thấy sự khác biệt đáng kể giữa các nhóm.

A**Hình 4****B**