



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

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0048199

(51)^{2020.01} A61K 39/39; A61K 39/00; A61K 39/135 (13) B

-
- (21) 1-2021-06149 (22) 02/05/2019
(86) PCT/KR2019/005243 02/05/2019 (87) WO2020/189840 24/09/2020
(30) 10-2019-0030149 15/03/2019 KR
(45) 25/07/2025 448 (43) 27/12/2021 405A
(73) REPUBLIC OF KOREA (ANIMAL AND PLANT QUARANTINE AGENCY) (KR)
177, Hyeoksin 8-ro, Gimcheon-si Gyeongsangbuk-do 39660, Republic of Korea
(72) LEE, Minja (KR); PARK, Jong-Hyeon (KR); KIM, Su-Mi (KR); JO, Hyundong
(KR); KIM, Byoungnan (KR).
(74) Công ty Cổ phần Sở hữu công nghiệp INVESTIP (INVESTIP)
-

- (54) CHẾ PHẨM BỔ TRỢ DÙNG CHO VACXIN PHÒNG BỆNH LỞ MÒM LONG
MÓNG VÀ CHẾ PHẨM VACXIN CHO BỆNH LỞ MÒM LONG MÓNG BAO
GỒM CHẾ PHẨM BỔ TRỢ NÀY

(21) 1-2021-06149

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm bổ trợ cho vaccin phòng bệnh lở mồm long móng. Sáng chế có thể đề xuất tạo ra đáp ứng miễn dịch mạnh thông qua tạo ra đồng thời miễn dịch tế bào và dịch thể ở động vật móng guốc như trâu bò, lợn, v.v., để phòng ngừa và điều trị sự bùng phát bệnh lở mồm long móng, chế phẩm bổ trợ an toàn và được tối ưu hóa, và chế phẩm vaccin bao gồm chế phẩm đó. Thêm vào đó, khi bệnh lở mồm long móng bùng phát, sáng chế có thể được sử dụng để đối phó với sự bùng phát là vaccin khẩn cấp trong lĩnh vực, và có thể đề xuất vaccin tại chỗ được ổn định hóa cho động vật móng guốc.

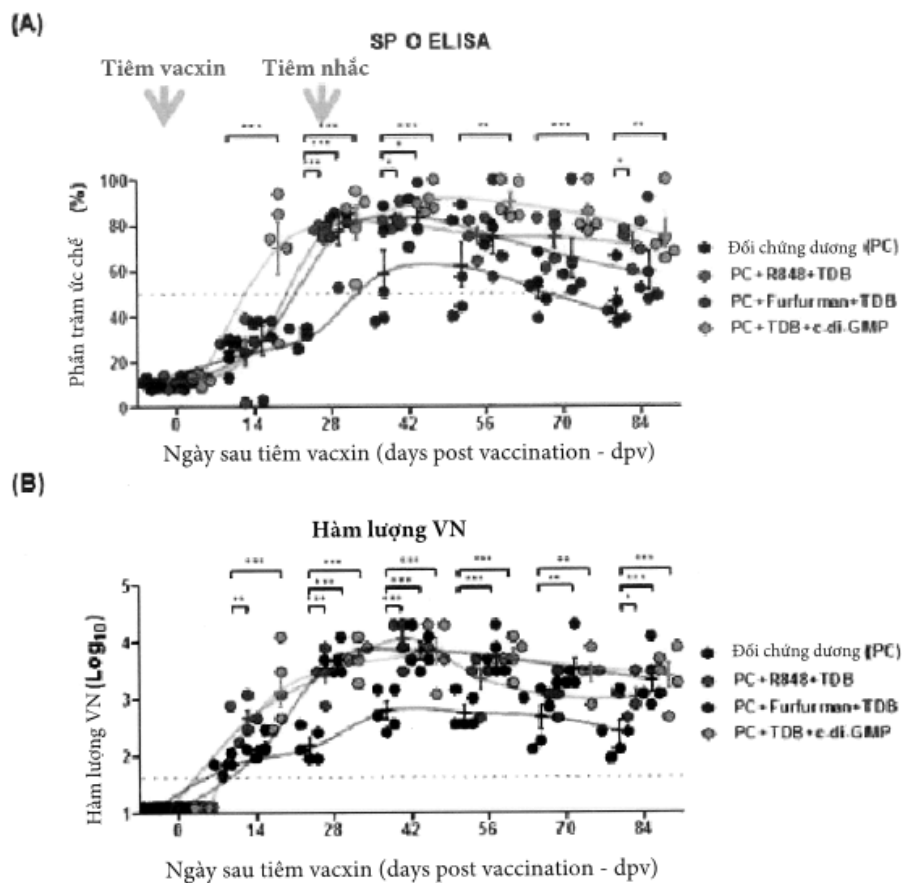


FIG.29

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chất bổ trợ tăng cường miễn dịch dùng cho vacxin phòng bệnh lở mồm long móng và chế phẩm vacxin chứa chất bổ trợ đó. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến chất bổ trợ để tăng cường tính miễn dịch cho vacxin phòng bệnh lở mồm long móng, mà có thể được dùng kết hợp với nhũ tương dầu, và chế phẩm vacxin chứa chất bổ trợ đó.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh lở mồm long móng (foot-and-mouth disease (FMD)) là bệnh gây ra do virus truyền nhiễm cao gây ảnh hưởng chủ yếu đến gia súc móng guốc (đó là, bộ guốc chẵn (Artiodactyla)), dẫn đến thiệt hại kinh tế đáng kể cho ngành chăn nuôi do sự lây lan nhanh của nó, tỷ lệ chết cao và giảm năng suất. Các loài dễ mắc bệnh gồm 70 loài động vật hoang dã trở lên, gồm động vật nhai lại (gia súc nhai lại) như trâu bò, lợn, trâu nước, lạc đà, cừu và dê. Bệnh này đi kèm với sốt cao và được biết là gây phỏng rộp ở miệng, lưỡi, mồm, mũi, núm vú, móng guốc và các vùng da không có lông khác.

Tiêm vacxin được dùng làm phương tiện để kiểm soát tình trạng bệnh ở các quốc gia chịu tổn thất do bệnh lở mồm long móng, và đóng vai trò quan trọng trong việc thiết lập các kế hoạch đối phó ở các quốc gia không có bệnh lở mồm long móng. Vacxin phòng bệnh lở mồm long móng trên thế giới sử dụng các loại vacxin chết (bất hoạt), và đa số chúng được cải thiện về mặt hiệu quả bằng các tiêm vacxin với chất bổ trợ dầu (Nhũ tương dầu đôi (Double Oil Emulsion, DOE) hoặc nhũ tương dầu đơn (Single Oil Emulsion, SOE)). Tuy nhiên, giai đoạn tạo ra kháng thể đến mức độ bảo vệ muộn, hàm lượng kháng thể thấp, thời gian tồn lưu kháng thể ngắn và tính sinh miễn dịch thấp ở lợn so với trâu bò được xem là nhược điểm.

Các vacxin phòng bệnh lở mồm long móng cho đến nay tập trung vào việc tạo ra đáp ứng miễn dịch dịch thể hơn là đáp ứng miễn dịch tế bào, nhưng hiệu suất bảo vệ của chúng không hoàn hảo. Giai đoạn tạo ra đáp ứng miễn dịch dịch thể (kháng thể trung hoà chính IgG) bởi vacxin phòng bệnh lở mồm long móng mất 4 đến 7 ngày, trong khi đáp ứng miễn dịch tế bào được tạo ra trong vài giờ đến 3 ngày. Vì vậy, ở giai đoạn sớm

khi nhiễm bệnh lở mồm long móng, việc tạo ra đáp ứng miễn dịch tế bào đường như hiệu quả hơn trong việc bảo vệ vật chủ so với đáp ứng miễn dịch dịch thể. Ngoài ra, vaccin phòng bệnh lở mồm long móng hiện nay yêu cầu việc tiêm vaccin mỗi 4 đến 6 tháng do thời gian duy trì kháng thể sau khi tiêm vaccin ngắn. Cụ thể, khi tiêm bắp cho lợn, có nhược điểm là độ an toàn thấp và tác dụng phụ tại chỗ như hình thành tổn thương tại vị trí tiêm vaccin như xơ hoá và u hạt tại vị trí tiêm. Mặt khác, nghiên cứu về vaccin phòng bệnh lở mồm long móng cho đến nay đã được thực hiện trên số lượng lớn các nghiên cứu đánh giá để xác định tính hiệu quả của vaccin trên trâu bò so với trên lợn trong số các loài gia súc, tuy nhiên, báo cáo đưa ra rằng tính sinh miễn dịch ở lợn thấp hơn so với ở trâu bò. Vì vậy, thiết kế vaccin lý tưởng để khắc phục những hạn chế của các vaccin trong thương mại nên thoả mãn các yêu cầu gồm, ví dụ, đồng thời tạo ra miễn dịch tế bào và dịch thể, duy trì hàm lượng kháng thể cao bằng cách tạo ra đáp ứng nhớ, đảm bảo an toàn để giảm phản ứng tại chỗ, và phát triển chất bổ trợ được tối ưu hoá cho các loài gia súc theo chiến lược mới và tương tự.

Tại các quốc gia nước ngoài, Marcol 52, ISA 206 và ISA 50 được sử dụng nhiều nhất làm chất bổ trợ trong vaccin phòng bệnh lở mồm long móng trong thương mại. Là nghiên cứu liên quan đến chất bổ trợ để bảo vệ hiệu quả phòng bệnh lở mồm long móng, nhiều nghiên cứu đa dạng như đánh giá hiệu quả vaccin phòng bệnh lở mồm long móng ở lợn và dê, sử dụng: các phối tử thụ thể nhận dạng mẫu (pattern recognition receptors (PRRs)) như R848, Poly(I:C), MDP, MPL, β -glucan, v.v.; chất tăng cường tính miễn dịch như dầu hạt nho và saponin rễ nhân sâm, v.v.; hoặc các chất bổ trợ trong thương mại điển hình (ISA 201, ISA 206, Emulsigen-D, Carbigen, v.v.), đã được nghiên cứu, tuy nhiên, chúng chưa tạo ra miễn dịch hoàn toàn.

Ngoài vaccin phòng bệnh lở mồm long móng, còn có nỗ lực để tăng cường tính sinh miễn dịch bằng cách đồng thời tạo ra miễn dịch tế bào và dịch thể với vaccin chủ yếu cho người, cụ thể: 1) hệ thống vận chuyển vaccin như nhũ tương dầu, chất hoạt động bề mặt, liposom, virosom, ISCOMs, v.v.; 2) chất tăng cường miễn dịch như saponin, nhôm hydroxit, kali photphat, v.v.; 3) thụ thể giống toll (toll-like receptors (TLRs)), thụ thể giống RIG-I (RIG-I-like receptors (RLRs)), thụ thể giống miền oligo hoá liên kết nucleotit (nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)) (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors (NLRs)) và các tác nhân kích thích miễn dịch đặc hiệu thụ thể như phối tử thụ thể lectin loại C (C-type lectin receptors (CLRs))

4) các xytokin khác nhau như IL-1, IL-2, IL-6, IL-18, TNF α , IFN α , IFN γ và GM-CSF, và tương tự đã được nghiên cứu và sử dụng làm chất bổ trợ. Một vài vật liệu này gần đây được sử dụng làm chất bổ trợ vaccin để phòng ngừa và điều trị nhiều bệnh ở người như ung thư, lao, viêm gan B, sốt rét, cúm, HIV và HSV, hoặc trong thử nghiệm lâm sàng, nhưng không được dùng làm chế phẩm vaccin phòng bệnh lở mồm long móng. Ngoài ra, vì các chất bổ trợ khác nhau có phương thức hoạt động khác nhau, rất quan trọng trong việc hiểu rằng cơ chế miễn dịch học của các chất bổ trợ cho sự phát triển vaccin FMD theo chiến lược mới mà có thể tạo ra đáp ứng miễn dịch tế bào và dịch thể mạnh.

Vì vậy, sáng chế nhằm đề xuất khả năng của việc phát triển vaccin FMD theo chiến lược mới thông qua phát triển nhiều phối tử PRR và xytokin khác nhau có hiệu quả bổ trợ ở chuột, sự tạo ra đáp ứng miễn dịch ghi nhớ thông qua tạo ra đáp ứng miễn dịch tế bào và dịch thể, và các chất bổ trợ tối ưu cho các loài khác nhau (bộ guốc chẵn như trâu bò và lợn) và chế phẩm vaccin phòng bệnh lở mồm long móng gồm các chất bổ trợ đó.

Trong khi đó, các tài liệu trước có liên quan đến công nghệ nêu trên gồm Công bố sáng chế Hàn Quốc số 10-2017-0097116 có tiêu đề “vaccin phòng bệnh lở mồm long móng”, Công bố sáng chế Hàn Quốc số 10-2018-0024030 có tiêu đề “Chất bổ trợ dạng dầu”, và tương tự, nhưng hiệu quả của các vật liệu nêu trên như hỗn trợ tăng cường miễn dịch hoặc các chất bổ trợ có thể dùng trong vaccin phòng bệnh lở mồm long móng và chế phẩm vaccin gồm các hạt đó không được mô tả cụ thể

Tài liệu kỹ thuật viện dẫn

Tài liệu sáng chế

(Tài liệu sáng chế 1) Công bố sáng chế Hàn Quốc số 10-2017-0097116

(Tài liệu sáng chế 2) Công bố sáng chế Hàn Quốc số 10-2018-0024030

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật của sáng chế

Để giải quyết các vấn đề nêu trên, sáng chế nhằm mục đích đề xuất chất bổ trợ an toàn và được tối ưu hoá để tạo ra kháng thể bảo vệ cho động vật bộ guốc chẵn (cụ thể là, gia súc có móng guốc) như trâu bò và lợn cũng như chuột để phòng ngừa và điều trị bệnh lở mồm long móng, và chế phẩm vaccin gồm chất bổ trợ đó.

Phương tiện giải quyết vấn đề

Để đạt được mục tiêu như trên, sáng chế đề xuất chế phẩm bổ trợ chứa các phối tử thụ thể nhận dạng mẫu (PRRs) là thành phần hoạt chất.

Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất chế phẩm vaccin phòng ngừa bệnh lở mồm long móng gồm chế phẩm nêu trên.

Chế phẩm bổ trợ có thể chứa xytokin là thành phần hoạt chất, cùng với các phối tử thụ thể nhận dạng mẫu (PRRs).

Theo sáng chế, bộ guốc chẩn thường để chỉ nhóm động vật có hai móng chẳng hạn như trâu bò, lợn, cừu, dê, tuần lộc, trâu nước và lạc đà, và tốt hơn là trâu bò và lợn.

Kháng nguyên virus bệnh lở mồm long móng theo sáng chế có thể gồm virus bệnh lở mồm long móng kiểu huyết thanh O, virus bệnh lở mồm long móng kiểu huyết thanh A, virus bệnh lở mồm long móng kiểu huyết thanh châu Á 1, virus bệnh lở mồm long móng kiểu huyết thanh C, virus bệnh lở mồm long móng kiểu huyết thanh SAT1, virus bệnh lở mồm long móng kiểu huyết thanh SAT2 và/hoặc virus bệnh lở mồm long móng SAT3 và tương tự.

Xytokin là thuật ngữ chung cho các yếu tố hoạt động sinh học được tiết ra từ tế bào và có ảnh hưởng đến tín hiệu gian bào, điều hoà hoạt động tế bào, điều hoà đáp ứng miễn dịch, v.v., và có thể là các protein phân tử thấp như interleukin, lymphokin, interferon, các yếu tố tăng sinh và biệt hoá tế bào, v.v..

Các xytokin theo sáng chế có thể gồm IL-1 beta, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-12/23p40, IL-15/15R, IL-17A, IL-21, IL-22, IL-23 (IL-12p40/IL-23p19), IL-33, TNF-alpha, IFN-alpha, IFN-beta, IFN-gamma, v.v., nhưng chúng không giới hạn ở đó.

Xytokin nêu trên nghĩa là các xytokin thường được sử dụng, và có thể gồm các xytokin tái tổ hợp biểu hiện trong các tế bào *E. Coli*, Baculovirus, HEK 293 và tương tự.

Trong các phối tử thụ thể nhận dạng mẫu (PRRs) theo sáng chế, thụ thể nhận dạng mẫu có thể được dùng để nhận dạng các mẫu phân tử được bảo quản để phân biệt virus, vi khuẩn, nấm và ký sinh trùng, và phối tử đề cập đến chất đồng vận của thụ thể, nghĩa là, chất mà liên kết với thụ thể và kích hoạt nó.

Các phối tử PRR có thể gồm, ví dụ, R848 (chất đồng vận TLR-7/8), TDB (chất đồng vận Mincle), Curdlan (chất đồng vận Dectin-1), Furfurman (chất đồng vận Dectin-

2, MDP (chất đồng vận NOD-2), MPLA-SM (TLR-4), Zymosan (Dectin-2/TLR-2), Chitosan (cảm ứng viêm nhiễm NLRP, MR), Poly(I:C) (TLR-3), Poly(dA:dT) (chất đồng vận RIG-1/CDS, cảm ứng viêm nhiễm AIM-2) hoặc phối tử gốc STING, nhưng nó không giới hạn ở đó.

Phối tử gốc STING có thể gồm ADN, ARN, protein, các đoạn peptit, các hợp chất, v.v.mà có thể kích hoạt tín hiệu STING, và tốt hơn là gồm c-di-GMP (diguanylat vòng), cGAMP, 3'3'-cGAMP, c-di-GAMP, c-di-AMP, 2'3'-cGAMP, 10-(cacboxymetyl)9(10H)acridon (CMA)(10-(cacboxymetyl)9(10H)acridon(CMA)), axit 5,6-dimethylxanthenone-4-axetic -DMXAA, methoxyvon, 6,4'-dimethoxyflavon, 4'-methoxyflavon, 3',6'-dihydroxyflavon, 7,2'-dihydroxyflavon, daidzein, focmononetin, retusin 7-metyl ete, xanthon, và tương tự, nhưng không giới hạn ở đó.

Poly (I:C) đề cập đến không chỉ các polyme tồn tại trong tự nhiên của axit polyinosinic:axit polycytidylic, mà còn cả dạng tổng hợp của chúng.

Chế phẩm theo sáng chế có thể gồm một hoặc nhiều thành phần được chọn tùy ý từ các PRR nêu trên.

Khi hai thành phần trong số các phối tử PRR bao gồm trong đó, bất kỳ một Các phối tử PRR : Các phối tử PRR còn lại có thể bao gồm với tỷ lệ trọng lượng 1 : 1 đến 3, và tốt hơn là 1 : 1 đến 2.

Liên quan đến lượng sử dụng, nghĩa là, liều lượng hoặc liều theo sáng chế, Các phối tử PRR hoặc xytokin không giới hạn, nhưng tốt hơn là gồm trong liều lượng 1 đến 100 µg/ml.

Khi hai Các phối tử PRR trở lên được bao gồm, mỗi phối tử có thể gồm trong đó trong phạm vi 1/2 trở xuống dựa vào liều lượng chứa độc lập, tốt hơn là 1 đến 30 µg/ml, tốt hơn nữa là 5 đến 15 µg/ml, và tốt nhất là 7 đến 10 µg/ml.

Vì liều lượng nêu trên nằm trong phạm vi không độc *in vivo*, nếu nó nằm ngoài phạm vi nêu trên, có rủi ro gây độc với cơ thể khi dùng trên động vật.

Ngoài các thành phần nêu trên, dầu (hoặc nhũ tương dầu) và chất nhũ hoá, gel, v.v. được biết trong lĩnh vực có thể gồm trong đó.

Dầu (hoặc nhũ tương dầu) có thể là ISA 201, ISA 61, ISA 50 hoặc ISA 206, nhưng không giới hạn ở đó.

Chất nhũ hoá có thể gồm các chất thường được nhận biết là chất nhũ hoá, chẳng hạn như các sản phẩm khác của dòng sản phẩm TWEEN® hoặc SPAN® (este axit béo

của socbitol polyethoxy hoá và chất hoạt động bề mặt socbiton thay thế bởi axit béo tương ứng), và các tác nhân cải thiện độ tan khác như dầu thầu dầu PEG-40 hoặc dầu PEGylat hydrogen hoá khác, nhưng không giới hạn ở đó.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Sáng chế có thể đề xuất chế phẩm hỗ trợ an toàn và được tối ưu hoá để tạo ra kháng thể bảo vệ của động vật bộ guốc chẵn như trâu bò, lợn, v.v. nhằm phòng ngừa và điều trị bệnh do virus Picorna gồm bệnh lở mồm long móng, và chế phẩm vaccin gồm chế phẩm hỗ trợ đó. Ngoài ra, khi bệnh lở mồm long móng xảy ra, sáng chế có thể được sử dụng để đối phó hiệu quả với vaccin khẩn cấp trong lĩnh vực, và vaccin hiệu quả và được ổn định hoá có thể được đề xuất làm vaccin thông thường cho động vật bộ guốc chẵn.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG.1 minh họa kết quả tạo ra đáp ứng miễn dịch tế bào ban đầu *in vivo* theo kháng nguyên đặc hiệu theo loại huyết thanh.

FIG.2A minh họa kết quả tạo ra đáp ứng miễn dịch bẩm sinh và đáp ứng miễn dịch tế bào của DCs theo kháng nguyên đặc hiệu theo loại huyết thanh.

FIG.2B minh họa kết quả tạo ra đáp ứng miễn dịch bẩm sinh và đáp ứng miễn dịch tế bào của MΦs theo kháng nguyên đặc hiệu theo loại huyết thanh.

FIG.3 minh họa sơ lược biểu hiện xytokin tạo bởi kháng nguyên virus bệnh lở mồm long móng (O TWN 97-R) ở chuột và chiến lược nghiên cứu động học thời gian *in vivo*.

FIG.4 minh họa sơ lược biểu hiện xytokin và kết quả động học thời gian *in vivo* tạo ra bởi kháng nguyên virus bệnh lở mồm long móng (O TWN 97-R) ở chuột (Thời điểm; 0, 6, 12, 24, 48, 72, 96 giờ).

FIG.5 minh họa chiến lược nhận dạng đặc điểm *in vitro* của biểu hiện xytokin qua trung gian kháng nguyên virus bệnh lở mồm long móng (O TWN 97-R) ở DCs, MΦs, tế bào iNK T, tế bào $\gamma\delta$ T, và tế bào T phân lập từ tế bào dịch tiết phúc mạc (peritoneal exudate cells (PECs)) và tế bào lách của chuột.

FIG.6A đến 6C minh họa kết quả của biểu hiện xytokin theo thời gian qua trung gian kháng nguyên virus bệnh lở mồm long móng (O TWN 97-R) ở DCs, MΦs, tế bào iNK T, tế bào $\gamma\delta$ T và tế bào T phân lập từ tế bào dịch tiết phúc mạc (PECs) và tế bào lách của chuột (Thời điểm; 0, 6, 12, 24, 48, 72, 96 giờ).

FIG.7 minh hoạ chiến lược nhận dạng đặc điểm *in vitro* của biểu hiện xytokin qua trung gian kháng nguyên virus bệnh lở mồm long móng (O TWN 97-R) khi đồng nuôi cấy DCs, tế bào iNK T, tế bào $\gamma\delta$ T và tế bào T phân lập từ tế bào dịch tiết phúc mạc (PECs) và tế bào lách của chuột, trong đó (A) thể hiện chiến lược nghiên cứu *in vitro*, và (B) là giản đồ cho các tế bào đồng nuôi cấy.

FIG.8 minh hoạ kết quả biểu hiện xytokin qua trung gian kháng nguyên ở các tế bào đồng nuôi cấy, DCs, tế bào iNK T, tế bào $\gamma\delta$ T và tế bào T ở chuột.

FIG.9 minh hoạ chiến lược xác nhận hiệu quả bảo vệ *in vivo* qua trung gian kháng nguyên O TWN 97-R ở giai đoạn sớm khi nhiễm virus bệnh lở mồm long móng.

FIG.10 minh hoạ tác động trên hiệu quả bảo vệ *in vivo* qua trung gian kháng nguyên O TWN 97-R (tỷ lệ sống ở chuột, thay đổi trọng lượng cơ thể) ở giai đoạn đầu khi nhiễm virus bệnh lở mồm long móng.

FIG.11 minh hoạ chiến lược làm suy yếu tế bào, trung hoà xytokin, và hiệu quả bảo vệ *in vivo* qua trung gian kháng nguyên.

FIG.12A và 12B minh hoạ hiệu quả bảo vệ *in vivo* (tỷ lệ sống, thay đổi trọng lượng cơ thể) bởi kháng nguyên khi làm suy yếu DCs và MΦs và trung hoà xytokin bảo vệ vật chủ chống lại sự nhiễm virus bệnh lở mồm long móng.

FIG.13 minh hoạ kết quả biểu hiện của các phân tử kích thích qua trung gian kháng nguyên CD40, CD80 và CD86 và sự tăng sinh tế bào ở DCs được xử lý với kháng nguyên O TWN 97-R và chất kích thích (R848, Chitosan, Zymosan, ODN 2395, TDB, Furfuman và c-di-GMP).

FIG.14 minh hoạ hoạt động của IL-23 qua việc kích hoạt đồng thời Dectin-1 và Mincle trong DCs và MΦs.

FIG.15 minh hoạ chiến lược đánh giá tiềm năng của chất bổ trợ vacxin và hiệu quả ghi nhớ miễn dịch ngắn hạn khi nhiễm virus bệnh lở mồm long móng khi các phối tử PRR và xytokin được dùng độc lập hoặc kết hợp.

FIG.16 minh hoạ hiệu quả ghi nhớ miễn dịch ngắn hạn và hiệu quả bảo vệ *in vivo* (tỷ lệ sống, thay đổi trọng lượng cơ thể) khi các phối tử PRR và xytokin được dùng độc lập hoặc kết hợp làm chất bổ trợ bảo vệ chống lại sự nhiễm virus bệnh lở mồm long móng.

FIG.17 minh hoạ chiến lược đánh giá đáp ứng ghi nhớ dài hạn qua trung gian xytokin, protein HSP70 và các phối tử PRR chống lại sự nhiễm virus bệnh lở mồm long

móng (miễn dịch dài hạn) và hiệu quả bảo vệ của chúng ở chuột.

FIG.18A đến 18D minh họa kết quả đáp ứng miễn dịch ghi nhớ dài hạn qua trung gian xytokin, protein HSP70 và các phối tử PRR, và hiệu quả bảo vệ trên việc chống lại sự nhiễm virus bệnh lở mồm long móng ở chuột

FIG.19A đến 19G minh họa kết quả mở rộng xytokin, protein HSP70 và tế bào miễn dịch qua trung gian các phối tử PRR ở chuột.

FIG.20 minh họa chiến lược xác nhận hiệu quả bảo vệ qua trung gian IFN α và IL-23 trên việc nhiễm các loại huyết thanh virus bệnh lở mồm long móng khác nhau (loại O, A, và Asia1).

FIG.21 minh họa kết quả đáp ứng ghi nhớ qua trung gian IFN α và IL-23 và phạm vi rộng của hiệu quả bảo vệ trên việc nhiễm các loại huyết thanh virus bệnh lở mồm long móng khác nhau (loại O, A, và Asia1).

FIG.22 minh họa sự giải phóng LDH (gây độc tế bào, sau 96 giờ) trong tế bào đơn nhân máu ngoại vi (peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)) bò được xử lý qua các phối tử PRR.

FIG.23 minh họa kết quả sự tăng sinh tế bào qua trung gian các phối tử PRR (sau 96 giờ) trong PBMCs bò.

FIG.24 minh họa chiến lược đánh giá hiệu quả chất bổ trợ qua trung gian các phối tử PRR và đáp ứng ghi nhớ ở trâu bò.

FIG.25 minh họa hiệu quả chất bổ trợ qua trung gian các phối tử PRR và kết quả đáp ứng ở trâu bò.

FIG.26 minh họa kết quả giải phóng LDH (gây độc tế bào, sau 96 giờ) trong PBMCs ở lợn xử lý với các phối tử PRR.

FIG.27 minh họa kết quả tăng sinh tế bào qua trung gian các phối tử PRR (sau 96 giờ) ở PBMCs ở lợn.

FIG.28 minh họa chiến lược đánh giá hiệu quả chất bổ trợ qua trung gian các phối tử PRR và đáp ứng ghi nhớ ở lợn.

FIG.29 minh họa kết quả hiệu quả chất bổ trợ qua trung gian các phối tử PRR và đáp ứng ghi nhớ ở lợn.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết bằng cách đưa ra ví dụ và ví dụ thực nghiệm.

Tuy nhiên, các ví dụ và ví dụ thực nghiệm sau đây chỉ đơn thuần minh họa sáng chế, và nội dung của sáng chế không giới hạn ở các ví dụ và ví dụ thực nghiệm sau đây.

Các vật liệu thực nghiệm thường được sử dụng trong các ví dụ và ví dụ thực nghiệm theo sáng chế là như sau;

Kháng nguyên

Các kháng nguyên được tinh chế và làm bất hoạt theo phương pháp sau đây

Kháng nguyên được điều chế từ virus bệnh lở mồm long móng O TWN 97-R (GenBank AY593823 cho P1) và tế bào BHK-21. Đối với sự nhiễm virus, môi trường nuôi cấy được thay thế bởi môi trường Dulbecco Modified Eagle không huyết thanh (DMEM, Cellgro, Manassas, VA, USA) và ủ trong khí CO₂ 5% ở 37 ° C trong 1 giờ để cấy virus. Virus ngoại bào được loại bỏ. Sau 24 giờ từ khi nhiễm virus, virus được làm bất hoạt bằng cách xử lý với 0,003N etylenimin nhị phân hai lần trong 24 giờ trong tủ ấm được lắc và làm cô đặc với polyetylen glycol (PEG) 6000 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Phần cô đặc virus được phân lớp bởi gradien nồng độ 15-45% sucroza, sau đó là bởi ly tâm. Sau khi ly tâm siêu tốc, đáy của ống ly tâm được chọc qua, và thu được phân đoạn 1 mL. Sự hiện diện của các hạt virus bệnh lở mồm long móng trong mỗi mẫu phân đoạn được xác nhận bởi mật độ quang học sử dụng thiết bị dòng bên (BioSign FMDV Ag, Princeton BioMeditech, Princeton, NJ, USA). Trước khi sử dụng trong thí nghiệm, phần nổi được xử lý trước qua PEG được đưa qua tế bào ZZ-R và BHK-21 ít nhất hai lần nhằm xác nhận xem liệu có hay không hiệu ứng tế bào (cytopathic effect (CPE)) xảy ra, và xác nhận rằng không có virus tồn tại trong phần nổi.

Các phối tử thụ thể nhận dạng mẫu (PRRs) và xytokin

Các phối tử PRR, Invivogen (SanDiego, CA, USA) được sử dụng trong khi sản phẩm của MiltenyiBiotec (MiltenyiBiotec, BergischGladbach, Germany) được sử dụng làm xytokin. Nhũ tương dầu ISA 206 được mua từ Seppic Corporation (Seppic Inc. , Paris, France), trong khi gel nhôm hydroxit (Alhydrogel ®) và Quil-A được mua từ Invivogen.

Chuột

Chuột C57BL/6 loại hoang dã (chuột cái 7 tuần tuổi) với độ tuổi và giới tính phù hợp được mua (KOSA BIO Inc, Gyeonggi-do, Korea). Tất cả chuột được nuôi trong lồng cách ly vi sinh trong cơ sở nuôi động vật vô trùng riêng biệt (specific sterile pathogen (SPF)) với Mức độ an toàn sinh học 3 (ABSL3) theo Bộ Kiểm dịch Nông

nghiệp, Lâm nghiệp và Chăn nuôi Hàn Quốc.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ thực nghiệm sơ bộ Thử nghiệm để xác nhận cơ chế miễn dịch học ở vật chủ đối với kháng nguyên bệnh lở mồm long móng.

1. Xác nhận việc tạo đáp ứng miễn dịch nội tại theo các kháng nguyên đặc hiệu theo loại huyết thanh.

1-1. Nhằm xác nhận xem 8 kháng nguyên có tạo đáp ứng miễn dịch nội tại *in vivo* không, 2 µg mỗi kháng nguyên được tiêm vào khoang phúc mạc của chuột, và khoang phúc mạc được rửa với 2 mL PBS được làm mát, và dung dịch rửa phúc mạc thu được được ly tâm, tiếp theo là phân tích mẫu biểu hiện xytokin và động lực thời gian trong phần nổi.

Kết quả của xét nghiệm các mẫu biểu hiện xytokin và sự thay đổi tạm thời do các kháng nguyên đặc hiệu theo loại huyết thanh, biểu hiện của xytokin hướng chống viêm IL-23 và xytokin chống viêm IL-10 được chứng minh rõ rệt rằng có khả năng cạnh tranh gây ra “cơn bão xytokin” bởi hầu hết các kháng nguyên. Trong nhóm được tiêm SAT1-BOT-R, SAT2-ZIM-R và SAT3-ZIM-R, biểu hiện của cả hai xytokin nêu trên được quan sát thấy tương tự nhau từ 48 giờ đến 72 và 96 giờ, trong khi nhóm O PA-2-R, O TWN 97-R, A22-R, C3-Resende-R và Asia1-MOG-R cho thấy biểu hiện của IL-23 cao hơn đáng kể so với IL-10. Biểu hiện của IL-23 đặc trưng bởi các mẫu biểu hiện tương tự ở loại huyết thanh O, cụ thể là, O PA-2-R và O TWN 97-R, tức là, biểu hiện tăng nhanh ở 6 đến 12 giờ và sau đó thể hiện mức độ thấp nhẹ ở 24 giờ. Sau đó, biểu hiện tăng trở lại vào 48 đến 72 giờ và đạt đến mức của 12 giờ, và sau đó giảm đáng kể vào 96 giờ (FIG.1).

1-2. Để khảo sát đáp ứng miễn dịch bẩm sinh và tế bào ở DCs và MΦs bởi các kháng nguyên virus bệnh lở mồm long móng đặc hiệu huyết thanh, DCs và MΦs được phân tách từ chuột chưa thí nghiệm và xử lý với các kháng nguyên tương ứng, sau đó phân tích xytokin gây viêm như IL-1α, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-12/23p40, IL-23 và TNFα trong phần nổi trong nuôi cấy tế bào, các mẫu biểu hiện xytokin chống viêm và động lực thời gian của biểu hiện xytokin ở 0, 12, 24, 48, 72 và 96 giờ. Kết quả là, biểu hiện ở DCs là như sau.

Liên quan đến mức độ biểu hiện của IL-23 và IL-10 đối với loại huyết thanh, mức độ biểu hiện của xytokin ở nhóm xử lý SAT1-BOT-R, SAT2-ZIM-R, SAT3-ZIM-

R, C3-Resende-R và Asia1-MOG-R về cơ bản là tương tự với nhau. Mặt khác, trong trường hợp của A22-R, O PA-2-R và O TWN 97-R, mức độ biểu hiện của IL-23 cao hơn đáng kể so với IL-10. Ngoài ra, mức độ biểu hiện tối đa của IL-6 là cao, chẳng hạn như trong phạm vi 593 đến 753 pg/mL, và xytokin còn lại cho thấy mức độ biểu hiện khoảng 50 đến 200 pg/mL. Trong hầu hết các nhóm được xử lý kháng nguyên, mức độ biểu hiện của IL-23, IL-10 và IL-6 trao đổi chéo với nhau ở 12 giờ, và biểu hiện của IL-6, mà ban đầu tăng lên, cho thấy xu hướng bị kiểm soát giảm xuống bởi xytokin chống viêm IL-10, trong khi IL-23 cho thấy xu hướng được kiểm soát tăng lên liên tục (FIG.2A).

Nhìn chung biểu hiện xytokin ở MΦs tương tự với ở DCs, như thể hiện trên FIG.2A. Ngoài ra, liên quan đến sự thay đổi biểu hiện xytokin tới loại huyết thanh, quan sát thấy rằng mức độ biểu hiện IL-23 ở hầu hết các tế bào được xử lý kháng nguyên ngoại trừ Asia1-MOG-R cao hơn đáng kể sau 48 giờ so với IL-10. Trong trường hợp của các nhóm xử lý SAT1-BOT-R, SAT2-ZIM-R, SAT3-ZIM-R và C3-Resende-R, mức độ biểu hiện cao theo thứ tự IL-10 > IL-6 > IL-23 cho đến 12 giờ. Tuy nhiên, sau khi trao đổi chéo mức độ biểu hiện của các xytokin nêu trên ở 12 đến 48 giờ, mẫu biểu hiện thay đổi theo thứ tự IL-23 > IL-10 > IL-6 sau 48 giờ. Mặt khác, trong trường hợp của A22-R, O PA-2-R và O TWN 97-R, mức độ biểu hiện xytokin cao theo thứ tự IL-6 > IL-23 và IL-10 cho đến 12 giờ, và sau khi trao đổi chéo mức độ biểu hiện của các xytokin này ở 12 đến 24 giờ, mẫu biểu hiện thay đổi theo thứ tự IL-23 > IL-6 và IL-10 sau 24 giờ (FIG.2B).

Từ kết quả nêu trên, xác nhận rằng DCs và MΦs được kích thích hiệu quả ở giai đoạn sớm khi xử lý kháng nguyên đặc hiệu theo loại huyết thanh được thực hiện. Ngoài ra, đã được chứng minh rằng các xytokin gây viêm, là IL-23 và IL-6 và xytokin chống viêm, là IL-10 biểu hiện chủ yếu từ các tế bào kích thích.

2. Đo sự thay đổi ở các xytokin qua trung gian kháng nguyên *in vivo*

Phương pháp thử nghiệm này giống như thể hiện trên FIG.3, và nó đã được cố gắng để xác nhận sự kích thích tế bào miễn dịch bằng cách đo sự thay đổi ở xytokin.

Là kết quả của thí nghiệm, IL-1β (IL-1 beta) và IL-6 ban đầu đã được phản ứng, và hầu như được kích thích qua thời gian. IL-12/23p40, IL-17A và TNFα (TNF anpha) được kích thích giữa 12 và 24 giờ, trong khi IL-1β (IL-1 beta), IL-2, IL-10, IL15/15R và IL-33 được hoàn toàn kích thích trước 72 giờ. Ngoài ra, trong trường hợp của IL-4, IL-9, IL-12p70, IL-21, IL-22 và IFNγ (IFN gamma), đáp ứng tăng lên cho đến 96 giờ.

Vì xytokin được kích thích trong tế bào là khác nhau, nên tế bào làm việc có thể được giả định (FIG.4).

3. Đo sự thay đổi ở sơ lược biểu hiện xytokin *in vitro* qua trung gian kháng nguyên phân lập từ tế bào dịch tiết phúc mạc (PECs) và tế bào lách của chuột

Phương pháp thử nghiệm này giống như thể hiện trên FIG.5. Các tế bào miễn dịch (DCs, MΦs, tế bào iNK T, tế bào γδ T và tế bào T) được phân lập từ tế bào dịch tiết phúc mạc (PECs) và tế bào lách của chuột, sau đó là đo lường sự thay đổi biểu hiện xytokin nhằm xác nhận sự kích thích của các tế bào miễn dịch đặc hiệu. Cụ thể, các tế bào được xử lý với kháng nguyên O TWN 97-R (2 μg), và các tế bào (DCs, MΦs, tế bào iNK T, tế bào γδ T và tế bào T) được phân lập từ PECs và lá lách, sau đó là đo sự thay đổi qua thời gian (0, 6, 12, 24, 48, 72, 96 giờ).

Kết quả của thí nghiệm là, phản ứng của xytokin IL-12p70, IL12/23 tổng p40, IL-10, IL-5 và TNFα, là các xytokin phản ứng với DCs, có xu hướng cao trong 6 đến 12 giờ đầu. Ngoài ra, có thể xác nhận rằng IL-12/23 p40 và IL-23 có xu hướng biểu hiện tăng ở 24 đến 48 giờ (FIG.6A đến 6C).

4. Đo lường sự thay đổi *in vitro* của sơ lược biểu hiện xytokin qua trung gian kháng nguyên O TWN 97-R thông qua nuôi cấy đồng thời các tế bào được phân loại

Phương pháp thử nghiệm này giống như ở Ví dụ thử nghiệm sơ bộ 2 nhằm phân loại tế bào, và các tế bào miễn dịch (DCs, MΦs, tế bào iNK T, tế bào γδ T và tế bào T) được tách và trộn, sau đó đo lường sự thay đổi ở xytokin qua trung gian kháng nguyên O TWN 97-R nhằm xác nhận kích thích của các tế bào miễn dịch (FIG.7). Cụ thể, các tế bào được xử lý với kháng nguyên O TWN 97-R (2 μg), và kết quả của nó được đo lường sau 48 giờ từ kích thích kháng nguyên.

Kết quả của thử nghiệm được xác nhận rằng IL-2, IL-4, IL-5, IL-12/23 p40, IL-15/15R, IL-21, IL-23, IFNγ, v.v. cho thấy phản ứng chỉ khi DCs được thêm vào. Mặt khác, được xác nhận rằng IL-β, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-22, IL-33, TNFα, v.v. cho thấy phản ứng kể cả khi không thêm vào DCs (FIG.8).

5. Phân tích cơ chế bảo vệ của kích thích kháng nguyên qua đáp ứng miễn dịch bẩm sinh

5-1. Chiến lược nghiên cứu để xác nhận liệu kháng thể O TWN 97-R mà kích hoạt đáp ứng miễn dịch bẩm sinh và đáp ứng miễn dịch tế bào, có thực sự thể hiện hiệu quả bảo vệ khi tiêm virus FMD được thể hiện trên FIG.9. Đầu tiên, nhằm xác định

khoảng thời gian tiêm vacxin của kháng nguyên, 2 μ g kháng nguyên được tiêm vào trong màng bụng của chuột, chuột nhiễm virus ở 1, 3, 5, và 7 dpi, và sau đó tỷ lệ sống và sự thay đổi trọng lượng cơ thể được theo dõi cho đến 7 ngày sau thử thách (day post challenge - dpc). Sau đó, nhằm xác nhận đáp ứng đặc hiệu theo liều, 2, 5, và 10 μ g kháng nguyên được tiêm theo cùng cách thức, chuột nhiễm virus ở 5 dpi, và tỷ lệ sống và thay đổi trọng lượng cơ thể được theo dõi cho đến 7 dpc.

Kết quả là, nhóm 5 dpi cho thấy tỷ lệ bảo vệ 40%, trong khi nhóm với liều lượng tăng đến 5, 10 μ g cho thấy tỷ lệ sống 100% mà không giảm trọng lượng (FIG.10).

5-2. Trong việc bảo vệ vật chủ khỏi bị nhiễm bệnh lở mồm long móng, đã cố gắng để xác nhận rằng tế bào nào trong số DCs và M Φ s là quan trọng, hoặc xytokin nào thể hiện hiệu quả quan trọng (FIG.11).

Các kháng thể được sử dụng để làm suy yếu tế bào hoặc trung hoà xytokin, và các kháng thể được tiêm 24 giờ sau, sau đó là nhiễm virus 5 ngày sau (5 dpi) để xác nhận hiệu suất bảo vệ. Kết quả được xác nhận rằng IL-23p19, TNF α và IL-10 đóng vai trò quan trọng. Tất cả chuột chết vào ngày 5 (5 dpc) trong nhóm được dùng kháng thể chống lại xytokin gây viêm IL-23p19, và tất cả chuột chết vào ngày 6 (6 dpc) trong nhóm được dùng kháng thể TNF α , trong khi nhóm được dùng kháng thể kháng xytokin kháng viêm IL 10 thể hiện tỷ lệ sống 100% và không có sự giảm trọng lượng nào được quan sát thấy. Trong các thử nghiệm trung hoà xytokin tạo bởi kháng nguyên, liên quan đến IL-23, TNF α , IL-1 β , IL-6 và IL-10 được định dạng là quan trọng trong việc bảo vệ vật chủ khỏi sự tấn công của virus bệnh lở mồm long móng trong thí nghiệm, hiệu quả bảo vệ bởi các xytokin này, tương ứng, được xác nhận. Đầu tiên, mỗi xytokin được tiêm trong màng bụng chuột với lượng 5 μ g/100 μ L PBS và và chuột nhiễm O VET (ME-SA) 6 giờ sau đó, tiếp theo theo dõi tỷ lệ sống và thay đổi trọng lượng cơ thể cho đến 7 dpc. Mặt khác, nhóm đối chứng âm được dùng 100 μ L PBS theo cùng cách thức được dùng để so sánh. Kết quả là, sau khi tiêm IL-23, xác nhận rằng tỷ lệ sống ở chuột trong nhóm nhiễm virus bệnh lở mồm long móng là 100% để chứng minh sự bảo vệ hoàn toàn. Ngoài ra, không có sự thay đổi trọng lượng cơ thể nào quan sát thấy so với trước khi nhiễm virus.

Trong trường hợp của các nhóm xử lý IL-1 α và TNF α , tỷ lệ sống là thấp. Ngoài ra, mặc dù trọng lượng cơ thể giảm khoảng 30%, sự chết có xu hướng được trì hoãn. Mặt khác, trong trường hợp của các nhóm xử lý IL-6 và IL-10, chuột chết ở giai đoạn sớm khi nhiễm virus để chứng minh rằng không có hiệu quả bảo vệ.

Từ kết quả nêu trên, xem xét rằng xytokin IL-23 đóng vai trò quan trọng nhất trong việc bảo vệ vật chủ khỏi bị tấn công bởi virus bệnh lở mồm long móng. IL-1 α và TNF α cũng yếu hơn so với IL-23, nhưng chúng được xác định là đóng góp một phần trong việc bảo vệ vật chủ khi bắt đầu nhiễm virus.

Mặt khác, trong trường hợp IL-10 là xytokin chống viêm, IL-10 và kháng nguyên được tiêm đồng thời ở 5 μ g cũng như tiêm một mình IL-10, nhằm so sánh tỷ lệ sống và sự thay đổi trọng lượng cơ thể giữa chúng.

Nhằm ngăn chặn IL-23, IL-1 α , IL-6 và TNF α , mà được biểu hiện ở mức độ cao bởi kháng nguyên, mỗi xytokin trong số các xytokin này được trung hoà với kháng thể đơn dòng đặc hiệu ở chuột, và IL-10 và kháng nguyên được tiêm đồng thời sau khi nhiễm virus vào 24 giờ. Kháng thể kiểm soát isotyp cho mỗi kháng thể được tiêm và sử dụng làm nhóm đối chứng để so sánh. Kết quả là, tương tự với nhóm xử lý IL-10, tỷ lệ sống giảm xuống 20% vào ngày 4 sau khi nhiễm virus bệnh lở mồm long móng (4 dpc), tất cả động vật chết vào ngày 6 (6 dpc), và sự thay đổi trọng lượng cơ thể giảm xuống khoảng 30%. Vì vậy, dường như IL-10 đã ức chế đáp ứng miễn dịch trong vật chủ ở giai đoạn sớm khi nhiễm virus bệnh lở mồm long móng, do đó làm tăng tính nhạy cảm với virus, vì vậy làm suy giảm khả năng bảo vệ vật chủ.

Từ các kết quả trên đây, tin rằng nếu biểu hiện của IL-23 là xytokin gây viêm có thể giảm đi ở giai đoạn sớm khi nhiễm virus bệnh lở mồm long móng trong khi ức chế sự sản xuất IL-10, đáp ứng miễn dịch tế bào *in vivo* có thể được kích hoạt, do đó bảo vệ vật chủ hiệu quả hơn.

Ngoài ra, nhằm xác nhận rằng liệu IL-23 có thể hiện hoạt động kích thích miễn dịch như chất bổ trợ không (chất bổ trợ vacxin), 2,5 μ g IL-23 được dùng kết hợp với lượng kháng nguyên giống vậy.

Kết quả là, chuột trong nhóm dùng 2,5 μ g kháng nguyên độc lập cho thấy tỷ lệ sống 40%, trong khi nhóm được dùng IL-23 và kháng nguyên cùng nhau có tỷ lệ sống 80% hoặc hơn, và giảm trọng lượng không đáng kể vào ngày 2 đến 3 (2 dpc) và sau đó có xu hướng phục hồi trở lại. Vì vậy, xác nhận được rằng hiệu quả bảo vệ khi nhiễm virus bệnh lở mồm long móng được cải thiện bởi hiệu quả bổ trợ của IL-23.

Mặt khác, nhằm xác nhận liệu DCs và M Φ s kích thích bởi kháng nguyên có thực sự đóng vai trò quan trọng trong việc bảo vệ vật chủ khi bắt đầu nhiễm virus bệnh lở mồm long móng không, DCs và M Φ s được kích hoạt được tách và ghép vào chuột chưa

thí nghiệm 6 giờ sau khi dùng kháng nguyên, sau đó nhiễm virus 1 giờ sau. Sau đó, tỷ lệ sống và thay đổi trọng lượng cơ thể được quan sát cho đến 7 dpc.

Kết quả là, xác nhận rằng tất cả chuột sống 100% trong nhóm ghép DCs và MΦs, và không có sự thay đổi trọng lượng cơ thể nào quan sát được (FIG.12A và 12B).

Từ các kết quả nêu trên, mong muốn rằng sự kích thích DCs và MΦs bởi các kháng nguyên kích thích sự tiết các cytokin gây viêm, các chemokine và các phân tử đồng kích thích từ các tế bào này khi bắt đầu nhiễm virus bệnh lở mồm long móng, và đóng vai trò quan trọng trong việc bảo vệ vật chủ bằng cách đưa ra kháng nguyên tới tế bào T.

Các kết quả của sự biểu hiện thử nghiệm của các phân tử đồng kích thích qua trung gian kháng nguyên ở DCs như dưới đây (FIG.13). Là kết quả của biểu hiện thử nghiệm của CD40, CD80 và CD86 sau khi xử lý với kháng nguyên độc lập hoặc thêm Các phối tử PRR vào kháng nguyên làm chất bổ trợ, sự biểu hiện mạnh được quan sát thấy ở các nhóm xử lý khi thêm vào R848, Zymosan, TDB và c-di-GMP, tương ứng. Vì vậy, mặc dù DCs được kích thích với kháng nguyên độc lập để tăng biểu hiện của các phân tử đồng kích thích, mong muốn rằng việc sử dụng Các phối tử PRR làm chất bổ trợ cho xử lý có thể kích thích DCs mạnh hơn, do đó đưa ra kháng nguyên tới tế bào T hiệu quả.

Trước đó, sự thay đổi trong các cytokin có nguồn gốc từ O TWN 97-R Ag được quan sát thấy ở DCs và MΦs. Nhằm khảo sát hiệu quả Các phối tử PRR nào bắt đầu biểu hiện các cytokin này, DCs và MΦs được tách từ PECs của chuột chưa thí nghiệm và xử lý với O TWN 97-R Ag. Sau đó, 6 giờ sau khi xử lý, tế bào được lấy mẫu và ARN được chuẩn bị, sau đó là xác nhận mức độ biểu hiện gen của các phối tử PRR thông qua qRT-PCR.

Bởi vậy, như thể hiện trên FIG.14, biểu hiện của *dectin1*, *dectin2*, *tlr7*, và *tlr8*, v.v. cao ở DCs, trong khi biểu hiện của *mincle* và *sting* cao ở MΦs, và biểu hiện của *tlr2*, *tlr4*, *nlrp3*, v.v. cũng tương đối cao. Khi nhìn vào toàn bộ mức độ biểu hiện gen ở DCs và MΦs, mức độ biểu hiện gen Các phối tử PRR cao theo thứ tự *dectin1* > *mincle* > *dectin2* > *tlr7* > *sting* > *tlr8*.

Từ kết quả nêu trên, có thể hiểu rằng O TWN 97-R Ag kích thích đồng thời Các phối tử PRR nội tại tế bào như *tlr7*, *tlr8*, *sting*, v.v., cũng như Các phối tử PRR ngoài tế bào như *dectin1*, *dectin2*, *mincle*, v.v., do đó khuếch đại đáp ứng miễn dịch bẩm sinh ở

APCs như DCs và MΦs, và đáp ứng miễn dịch tế bào. Ngoài ra, quá trình biệt hoá các tế bào Th thành các tế bào Th1, Th2 hoặc Th17 có thể được thúc đẩy, từ đó cuối cùng góp phần vào việc kích hoạt tế bào T. Do đó, mong muốn rằng chất nêu trên có thể tạo ra đáp ứng miễn dịch tế bào và đóng vai trò quyết định trong việc bảo vệ vật chủ ở giai đoạn sớm khi nhiễm virus bệnh lở mồm long móng.

Ví dụ 1: Sàng lọc các ứng viên chất bổ trợ thông qua đánh giá hiệu quả trên chuột

1-1. Tiềm năng của các phối tử PRR và xytokin làm chất bổ trợ vacxin và phân tích hiệu quả ghi nhớ

Nhằm đánh giá tiềm năng của các phối tử PRR và xytokin tái tổ hợp làm chất bổ trợ vacxin và hiệu quả ghi nhớ đối với sự nhiễm virus bệnh lở mồm long móng, các vật liệu theo Bảng 1 được thể hiện trên FIG.15.

Bảng 1

Thiết kế thử nghiệm để đánh giá tính bổ trợ qua trung gian các phối tử PRR và xytokin trên chuột

Nhóm	Kết hợp vacxin	Chất bổ trợ	Liều lượng
		Các phối tử PRR hoặc xytokin	
NC	-	-	-
PC	O TWN 97-R	-	-
Chất bổ trợ	11,7ng (1/1280 liều lượng sử dụng cho trâu bò hoặc lợn của O TWN 97 R Ag ⁺ ISA 206 (50%, trọng lượng/trọng lượng) +10%Al(OH) ₃ +15 µgQuil-A®	R848 (TLR-7/8)	100 µg
		Curdlan (Dectin-1)	45 µg
		Zymosan (Dectin-2/TLR-2)	50 µg
		Furfurman (Dectin-2)	50 µg
		TDB (Mincle)	50 µg
		c-di-GMP (Sting)	50 µg
		MDP (NOD-2)	30 µg
		MPLA-SM (TLR-4)	20 µg
		Chitosan (NLRP3 inflammasome inducer, MR)	100 µg
		rmIL-23	5 µg
		rmIFNα	2,5x10 ⁶ IU
		Poly(I:C) (TLR-3/MDA-5)+c-di-GMP (Sting)	50 µg+50 µg
		Poly(dA:dT) (chất đồng vận RIG-I/CDS)+c-di-GMP (Sting)	25 µg+50 µg
		R848 (TLR-7/8)+Zymosan (Dectin-2/TLR-2)	50 µg+25 µg

	R848 (TLR-7/8)+Furfuman (Dectin-2)	50 µg+25 µg
	R848 (TLR-7/8)+TDB (Mincle)	50 µg+25 µg
	Zymosan (Dectin-2/TLR-2)+TDB (Mincle)	25 µg+25 µg
	Furfuman (Dectin-2)+TDB (Mincle)	25 µg+25 µg
	TDB (Mincle)+c-di-GMP (Sting)	25 µg+25 µg
	MDP (NOD-2)+MPLA (TLR-4)+Curdlan (Dectin-1)	30µg+20µg+45 µg

Khi các phối tử PRR và xytokin được dùng độc lập, tỷ lệ sống cao theo thứ tự $IFN\alpha > IL-23 > c\text{-}di\text{-}GMP$ nhóm dùng, như thể hiện trên FIG.16(A). Ngoài ra, trong trường hợp của $IFN\alpha$ trong việc thay đổi trọng lượng cơ thể theo FIG.16(B), không có sự thay đổi trọng lượng cơ thể đáng kể nào được quan sát thấy. Ngoài ra, FIG.16(C) cho thấy tỷ lệ sống khi dùng kết hợp với các phối tử PRR.

Tỷ lệ sống cao theo thứ tự $R848+TDB > TDB+c\text{-}di\text{-}GMP > Furfurman+TDB$, trong khi chỉ quan sát thấy sự giảm trọng lượng trong phạm vi nhỏ hơn 20% về sự thay đổi trọng lượng (FIG.16(D)).

Từ các kết quả nêu trên, có thể thấy rằng, khi dùng kết hợp với xytokin so với khi dùng các phối tử PRR độc lập, chuột được bảo vệ hiệu quả hơn khỏi việc nhiễm virus bệnh lở mồm long móng. Cụ thể, các sự kết hợp của TLR-7/8, Mincle, Dectin-2, Sting, v.v. được xác định là có tiềm năng cao hơn làm các chất bổ trợ vaccin.

1-2. Đáp ứng miễn dịch qua trung gian các phối tử PRR và xytokin ở chuột

Nhằm đánh giá tiềm năng của các phối tử PRR và xytokin tái tổ hợp làm chất bổ trợ vaccin và hiệu quả ghi nhớ trên việc nhiễm virus bệnh lở mồm long móng, thí nghiệm được thực hiện theo chiến lược thể hiện trên FIG.17. Kháng nguyên bệnh lở mồm long móng được sử dụng ở đây là O TWN 97-R, và chế phẩm vaccin của nhóm đối chứng dương (positive control (PC)) là như sau; O TNW 97-R Ag (15 µg/liều/ml, 1/160 liều), ISA 206 (50%, trọng lượng/trọng lượng), 10% $Al(OH)_3$, 15 µg/mỗi chuột Quil-A.

Chuột được tiêm vaccin lần thứ nhất qua tiêm bắp (intramuscular inoculation (I. M.)) vào 0 ngày sau tiêm vaccin (days post vaccination (dpv)), sau đó là tiêm vaccin lần thứ hai (tiêm nhắc) 28 ngày sau (28 ngày sau tiêm vaccin, dpv). Sau đó, vào ngày 56 (56 ngày sau tiêm vaccin, dpv), virus bệnh lở mồm long móng (100LD₅₀ của O VET 2013, loại huyết thanh ME-SA) được đưa vào trong phúc mạc của chuột, sau đó theo dõi tỷ lệ sống và thay đổi trọng lượng cơ thể cho đến 7 ngày (ngày sau thử thách - dpc).

Ngoài ra, nhằm xác nhận khả năng tạo ra đáp ứng miễn dịch tế bào và dịch thể, huyết thanh và tế bào dịch tiết phúc mạc (peritoneal exudate cells (PECs)) từ chuột được lấy mẫu vào 0, 28, và 56 dpv, mà lần lượt được sử dụng trong phân tích như SP ELISA và hàm lượng trung hòa virus (hàm lượng VN, các kháng thể trung hòa).

Kết quả của thí nghiệm, như thể hiện trên FIG.18A, các nhóm được dùng IFN α , IFN γ +IL-2+TNF α , IL-15+IL-18, TDB+c-di-GMP và R848+c-di-GMP vào 28 dpv cho thấy hàm lượng kháng thể tăng đáng kể so với nhóm đối chứng. Ngoài ra, vào 56 dpv, hàm lượng kháng thể cao hơn đáng kể ở tất cả các nhóm dùng chất bổ trợ xytokin và các phối tử PRR. Cụ thể, trong trường hợp của IFN α , hàm lượng kháng thể được duy trì ở mức độ cao cho đến 56 dpv. Trong trường hợp của nhóm được dùng IL-23, mà có đáp ứng miễn dịch tế bào tăng mạnh ở thí nghiệm trước, hàm lượng kháng thể cũng được quan sát thấy là cao, do đó chỉ ra rằng đáp ứng miễn dịch dịch thể có thể được tạo ra một cách hiệu quả.

Trong khi đó, kể cả trong trường hợp của nhóm dùng IFN γ +IL-2+TNF α , có liên quan đến hoạt động tế bào T và đáp ứng miễn dịch tế bào và dịch thể qua trung gian tế bào T, hàm lượng kháng thể giữ cao ổn định sau 28 dpv, trong khi nhóm được dùng IL-15+IL-18 liên quan đến miễn dịch niêm mạc làm chất bổ trợ cũng cho thấy hàm lượng kháng thể cao. Ngoài ra, khi HSP70 được biết là có liên quan đến miễn dịch dài hạn được dùng, quan sát thấy rằng hàm lượng kháng thể tăng tương đối đến mức độ cao mặc dù nó hơi thấp hơn so với các nhóm được dùng chất bổ trợ khác. Ngoài ra, trong trường hợp của các nhóm dùng các phối tử PRR, hàm lượng kháng thể cao cho thấy ở tất cả các nhóm.

Nhằm quan sát sự thay đổi trọng lượng cơ thể do bản thân việc tiêm vaccin, sự thay đổi trọng lượng cơ thể được theo dõi một lần một tuần trong 8 tuần (56 dpv) sau khi tiêm vaccin (FIG.18B). Kết quả là, nhóm được dùng hỗn hợp IFN γ +IL-2+TNF α giảm cân nhẹ vào 7 dpv, tuy nhiên, không có khác biệt đáng kể nào. Ngoài ra, kết quả này được ước đoán vì liều xytokin tái tổ hợp tăng nhẹ (tổng 15 μ g) so với liều của các nhóm khác (tổng 5 đến 10 μ g).

Vào ngày 56 sau khi tiêm vaccin (56 dpv), kết quả của việc quan sát tỷ lệ sống (FIG.18C) và sự thay đổi trọng lượng cơ thể (body weight (BW)) (FIG.18D) sau khi nhiễm O VET 2013, chuột ở nhóm đối chứng âm chết 100% vào ngày 4, trong khi chuột ở nhóm đối chứng dương cho thấy xu hướng sống 40%. Mặt khác, chuột trong nhóm

được dùng chất bổ trợ Các phối tử PRR và xytokin sống sót 100%, trong khi quan sát thấy không có sự giảm cân.

Vì vậy, khi các xytokin và các phối tử PRR được dùng làm chất bổ trợ, mong muốn rằng cả đáp ứng miễn dịch tế bào và đáp ứng miễn dịch dịch thể tạo ra từ vaccin đều được tạo ra một cách hiệu quả để đóng góp đáng kể vào việc bảo vệ vật chủ.

Nhằm quan sát sự tạo ra đáp ứng miễn dịch tế bào và dịch thể bởi xytokin và các phối tử PRR, sự mở rộng các tế bào liên quan đến các đáp ứng miễn dịch này được phân tích bởi FACS. Trên FIG.19A, số lượng tế bào T $CD3^+CD4^+$ được xác nhận, và sự mở rộng tế bào được quan sát thấy ở các nhóm mà $IFN\alpha$, HSP70, R848+TDB, TDB+c-di-GMP, v.v. được thêm vào. FIG.19B cho thấy quần thể tế bào T $CD3^+CD8^+$. So sánh với tế bào T $CD4^+$, tổng số tế bào xuất hiện thấp hơn, và nhóm được xử lý qua $IFN\alpha$ thể hiện sự đáng kể vào 28 dpv.

Trên FIG.19C, sự mở rộng tế bào T $CD4^+CD8^+$ được xác nhận. Vào 28 dpv, tất cả các nhóm bổ sung xytokin và các phối tử PRR trừ HSP70 cho thấy sự tăng đáng kể ở số lượng tế bào trong khi có xu hướng giảm số lượng đáng kể vào 56 dpv. Kết quả của việc quan sát mở rộng tế bào T $CD44^{cao}CD62^{thấp}$, mà được biết là dấu hiệu của tế bào T nhớ (FIG.19D), quần thể tăng nhanh vào 56 dpv so với 28 dpv. Ngoài ra, Các phối tử PRR tạo ra mở rộng tế bào T đáng kể hơn so với xytokin vào 28 dpv, trong khi số lượng tế bào được tăng lên ở tất cả các nhóm được bổ sung chất bổ trợ vào 56 dpv. Vì vậy, các chất bổ trợ được mong muốn tạo ra một cách hiệu quả các tế bào T nhớ để thúc đẩy kích thích đáp ứng miễn dịch tế bào và dịch thể.

Trên FIG.19E, sự biểu hiện của tế bào $\gamma\delta$ T $CD44^{cao}CD27^{thấp}$, mà là các tế bào $\gamma\delta$ T nhớ, quan sát được. Được biết rằng khoảng 5% tế bào $\gamma\delta$ T tồn tại ở chuột, nhưng số lượng các tế bào này được tăng lên đến khoảng 8 đến 10% do sự bổ sung chất bổ trợ trong khi không có khác biệt đáng kể giữa 28 và 56 dpv quan sát được. Vì vậy, có thể thấy rằng sự bổ sung chất bổ trợ có thể hiệu quả không chỉ để tạo ra đáp ứng miễn dịch tế bào ban đầu mà còn tạo ra đáp ứng miễn dịch tế bào trung hạn và dài hạn.

FIG.19F cho thấy sự mở rộng tế bào B nhớ (tế bào B $CD3^-CD44^+CD27^+$). Vào 28 dpv, IL-23, R848+TDB, TDB+c-di-GMP cho thấy sự tăng đáng kể số lượng tế bào, và số lượng tế bào thường tăng vào 56 dpv so với vào 28 dpv, và tế bào B nhớ ở tất cả các nhóm được bổ sung xytokin và các phối tử PRR được xác nhận là mở rộng một cách đáng kể. Cụ thể, các nhóm được bổ sung IL-23, $IFN\gamma$ +IL-2+ $TNF\alpha$, IL-15+IL-18,

R848+TDB và R848+c-di-GMP cho thấy mức ý nghĩa $p < 0,001$ hoặc nhỏ hơn.

FIG.19G cho thấy các kết quả xác nhận sự mở rộng các tế bào CD3-CD335 (NKp46)⁺CD27⁺ được biết là các tế bào NK giống như. Cụ thể, nhóm được dùng IFN α cho thấy số lượng tế bào cao đáng kể, và được xem xét từ kết quả rằng IFN α xuất hiện để kích thích một cách hiệu quả các tế bào NK liên quan đến đáp ứng miễn dịch bẩm sinh, và hiệu quả tốt trong việc tạo ra đáp ứng nhớ có thể đạt được.

1-3. Tiềm năng của xytokin làm chất bổ trợ và hiệu quả bảo vệ khi nhiễm virus bệnh lở mồm long móng bởi các loại huyết thanh khác nhau ở chuột

Nhằm quan sát tiềm năng của xytokin, cụ thể, IFN α và IL-23 làm các chất bổ trợ vacxin, đáp ứng nhớ, và hiệu quả bảo vệ khi nhiễm virus bệnh lở mồm long móng bởi các loại huyết thanh khác nhau, thí nghiệm trên động vật như thể hiện trên FIG.20 được thực hiện.

Để xác nhận hiệu quả nêu trên, O VET (O Vet 2013), O JC (O Jincheon 2014), A Malay (A Malay 97), Asia Shamir-R (bản sao tái tổ hợp toàn bộ bộ gen của Asia1 Shamir) và nhóm PC được tiêm với chỉ chất tăng cường miễn dịch dạng dầu ISA 206, và NC là nhóm đối chứng âm.

Kết quả của thí nghiệm là nhóm được dùng cả IFN α và IL-23 làm chất bổ trợ thể hiện sự bảo vệ hoàn toàn chống lại sự tấn công của O VET2013, O JC, A Malay 97, và Asia1 Shamir, trong khi sự thay đổi trọng lượng cơ thể giảm rất ít so với trước khi bị virus tấn công (FIG.21).

Vì vậy, chức năng ghi nhớ của IFN α và IL-23 *in vivo* đã được xác nhận, và mong muốn rằng các chất nêu trên có thể bảo vệ vật chủ một cách hiệu quả chống lại sự tấn công của virus bệnh lở mồm long móng bởi các loại huyết thanh không phụ thuộc vào tính đặc hiệu giữa kháng nguyên-virus có trong vacxin.

Ví dụ 2: Đánh giá hoạt động của ứng viên chất bổ trợ theo loài gia súc

Dựa trên kết quả thí nghiệm liên quan đến chuột nêu trên, các thí nghiệm được thực hiện sử dụng chế phẩm bổ trợ theo Bảng 2 dưới đây để quan sát sự tăng sinh tế bào và gây độc tế bào qua trung gian các phối tử PRR, HSP70 và xytokin ở các tế bào miễn dịch bò và lợn.

Bảng 2

Nhóm	Chất bổ trợ	Liều lượng (µg/ml)	Nhóm	Chất bổ trợ	Liều lượng (µg/ml)
1	Con		13	Poly(I:C)(TLR-3)+c-di-GMP (Sting)	(5 µg+2 µg)/ml
2	R848 (TLR-7/8)	10 µg/ml	14	Poly (dA:dT) (chất đồng vận RIG-I&CDS)+ c-di-GMP (Sting)	(5 µg+2 µg)/ml
3	Curdlan (Dectin-1)	100 µg/ml	15	R848(TLR-7/8)+Zymosan (Dectin-2/TLR-2)	(5 µg+5 µg)/ml
4	Zymosan (Dectin-2/TLR-2)	10 µg/ml	16	R848(TLR-7/8)+Furfuman(Dectin-2)	(5 µg+5 µg)/ml
5	Furfurman(Dectin-2)	10 µg/ml	17	R848 (TLR-7/8)+TDB (Mincle)	(5 µg+5 µg)/ml
6	TDB (Mincle)	10 µg/ml	18	Zymosan(Dectin-2/TLR-2)+TDB(Mincle)	(5 µg+5 µg)/ml
7	c-di-GMP (Sting)	4 µg/ml	19	Furfurman(Dectin-2)+TDB (Mincle)	(5 µg+5 µg)/ml
8	MDP (NOD-2)	10 µg/ml	20	TDB(Mincle)+c-di-GMP (Sting)	(5 µg+2 µg)/ml
9	MPLA-SM (TLR-4)	1 µg/ml	21	MDP (NOD-2)+MPLA-SM (TLR-4)+Curdlan (Dectin-1))	10 µg+1 µg+100 µg/ml
10	Chitosan(NLRP3 inflammasome, MR)	100 µg/ml	22	Oil (ISA206)	25%
11	Poly(I:C)	10 µg/ml	23	Gel (Alum)	10%
12	Poly(dA:dT)	10 µg/ml	24	Saponin (Quil-A)	2,5 µg/ml
			25	Oil(ISA206)+Gel(Alum)+Saponin (Quil-A)	(25%+10%+2,5µg)/ml

Phân lập PBMCs

Toàn bộ máu từ lợn và trâu bò được hiến tặng từ Animal Sanitation Laboratory ở tỉnh Gyeonggi. 15 ml máu toàn phần được thu thập bởi ống heparin BD Vacutainer (BD, Becton, Dickinson và Company, Franklin Lakes, NJ, USA), và tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMCs) thu được bằng các phương tiện của Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare Bio-Sciences Corp. , Piscataway, NJ, USA) ly tâm gradien mật độ. Các tế

bào hồng cầu còn lại được ly giải bằng cách xử lý với chất đệm ly giải ACK (Amoni-Clorua-Kali) (Gibco, Carlsbad, CA, USA).

Dung dịch được tạo huyền phù trong Ca^{2+} và Mg^{2+} (Gibco, Carlsbad, CA, USA) không Dulbecco's PBS bổ sung với 2% FBS (Gibco, Carlsbad, CA, USA), và số lượng tế bào được đếm bởi lưu lượng kế thể tích (MACSQuant Analyzer, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Tất cả các tế bào được phân lập mới ngay lập tức trước khi sử dụng trong khi các tế bào được bảo quản lạnh không được sử dụng.

PBMCs tinh chế được tạo huyền phù lại trong RPMI-1640 (Gibco, Carlsbad, CA, USA; St. Louis, Missouri) được bổ sung với 10% huyết thanh thai bò (fetal bovine serum (FBS)) (HyClone, Logan, Utah, USA), 3mM L-glutamin (Sigma-Aldrich, USA) và 100 U/ml của penicillin-streptomycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), tiếp theo là môi trường ở 37 °C dưới 5% CO_2 và sau đó kết dính của 1×10^4 tế bào mỗi giếng vào đĩa 96 giếng. Sau khi ủ trong 3 giờ, môi trường nuôi cấy được thay thế bởi môi trường không huyết thanh trước khi kích thích với các phối tử PRR khác nhau và xytokin.

Xử lý các phối tử PRR và xytokin

PBMCs lợn và bò được xử lý với phối tử PRR và xytokin được thể hiện trên Bảng 2, Sau 96 giờ, môi trường nuôi cấy tế bào (phần nổi) được thu lại, và gây độc tế bào do sự tiết axit lactic dehydrogenaza (LDH) và sự tăng sinh tế bào bằng cách kết hợp 5-bromo-2'-deoxyuridin (BrdU) quan sát thấy.

Do sự tiết LDH ở PBMCs ở lợn và bò qua trung gian các phối tử PRR và xytokin

Mức độ gây độc tế bào ở phần nổi của PBMCs ở lợn và bò đã được xử lý như được mô tả trên đây. Phân tích sự tiết LDH được thực hiện theo quy trình của nhà sản xuất sử dụng Thử nghiệm độc tính tế bào không phóng xạ CytoTox 96 (Promega).

Phần trăm tiết LDH được tính như sau: phần trăm tiết LDH = $100 \times (\text{độc độ hấp thụ của đối chứng không được xử lý} / (\text{độc độ hấp thụ của đối chứng phát xạ LDH tối đa} - \text{độc độ hấp thụ của đối chứng không hấp thụ}))$

Các tế bào được ly giải sử dụng chất đệm ly giải trong bộ kit và phần nổi từ các tế bào được xử lý qua chất đệm ly giải được sử dụng để xác định đối chứng giải phóng LDH tối đa.

Phân tích kết hợp BrdU ở PBMC ở lợn và bò

Bộ kit thử nghiệm tăng sinh tế bào BrdU (Công nghệ tín hiệu tế bào, Beverly,

MA, USA) được sử dụng để đánh giá hiệu quả của các phối tử PRR và xytokin trên sự tăng sinh PBMCs ở lợn và bò dựa trên sự kết hợp BrdU trong khi tổng hợp ADN.

10 μ M BrdU được thêm vào dung dịch nuôi cấy tế bào và ủ ở 37 °C trong 4 giờ. Các tế bào sau đó được cố định và ủ với kháng thể đơn dòng kháng BrdU ở chuột và kháng thể dê kháng chuột liên hợp với peroxidaza từ củ cải ngựa (horseradish peroxidase (HRP)). Chất nền sinh sắc tố tetrametyl benzidin được dùng để phát triển màu. Độ hấp thu được đo ở bước sóng kép 450/550 nm.

Tiêm vaccin và lấy mẫu

Thí nghiệm được thực hiện để quan sát tiềm năng của các phối tử PRR làm chất bổ trợ, sự tạo ra đáp ứng miễn dịch tế bào và dịch thể và hiệu quả miễn dịch dài hạn ở lợn và trâu bò. Là kháng nguyên bệnh lở mồm long móng, O TWN 97-R được sử dụng, và chế phẩm vaccin của nhóm đối chứng dương là như sau; O TNW 97-R Ag (15 μ g/liều/ml), ISA 206 (50%, trọng lượng/trọng lượng), 10% Al(OH)₃, 150 μ g/liều/ml Quil-A.

1 ml vaccin được dùng hai lần (0 dpv, 28 dpv) trong khoảng thời gian 28 ngày qua đường tiêm bắp sâu ở cổ động vật. Mẫu máu được thu thập vào 0, 14, 28, 42, 56, 70, 84 dpv đối với lợn, và vào 0, 14, 28, 56, 84, 112, 140, 168 dpv đối với trâu bò, tương ứng.

Các con vật được theo dõi hàng ngày về nhiệt độ cơ thể và sự thèm ăn. Các mẫu huyết thanh được lưu trữ ở -80 °C cho đến khi thử nghiệm được tiến hành.

Thử nghiệm huyết thanh học

1) ELISA (thử nghiệm hấp thụ liên kết enzym) để phát hiện các kháng thể protein cấu trúc

Nhằm phát hiện kháng thể protein cấu trúc (structural protein (SP)) trong huyết thanh, virus bệnh lở mồm long móng loại O PrioCHECK (Prionics, Switzerland) được sử dụng. Sự hấp thu của đĩa ELISA được chuyển đổi thành giá trị phần trăm ức chế (percentage of inhibition (PI)). Nếu giá trị PI lớn hơn hoặc bằng 50%, động vật được xem xét dương tính với kháng thể.

2) Thử nghiệm trung hòa virus

Thử nghiệm trung hòa virus được thực hiện theo hướng dẫn của OIE. Virus được kích hoạt bằng cách ngâm trong huyết thanh ở 56 °C trong 30 phút. Bằng cách điều chỉnh mật độ tế bào để hình thành đơn lớp 70%, đã chuẩn bị pha loãng 2 lần mẫu huyết

thanh từ 1:4 đến 1:512. Mẫu huyết thanh pha loãng được ủ ở 37 °C trong 1 giờ với 100 liều nhiễm nuôi cấy mô (tissue culture infection dose (TCID)) 50/0. 5 ml virut đồng đẳng. Sau 1 giờ, huyền phù tế bào LF-BK (thận bò) được thêm vào tất cả các giếng. Sau 2 đến 3 ngày, CPE được đo để xác định độ chuẩn mà ở đó 100TCID₅₀ virut được trung hòa bởi log 10 của pha loãng kháng thể chuẩn.

2-1. Kết quả của đánh giá phản ứng của ứng viên chất bổ trợ ở trâu bò

Kết quả xác nhận sự tiết LDH (Lactat Dehydrogenaza) để quan sát gây độc tế bào do Các phối tử PRR, xytokin, gel, saponin, v.v., lần lượt, ở PBMCs có nguồn gốc từ bò, sự gây độc tế bào của bản thân nhóm xử lý được tìm thấy là thấp. Vì vậy, không có độc tính ở nồng độ chất bổ trợ được sử dụng theo thí nghiệm này (FIG.22(A)). FIG.22(B) cho thấy kết quả quan sát gây độc tế bào sau khi xử lý với PBMCs có nguồn gốc từ bò với các phối tử PRR và xytokin, lần lượt, trộn với chất bổ trợ vacxin Dầu+Gel+Saponin. Thậm chí ở thời điểm này, gây độc tế bào do hỗn hợp chất bổ trợ không được quan sát thấy so với nhóm đối chứng.

Mặt khác, gây độc tế bào do các chất bổ trợ nêu trên không quan sát thấy thậm chí sau khi xử lý kết hợp với hỗn hợp Các phối tử PRR (FIG.22(C)). Ngoài ra, thậm chí khi các phối tử PRR được kết hợp, cũng trộn với chất bổ trợ vacxin Dầu+Gel+Saponin và sau đó được sử dụng để xử lý, gây độc tế bào không quan sát được (FIG.22(D)).

FIG.23(A) cho thấy kết quả tăng sinh tế bào quan sát được bởi sự kết hợp BrdU 96 giờ sau khi xử lý PBMCs có nguồn gốc từ bò với các phối tử PRR và xytokin, dầu, gel, saponin và Dầu+Gel+Saponin, lần lượt. Sự tăng sinh tế bào tăng lên khi tất cả các nhóm được xử lý qua các phối tử PRR so với nhóm đối chứng, và cụ thể là, được tìm thấy là hiệu quả của Curdlan, TDB, c-di-GMP, R848 và Furfurman là tốt.

Mặt khác, hiệu quả của gel và saponin không đáng kể vào 96 giờ. Ngoài ra, sau khi trộn mỗi Các phối tử PRR và xytokin với Dầu+Gel+Saponin và sử dụng hỗn hợp để xử lý, sự tăng sinh tế bào được quan sát thấy. Kết quả của thí nghiệm là sự tăng sinh tế bào tăng lên ở tất cả các phối tử PRR trộn với Dầu+Gel+Saponin so với nhóm đối chứng, mức độ của nó thấp hơn so với trường hợp khi Dầu+Gel+Saponin không được thêm vào (W/O) (FIG.23(B)).

FIG.23(C) cho thấy kết quả quan sát sự tăng sinh tế bào bằng cách kết hợp các phối tử PRR. Sự tăng sinh tế bào tăng lên ở tất cả các cách xử lý so với nhóm đối chứng, nhóm xử lý R848+TDB, Furfurman+TDB và TDB+c-di-GMP cho thấy giá trị cao hơn.

Từ kết quả này, dường như hỗn hợp các phối tử PRR này kích thích một cách hiệu quả PBMCs ở bò, từ đó tăng cường tăng sinh tế bào và kích thích đáp ứng miễn dịch. Ngoài ra, đáp ứng miễn dịch của PBMCs có nguồn gốc từ bò bởi các chất bổ trợ này cao hơn đáng kể so với PBMCs có nguồn gốc từ lợn, và do đó, dường như các tế bào miễn dịch ở bò đáp ứng nhạy hơn so với các tế bào miễn dịch ở lợn.

Trong khi đó, kết quả của sự tăng sinh tế bào quan sát được vào 96 giờ sau xử lý của PBMCs có nguồn gốc từ bò với hỗn hợp của sự kết hợp các phối tử PRR với Dầu+Gel+Saponin, mức độ tăng lên ở tất cả các nhóm xử lý với các phối tử PRR và hỗn hợp Dầu+Gel+Saponin so với nhóm đối chứng. Tuy nhiên, mức độ nêu trên thấp hơn khi không thêm vào Dầu+Gel+Saponin (W/O) (FIG.23(D)). Từ các kết quả nêu trên, mà chủ yếu là tương tự với các kết quả của các tế bào miễn dịch ở lợn, xem xét rằng, khi các tế bào miễn dịch ở bò được xử lý trực tiếp với các phối tử PRR, các tế bào được kích thích nhanh hơn khi được xử lý với cùng các phối tử đó cùng với Dầu+Saponin+Gel, do đó thúc đẩy tăng sinh tế bào và bắt đầu đáp ứng miễn dịch.

Đối với các chất ứng viên cho thấy kết quả đáng kể ở thí nghiệm sàng lọc các phối tử PRR sử dụng PBMCs từ bò, các thí nghiệm trên động vật được thực hiện với chiến lược thể hiện trên FIG.24 nhằm quan sát hiệu quả chất bổ trợ qua trung gian các phối tử PRR và đáp ứng nhớ ở gia súc nuôi trên thực tế. Đối với thí nghiệm hiện trường, gia súc 5 tháng tuổi (huyết thanh âm tính với kháng thể bệnh lở mồm long móng) được sử dụng, và gia súc được phân loại thành 3 nhóm ($n=5/\text{nhóm}$). Các con vật không được tiêm vaccin được sử dụng làm nhóm đối chứng âm, và gia súc được cách ly trong không gian hạn chế trong quá trình thí nghiệm.

Kết quả của việc xác nhận hàm lượng kháng thể (antibody (Ab)) bởi SP O ELISA, nhóm được thêm Các phối tử PRR cho thấy hàm lượng kháng thể cao hơn đáng kể vào 28 ngày sau tiêm vaccin (28 dpv) so với nhóm đối chứng. Ngoài ra, mức độ cao được duy trì cho đến 140 ngày sau khi tiêm nhắc (140 dpv) (FIG.25 (A)). Ngoài ra, kết quả của xác nhận hàm lượng trung hòa virus (virus neutralization (VN)), nhóm được thêm Các phối tử PRR cho thấy giá trị cao hơn đáng kể so với nhóm đối chứng vào 14 dpv ($p<0,01$), và mức độ rất cao ($p<0,001$) được duy trì từ đó đến 140 dpv. (FIG.25(B)).

Từ các kết quả nêu trên, khi bổ sung R848+TDB, Curdlan+c-di-GMP, v.v. làm chất bổ trợ cho vaccin, đáp ứng miễn dịch bẩm sinh và tế bào được kích thích hiệu quả, mà lần lượt tiếp tục kích thích đáp ứng miễn dịch dịch thể, do đó mong muốn là góp

phần bảo vệ vật chủ khỏi bị nhiễm virus bệnh lở mồm long móng.

2-2. Đánh giá hoạt động và độ an toàn của ứng viên chất bổ trợ ở lợn

Nhằm quan sát gây độc tế bào do Các phối tử PRR và xytokin, dầu, gel, saponin và Dầu+Gel+Saponin, tương ứng, ở PBMCs có nguồn gốc từ lợn, sự tiết LDH (Lactat Dehydrogenaza) được xác nhận. Kết quả cho thấy bản thân nhóm xử lý có tính gây độc tế bào thấp, và không có tính gây độc tế bào ở nồng độ chất bổ trợ sử dụng trong thí nghiệm này (FIG.26(A)).

FIG.26(B) cho thấy kết quả quan sát gây độc tế bào sau khi xử lý của PBMCs có nguồn gốc từ lợn với hỗn hợp Các phối tử PRR và xytokin với Dầu+Gel+Saponin là chất bổ trợ vacxin. Thậm chí ở thời điểm này, gây độc tế bào do hỗn hợp chất bổ trợ không được quan sát thấy so sánh với nhóm đối chứng.

Mặt khác, thậm chí khi gây độc tế bào được xác nhận sau khi xử lý PBMCs có nguồn gốc từ lợn với các phối tử PRR được kết hợp, gây độc tế bào do các chất bổ trợ này cũng không được quan sát thấy (FIG.26 (C)). Ngoài ra, thậm chí sau khi xử lý PBMCs có nguồn gốc từ lợn với hỗn hợp Các phối tử PRR kết hợp và chất bổ trợ vacxin là Dầu+Gel+Saponin, xu hướng tương tự được thể hiện (FIG.26(D)).

FIG.27(A) cho thấy, kết quả sự tăng sinh tế bào quan sát được do sự kết hợp BrdU ở PBMCs có nguồn gốc từ lợn vào 96 giờ sau khi xử lý PBMCs có nguồn gốc từ lợn với các phối tử PRR và xytokin, dầu, gel, saponin và Dầu+Gel+Saponin, tương ứng, sự tăng sinh tế bào tăng lên ở tất cả các nhóm được xử lý qua các phối tử PRR so với nhóm đối chứng, và cụ thể, hiệu quả của TDB và c-di-GMP được tìm thấy là tốt nhất. Mặt khác, hiệu quả của gel và saponin là không đáng kể vào 96 giờ.

Kết quả của sự tăng sinh tế bào quan sát được vào 96 giờ sau khi xử lý PBMCs có nguồn gốc từ lợn với hỗn hợp Các phối tử PRR và xytokin với Dầu+Gel+Saponin, sự tăng sinh tế bào tăng lên ở mỗi nhóm trong tất cả các nhóm được xử lý qua các phối tử PRR và hỗn hợp Dầu+Gel+Saponin so với nhóm đối chứng, tuy nhiên, mức độ của chúng thấp hơn so với khi không bổ sung Dầu+Gel+Saponin (W/O) (FIG.27(B)). FIG.27(C) cho thấy kết quả của sự tăng sinh tế bào quan sát được bởi sự kết hợp các phối tử PRR. So sánh với nhóm đối chứng, tất cả các nhóm xử lý cho thấy sự tăng lên của sự tăng sinh tế bào, cụ thể các nhóm xử lý R848+TDB, Furfurman+TDB và TDB+c-di-GMP cho thấy giá trị cao hơn. Từ các kết quả này, tin rằng kết hợp của các phối tử PRR này kích thích một cách hiệu quả PBMCs ở lợn, do đó tăng cường sự tăng sinh tế

bào và kích thích đáp ứng miễn dịch. Mặt khác, kết quả của sự tăng sinh tế bào quan sát được vào 96 giờ sau khi xử lý PBMCs có nguồn gốc từ lợn với hỗn hợp của các phối tử PRR được kết hợp với Dầu+Gel+Saponin, mức độ của nó tăng lên ở tất cả các nhóm Xử lý các phối tử PRR và hỗn hợp Dầu+Gel+Saponin so với nhóm đối chứng, nhưng thấp hơn so với khi không bổ sung Dầu+Gel+Saponin (W/O) (FIG.27(D)). Từ các kết quả trên, dường như các tế bào miễn dịch ở lợn được xử lý với các phối tử PRR độc lập mà không có bất kỳ chất hỗ trợ dầu nào (như tương dầu), các tế bào có thể được kích thích nhanh hơn so với khi được xử lý sử dụng phối tử đó cùng với Dầu+Saponin+Gel, do đó thúc đẩy phân tán tế bào và bắt đầu đáp ứng miễn dịch.

Đối với các chất ứng viên cho thấy các kết quả đáng kể trong thí nghiệm sàng lọc các phối tử PRR sử dụng PBMCs từ lợn, các thí nghiệm trên động vật được thực hiện như sau nhằm quan sát hiệu quả hỗ trợ và đáp ứng nhớ qua trung gian các phối tử PRR ở lợn nuôi trên thực tế (FIG.28). Đối với thí nghiệm hiện trường, lợn 10 tháng tuổi (huyết thanh âm tính với kháng thể bệnh lở mồm long móng) được sử dụng, và lợn được phân loại thành 4 nhóm ($n=5/\text{nhóm}$). Các con vật không được tiêm vaccin được sử dụng làm nhóm đối chứng âm, và lợn được cách ly trong không gian hạn chế trong quá trình nghiên cứu.

Nhằm xác nhận hàm lượng kháng thể bằng cách tiêm vaccin, SP O ELISA được thực hiện sử dụng huyết thanh từ lợn. Kết quả như thể hiện trên FIG.29(A), hàm lượng kháng thể tăng đáng kể ở nhóm được dùng TDB+c-di-GMP vào 14 dpv ($p<0,001$), so với nhóm đối chứng. Ngoài ra, vào 28 dpv, hàm lượng kháng thể tăng đáng kể ở mỗi nhóm trong tất cả các nhóm dùng các phối tử PRR ($p<0,001$) so với nhóm đối chứng. Cụ thể, trong trường hợp nhóm được bổ sung TDB+c-di-GMP, thấy rằng hàm lượng kháng thể ở mức độ cao hơn đáng kể so với nhóm đối chứng được liên tục duy trì cho đến 84 dpv. Hàm lượng kháng thể cao nhờ tiêm vaccin mũi thứ nhất ở lợn được hiểu là các phối tử PRR kích hoạt một cách hiệu quả đáp ứng miễn dịch bẩm sinh và tế bào và tạo ra đáp ứng miễn dịch dịch thể một cách mạnh mẽ.

Ngoài ra, tin rằng việc tiêm vaccin lần thứ hai (tiêm nhắc) vào 28 dpv có thể tạo ra “kích thích nhớ lại” của các tế bào miễn dịch được kích thích bởi lần tiêm vaccin thứ nhất, trong khi duy trì miễn dịch dài hạn. Ngoài ra, kết quả xác nhận hàm lượng VN là các nhóm được bổ sung TDB+c-di-GMP ($p<0,001$), R848+TDB ($p<0,01$) cho thấy hàm lượng VN cao hơn đáng kể so với nhóm đối chứng vào 14 dpv. Ngoài ra, vào 28 dpv, tất

cả các nhóm được bổ sung các PRR cho thấy hàm lượng VN cao hơn đáng kể so với nhóm đối chứng ($p < 0,001$). Cụ thể, nhóm được bổ sung TDB+c-di-GMP duy trì hàm lượng VN cao cho đến 84 dpv, và nhóm được bổ sung R848+TDB cho thấy hiệu quả tăng cường miễn dịch tốt từ giai đoạn sớm (14 dpv) đến trung hạn (42 dpv). Tuy nhiên, hiệu quả nêu trên sau đó cho thấy xu hướng giảm nhẹ.

Thêm vào đó, trong trường hợp của nhóm được bổ sung Furfurman+TDB, hàm lượng VN tăng chậm một chút vào 14 dpv ban đầu, nhưng hàm lượng VN cao hơn đáng kể so với nhóm đối chứng từ 28 dpv đến 84 dpv.

Nhóm được bổ sung các phối tử PRR cho thấy mức độ cao hơn đáng kể từ 14 dpv so với nhóm đối chứng, và kể cả đến 84 dpv, mức độ cao hơn đáng kể so với nhóm đối chứng được duy trì (FIG.29(B)). Từ các kết quả nêu trên, mong muốn rằng khi R848+TDB, Furfurman+TDB và TDB+c-di-GMP được bổ sung làm chất bổ trợ cho vacxin, vacxin có thể kích thích đáp ứng miễn dịch bẩm sinh và tế bào một cách hiệu quả và tiếp tục kích thích đáp ứng miễn dịch dịch thể, do đó góp phần đáng kể vào việc bảo vệ vật chủ khỏi việc nhiễm virus bệnh lở mồm long móng. Ngoài ra, mong muốn rằng sáng chế có thể hữu dụng trong việc phát triển vacxin phòng virus bệnh lở mồm long móng tới chiến lược mới.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm bổ trợ dùng cho vacxin phòng bệnh lở mồm long móng, bao gồm phối tử thụ thể nhận dạng mẫu (PRRs) dưới dạng thành phần hoạt chất,

trong đó phối tử PRRs được chọn từ bất kỳ một trong số TDB+c-di-GMP, TDB+Furfurman, R848+c-di-GMP và Curdlan+c-di-GMP,

trong đó chế phẩm bổ trợ là dùng cho gia súc hoặc lợn.

2. Chế phẩm bổ trợ theo điểm 1, trong đó phối tử PRRs được gồm trong lượng 1 đến 100 $\mu\text{g/ml}$.

3. Chế phẩm bổ trợ theo điểm 1, trong đó hai phối tử PRRs được gồm, và bất kỳ một trong số các phối tử PRRs: các phối tử PRRs còn lại được gồm theo tỷ lệ trọng lượng 1 : 1 đến 3.

4. Chế phẩm bổ trợ theo điểm 1, trong đó phối tử PRRs được gồm trong lượng 1 đến 30 $\mu\text{g/ml}$.

5. Chế phẩm vacxin cho bệnh lở mồm long móng bao gồm chế phẩm bổ trợ theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1-4.

1/42

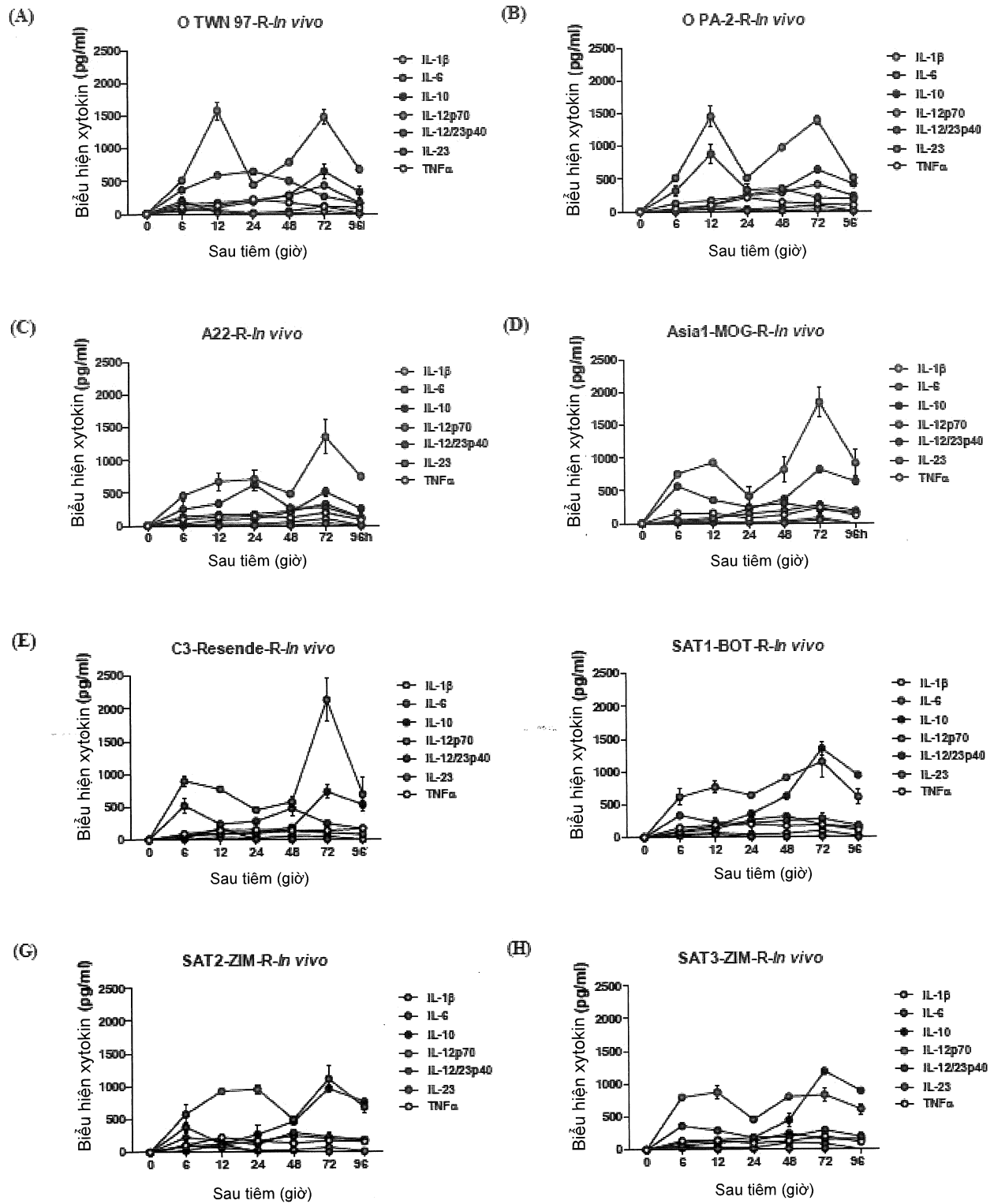


FIG. 1

2/42

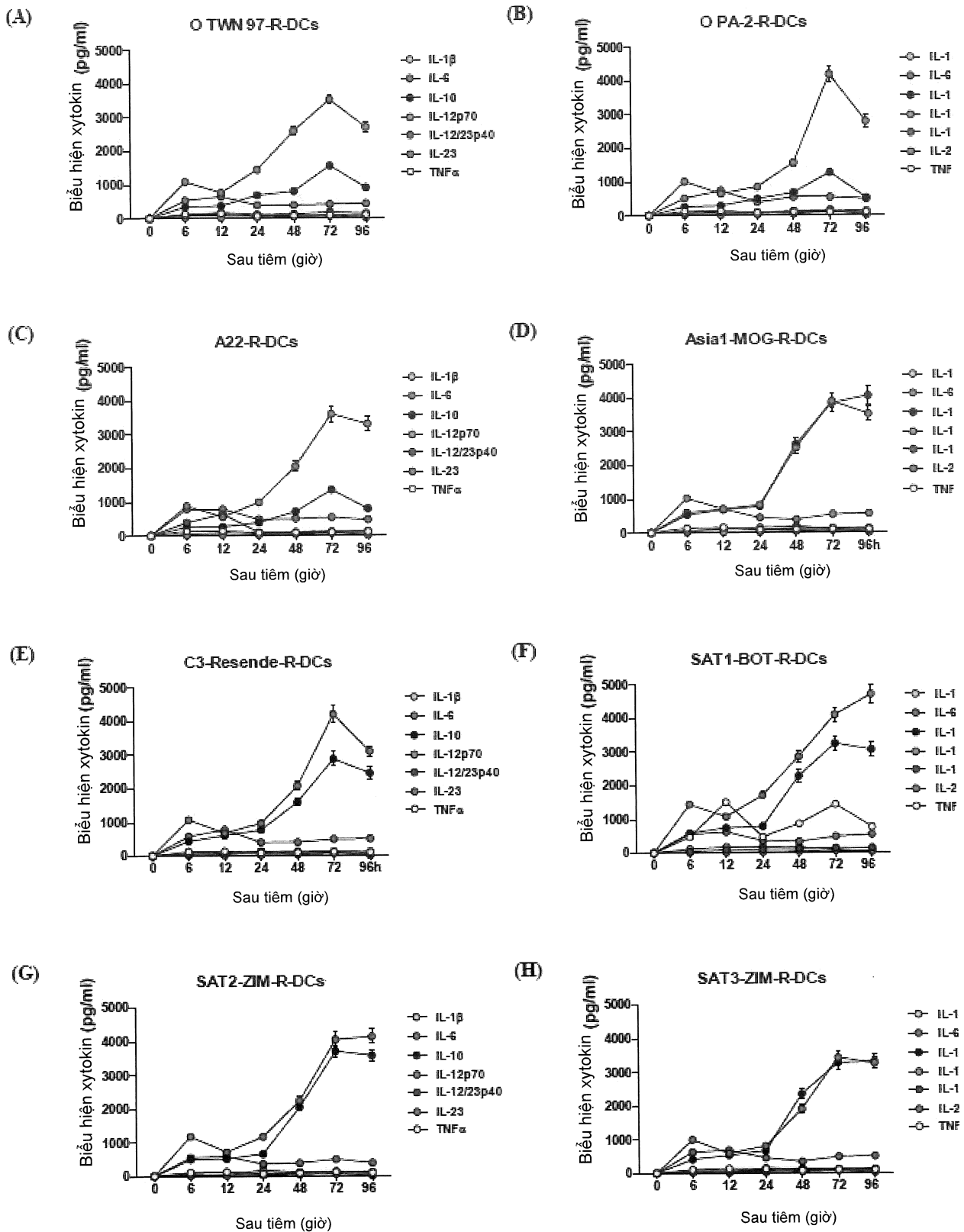


FIG. 2a

3/42

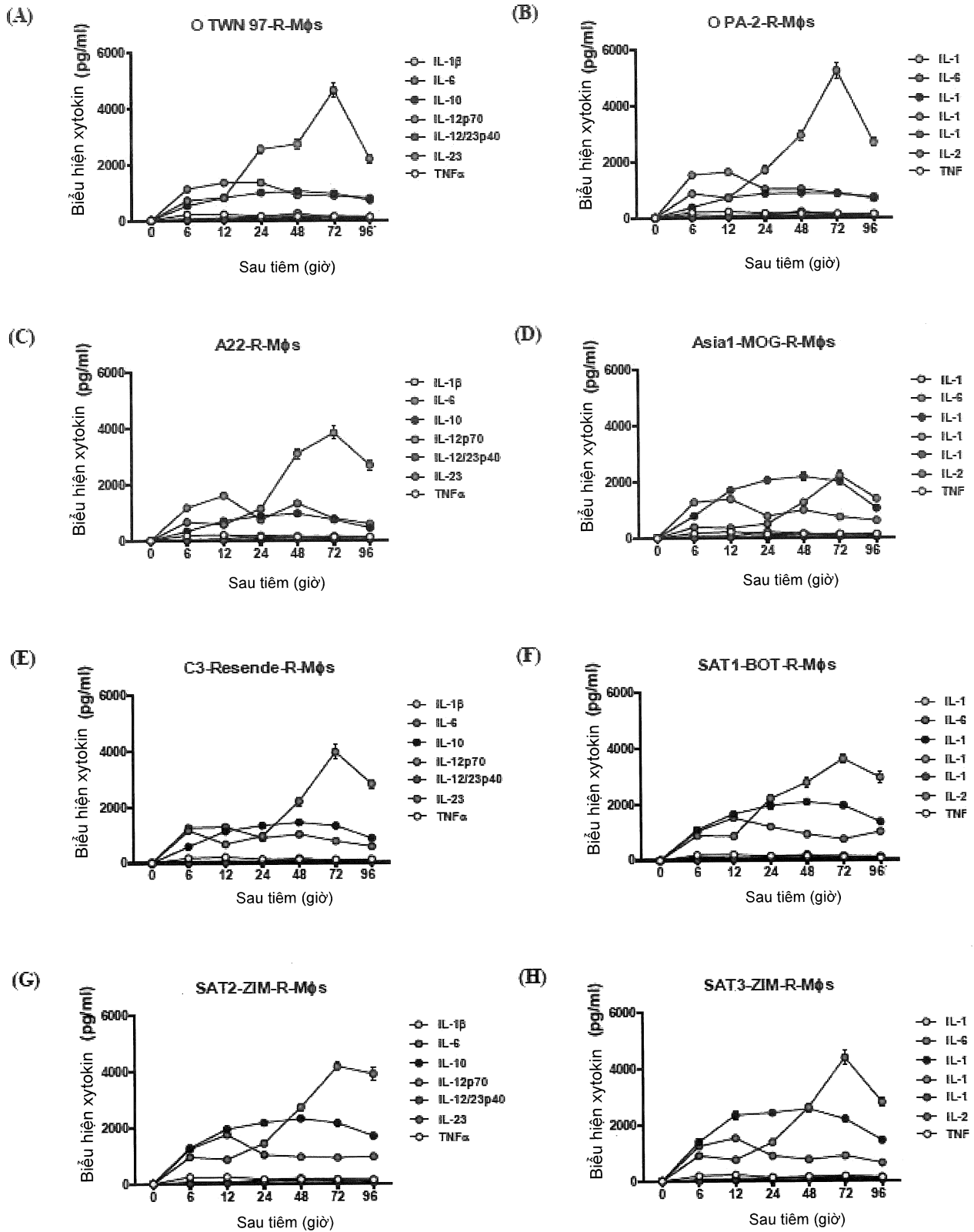


FIG. 2b

4/42

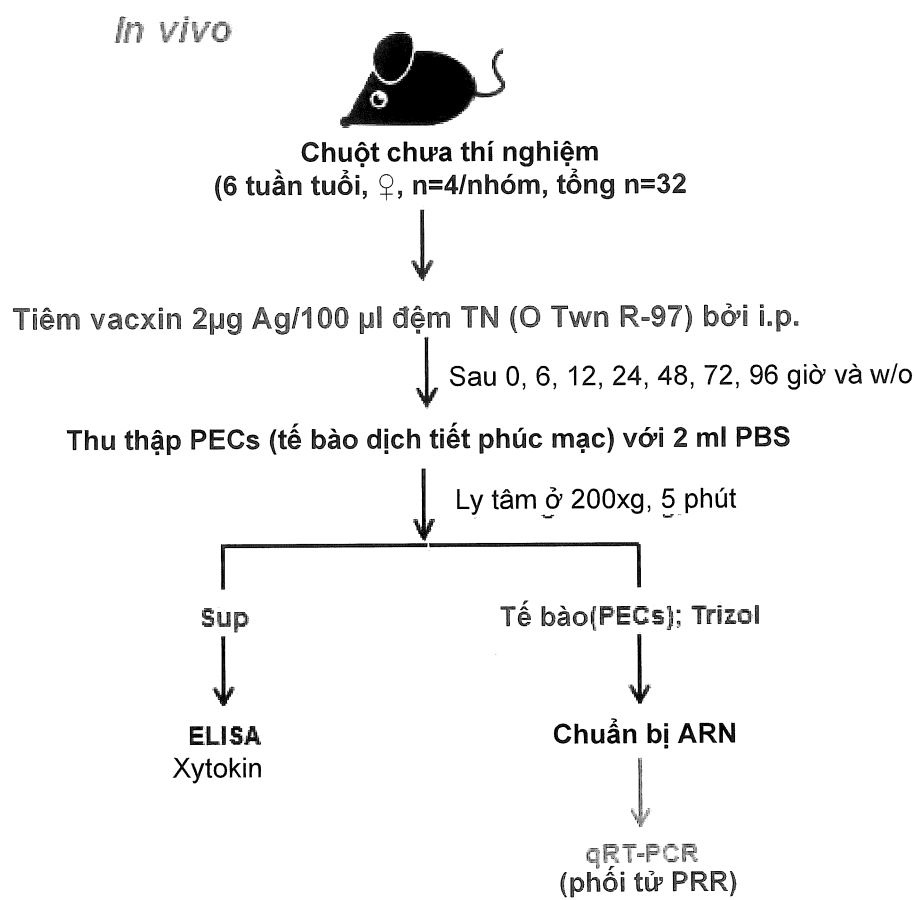


FIG. 3

5/42

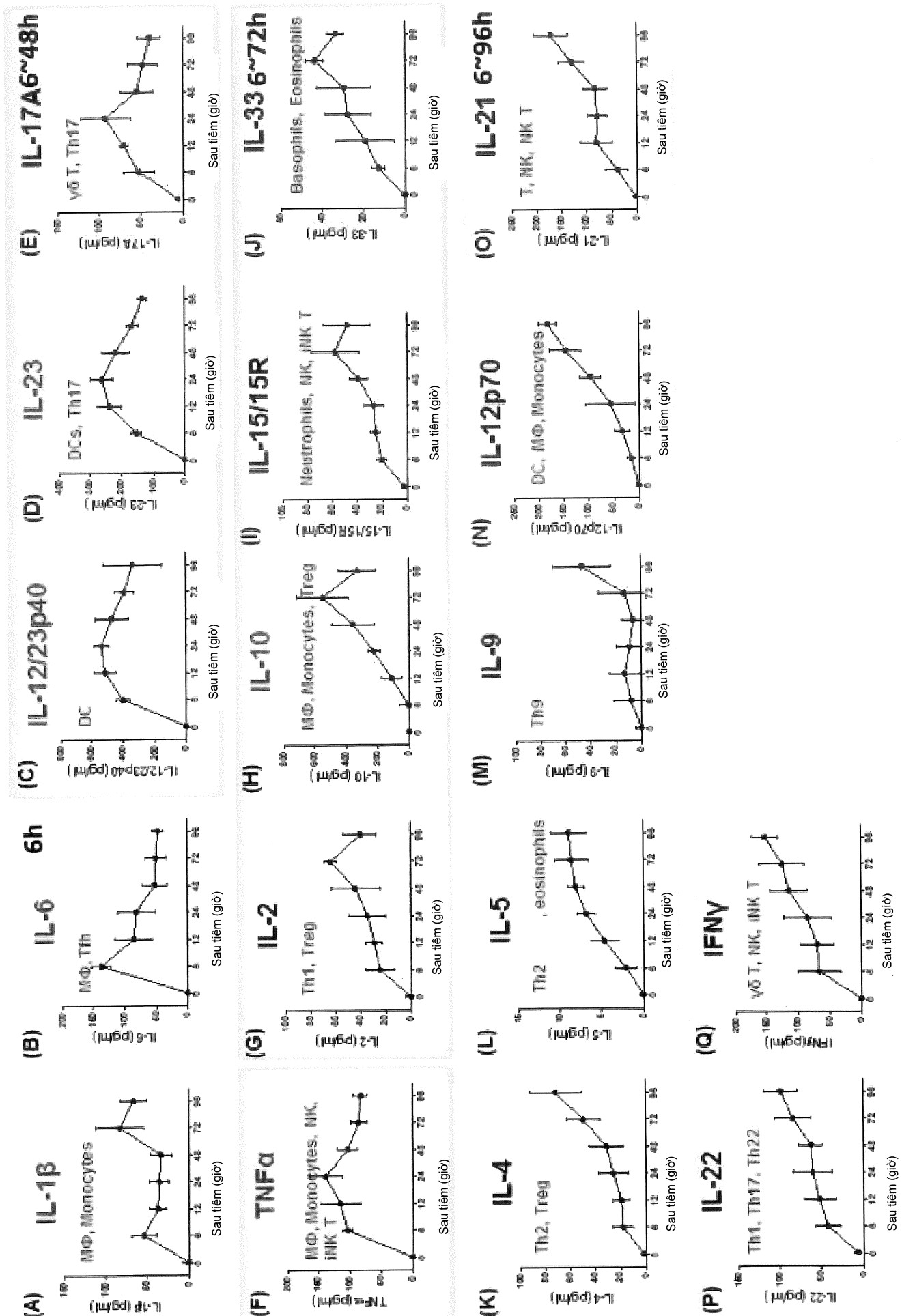
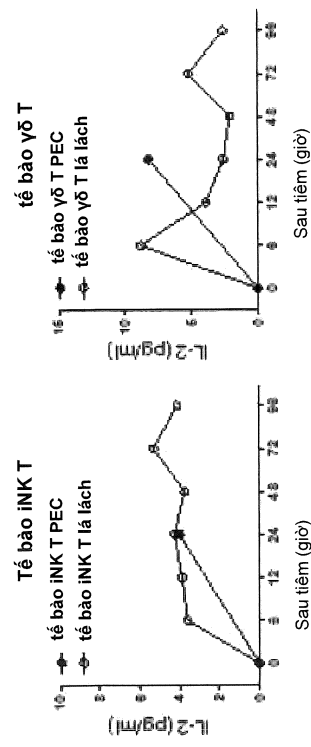


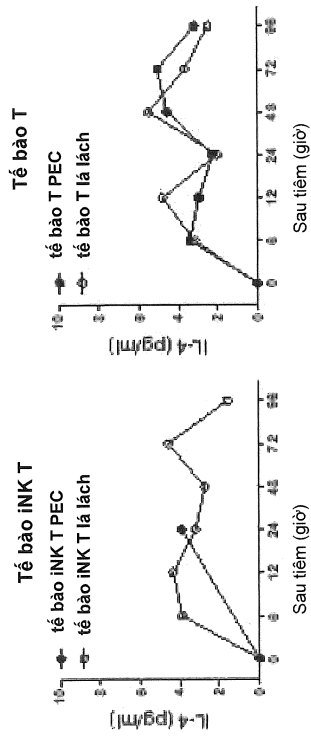
FIG. 4

FIG. 5

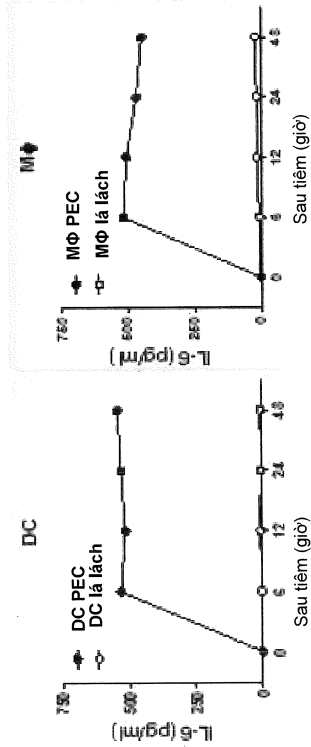
(A) IL-2 DC, MΦ: ND



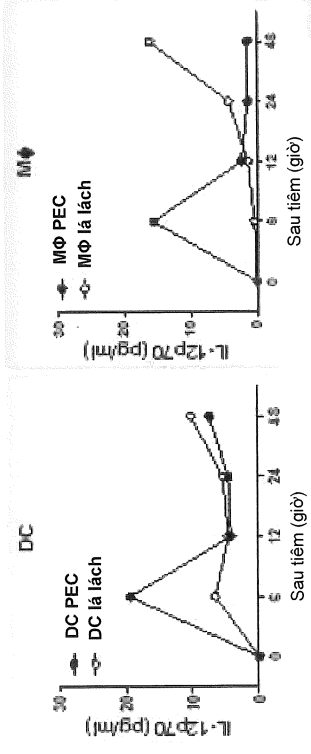
(B) IL-4 DC, MΦ, tế bào γδ T: ND



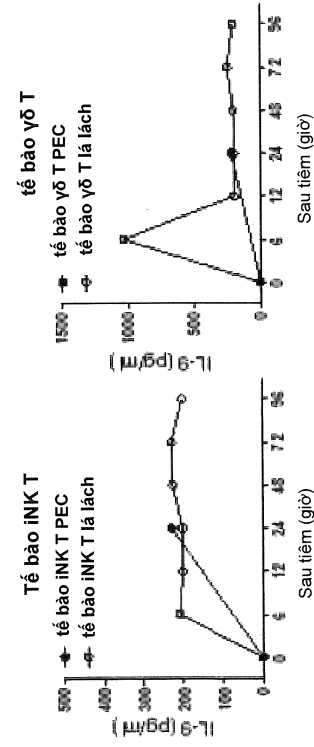
(C) IL-6 tế bào iNK T, γδ T: ND



(D) IL-12p70 tế bào iNK T, γδ T, T: ND



(E) IL-9 DC, MΦ: ND



(F) IL-12/23total p40 tế bào iNK T, γδ T, T: ND

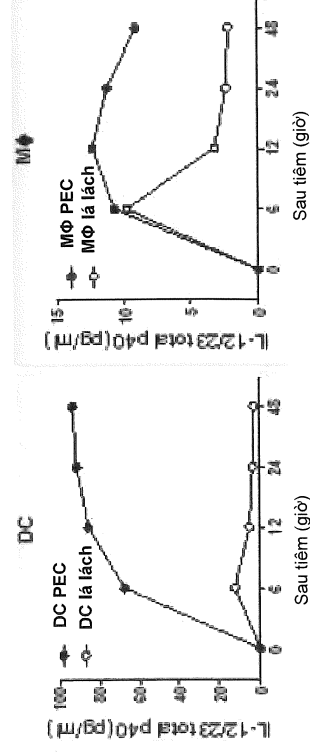


FIG. 6a

8/42

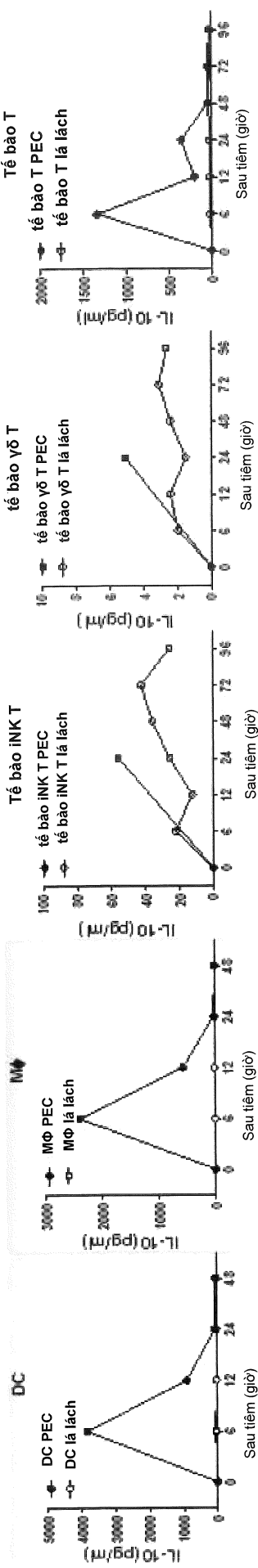
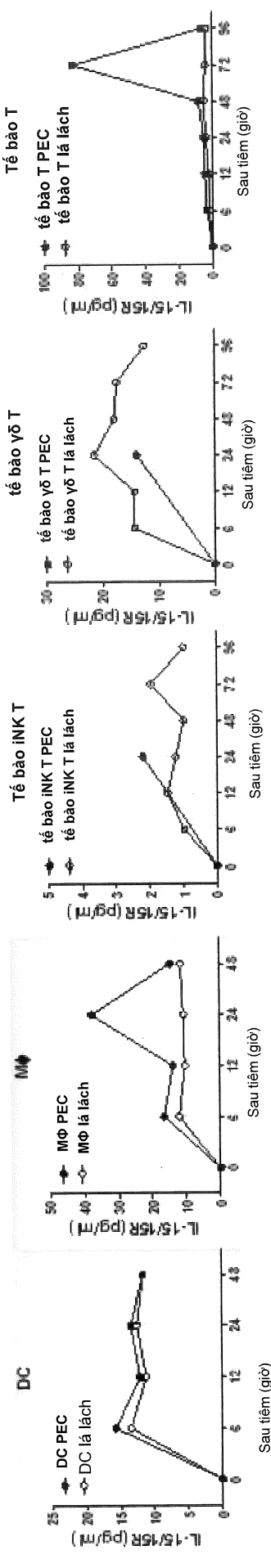
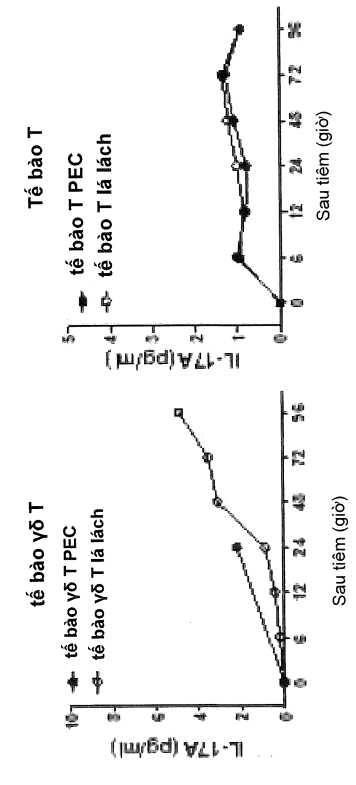
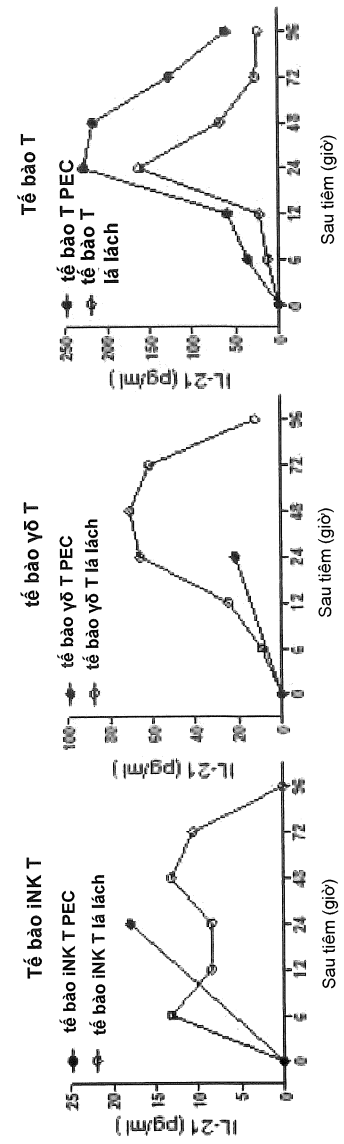
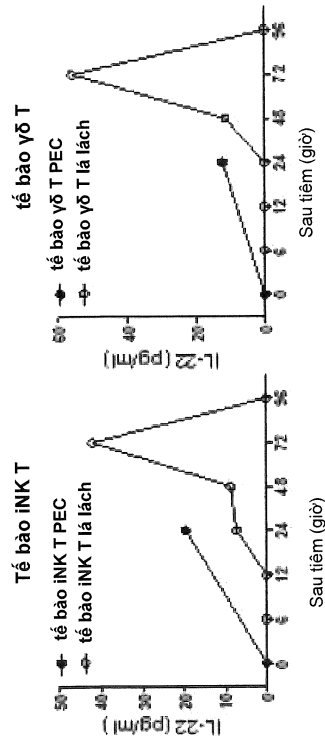
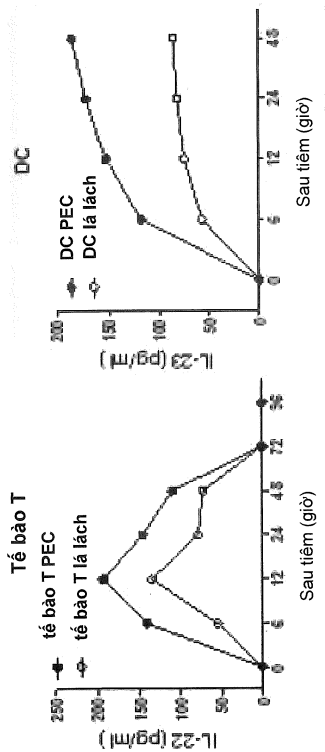
(G) IL-10**(H) IL-15/15R****(I) IL-17A DC, MΦ, Tế bào iNK T: ND****(J) IL-21 DC, MΦ, ND**

FIG. 6b

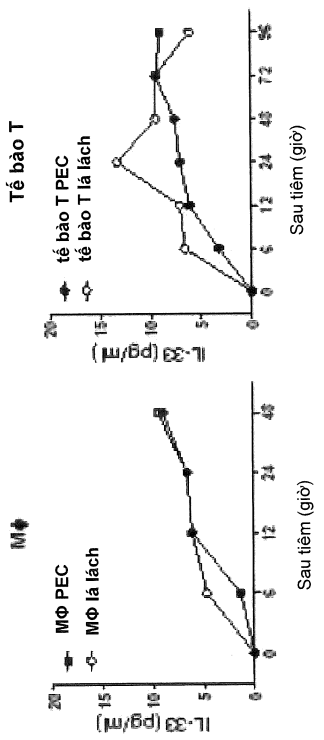
(K) IL-22 DC, MΦ: ND



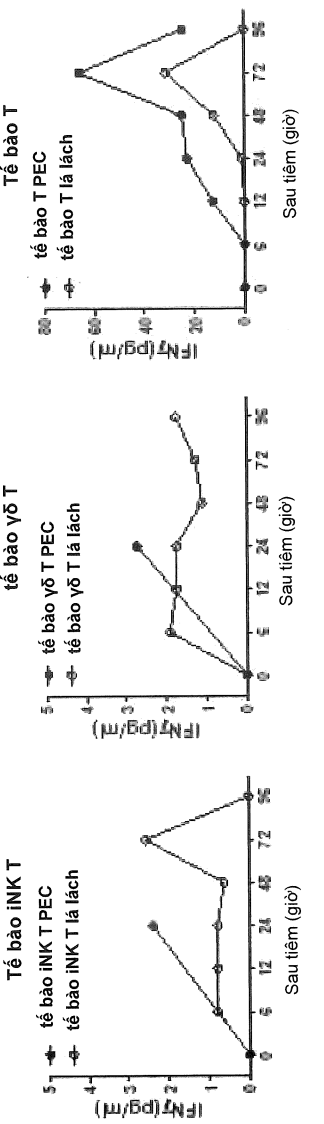
(L) IL-23 MΦ, tế bào iNK T, γδ T, T: ND



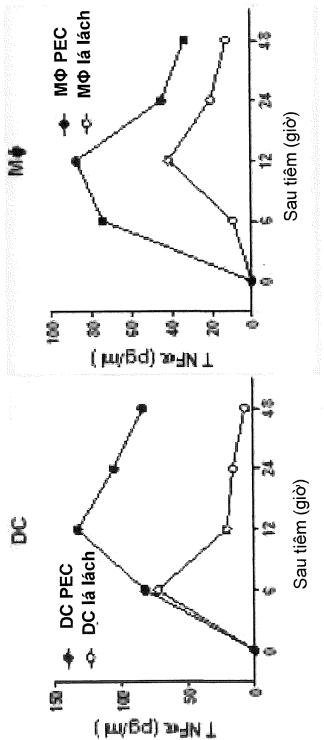
(M) IL-33 DC, tế bào iNK T, γδ T, T: ND



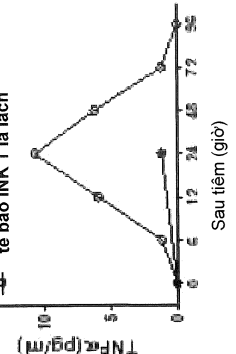
(N) IFNγ DC, MΦ: ND



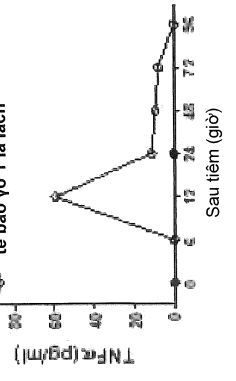
(O) TNFα



Tế bào iNK T



tế bào γδ T



Tế bào T

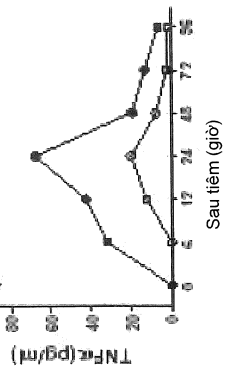
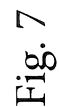


FIG. 6c



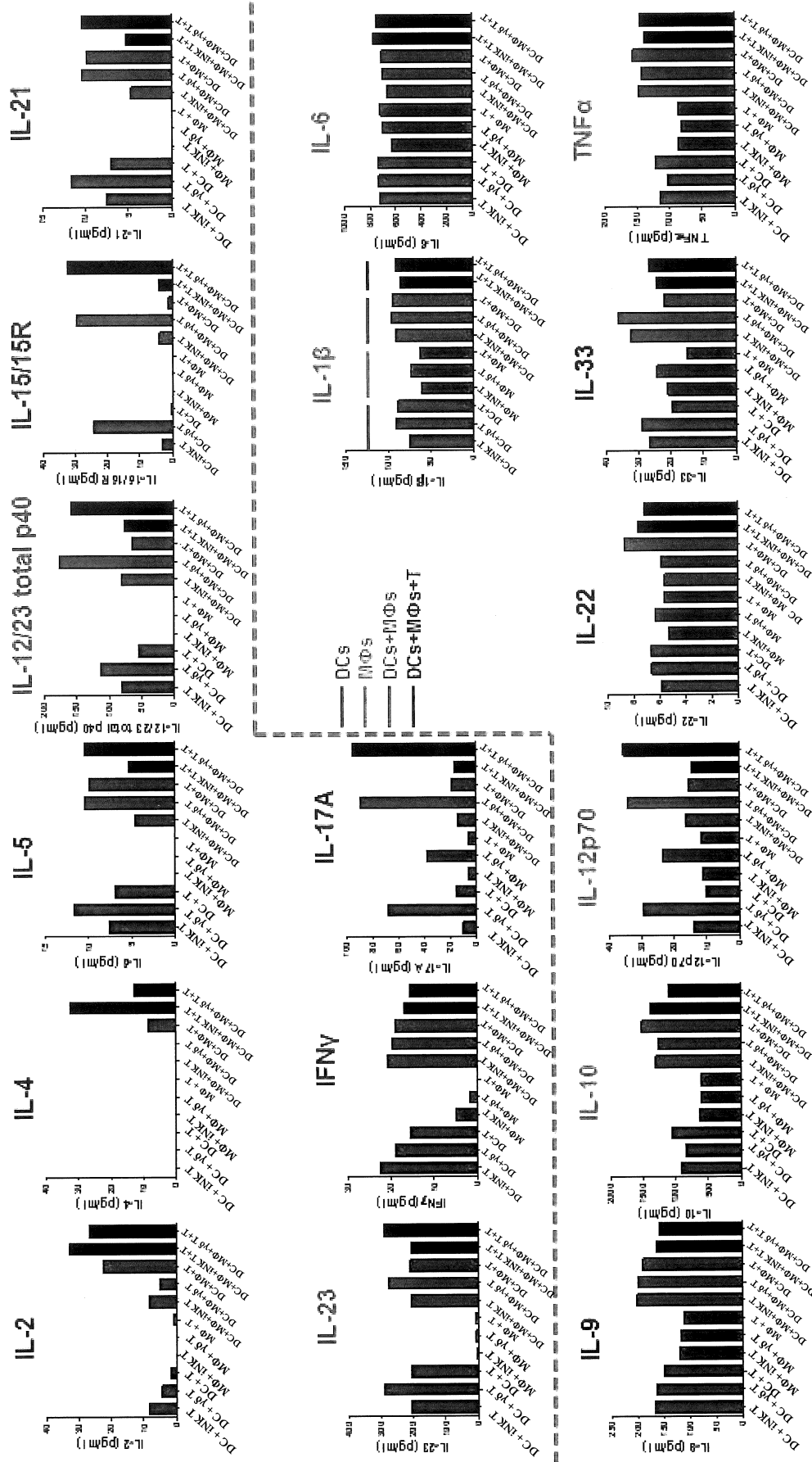


FIG. 8

12/42

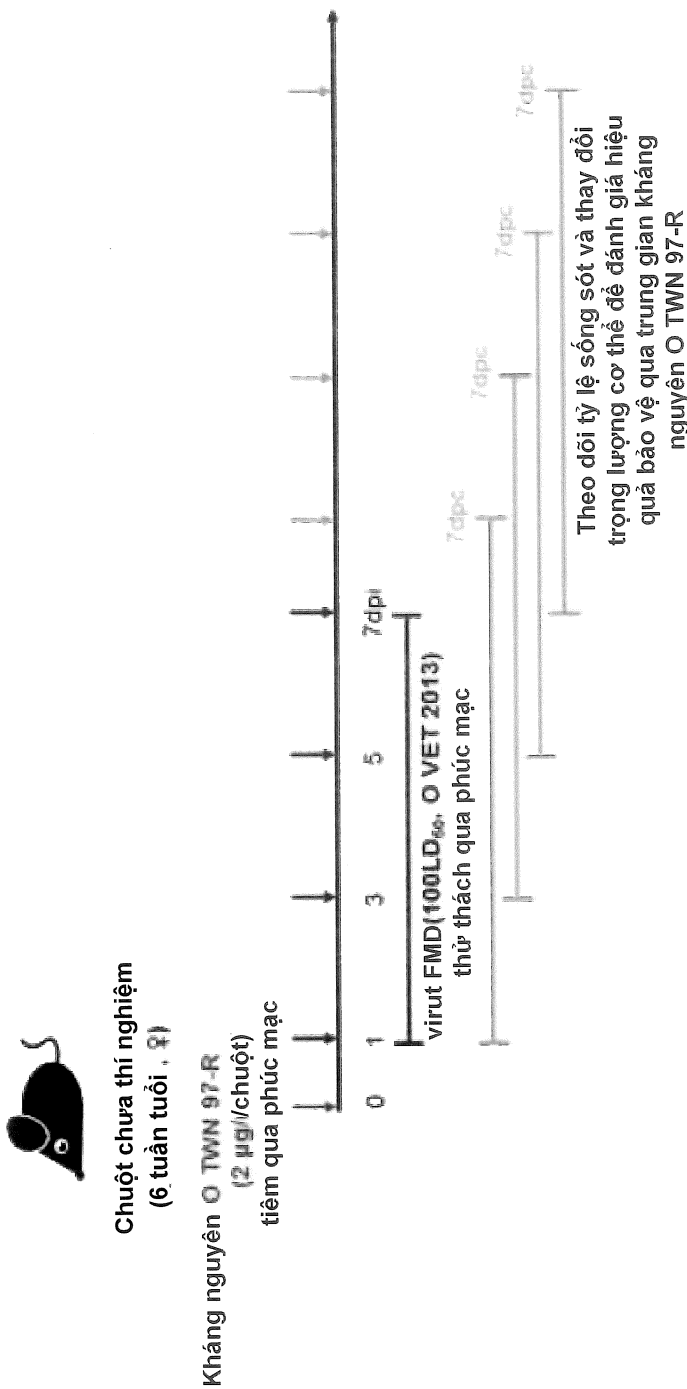
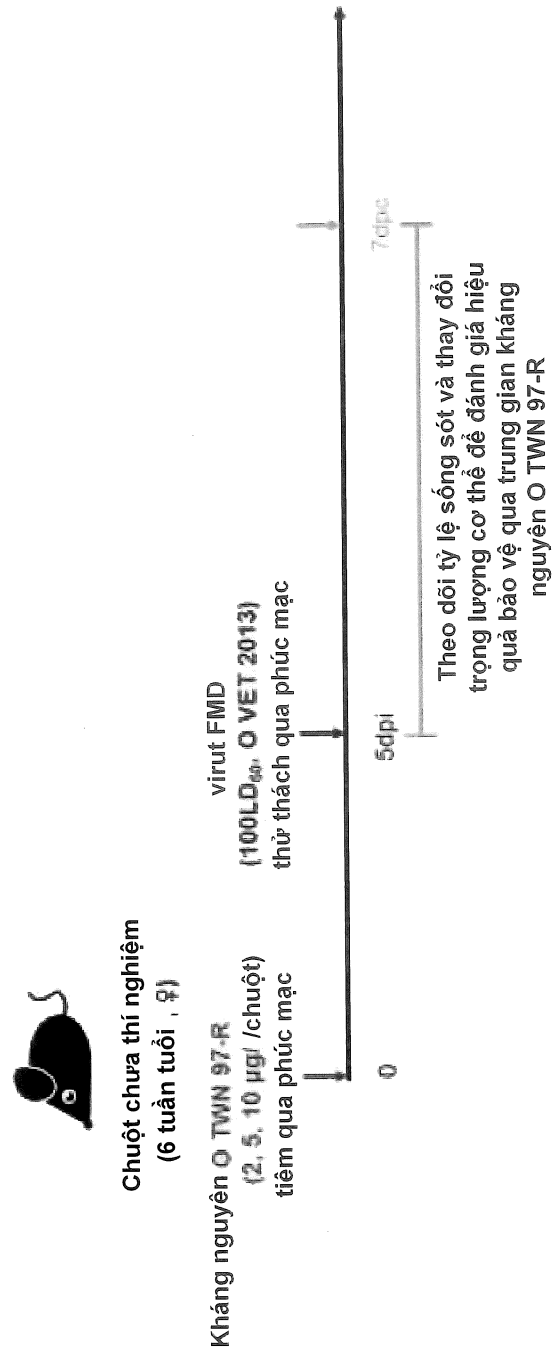
(A) Giai đoạn tiêm vaccin**(B) Đáp ứng liều**

FIG. 9

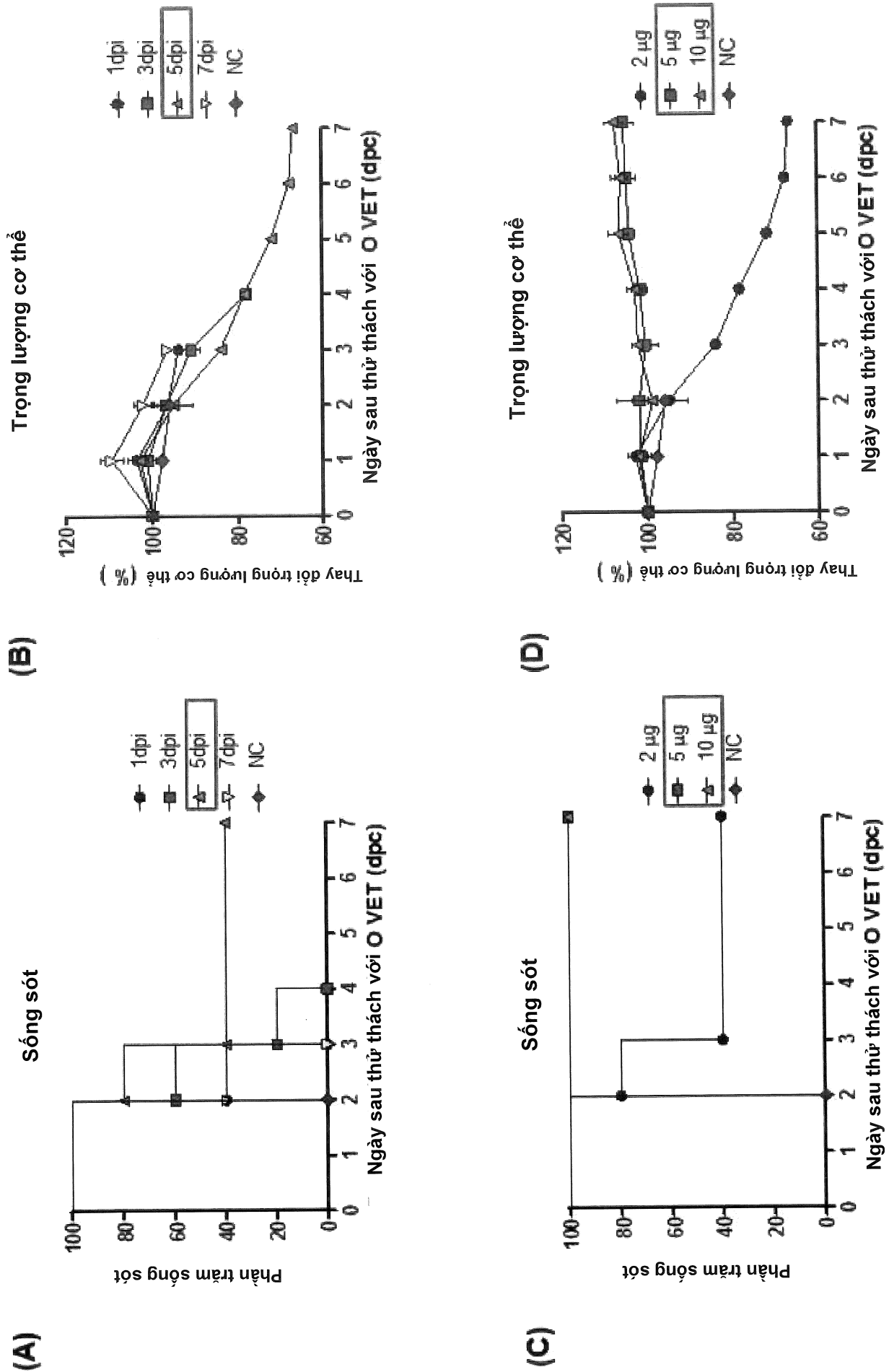


FIG. 10

FIG. 11

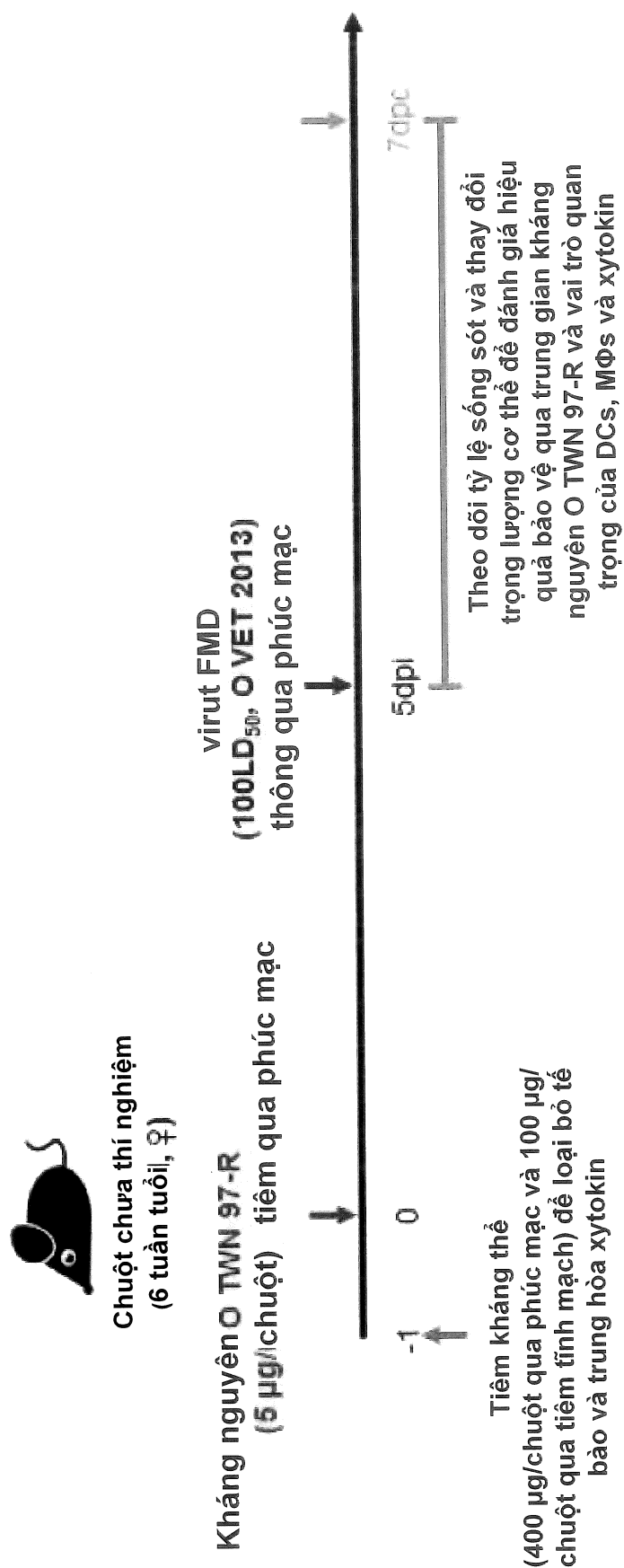
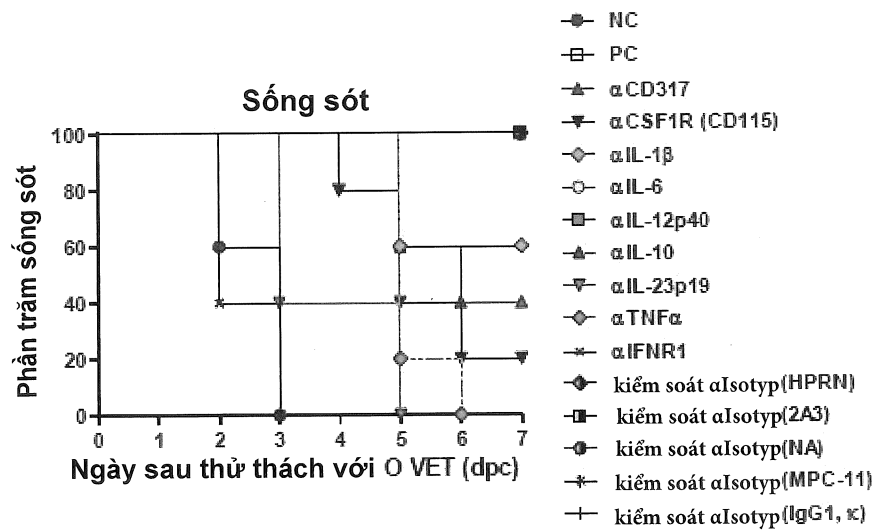


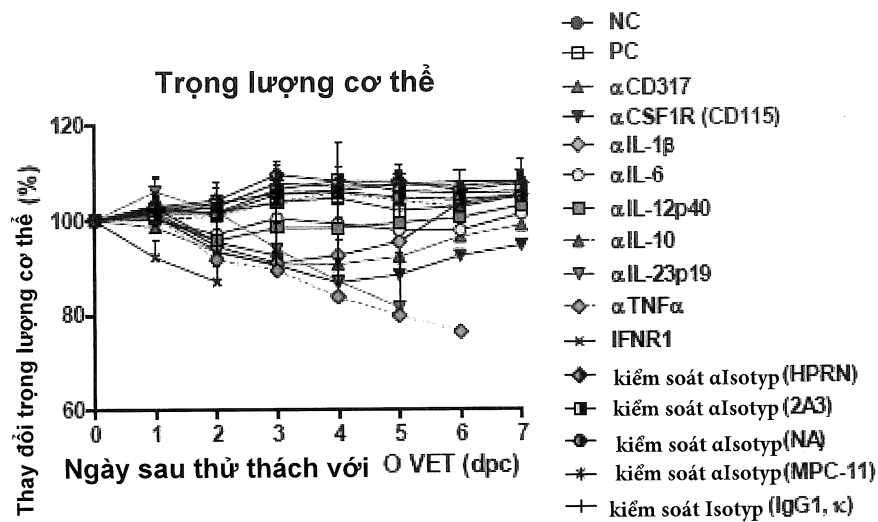
FIG. 11

15/42

(A)



(B)



(C)

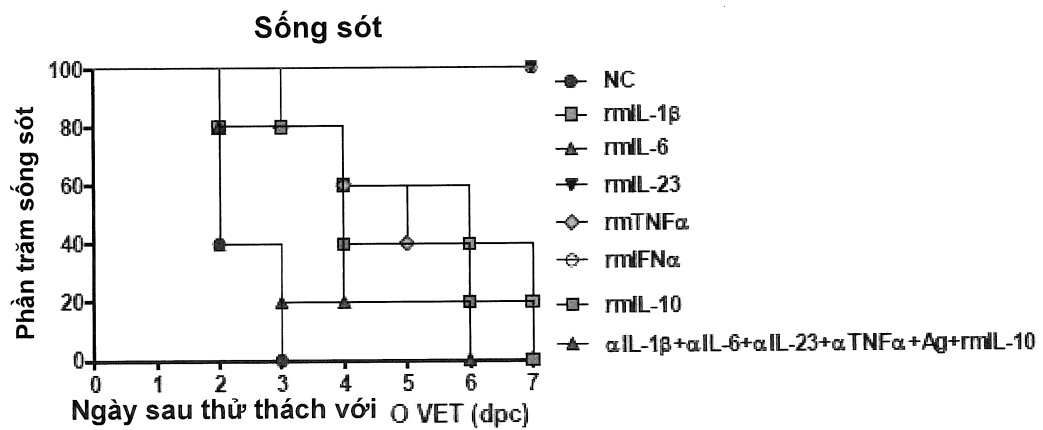
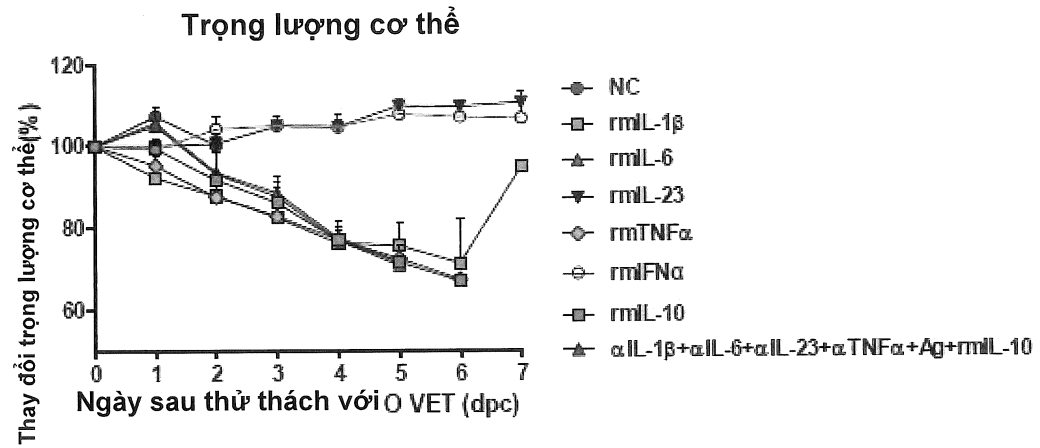


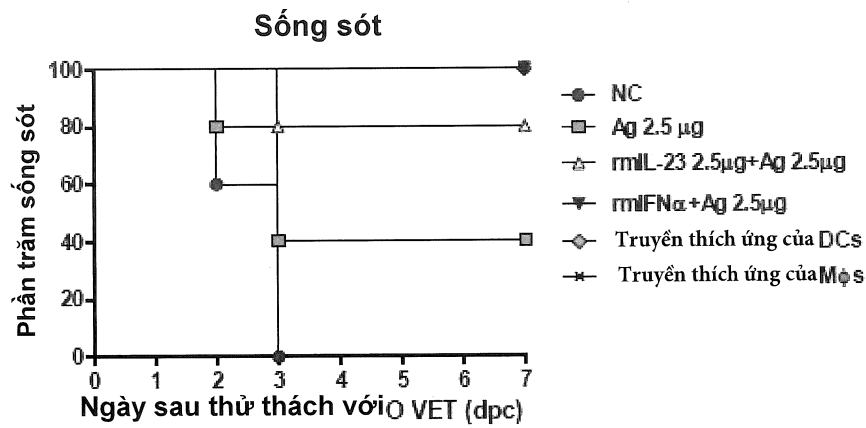
FIG. 12a

16/42

(D)



(E)



(F)

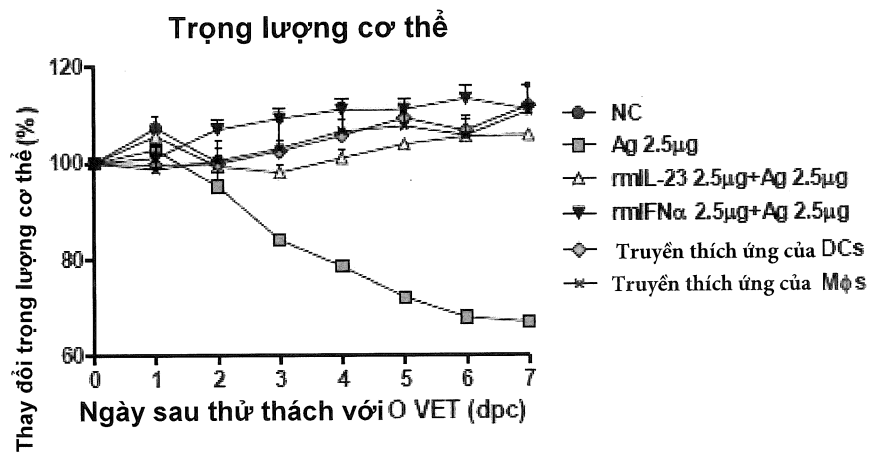


FIG. 12b

17/42

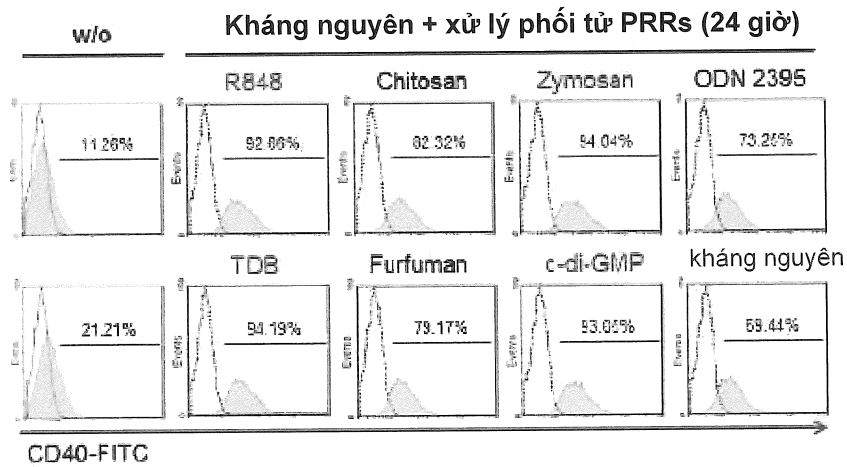
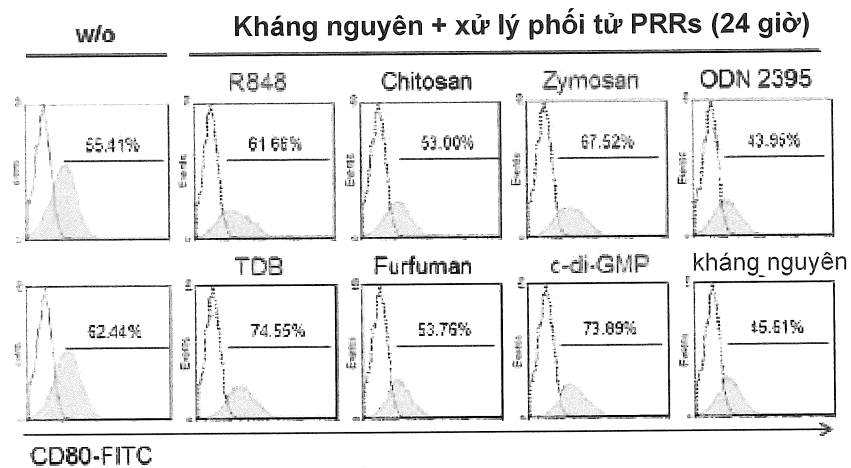
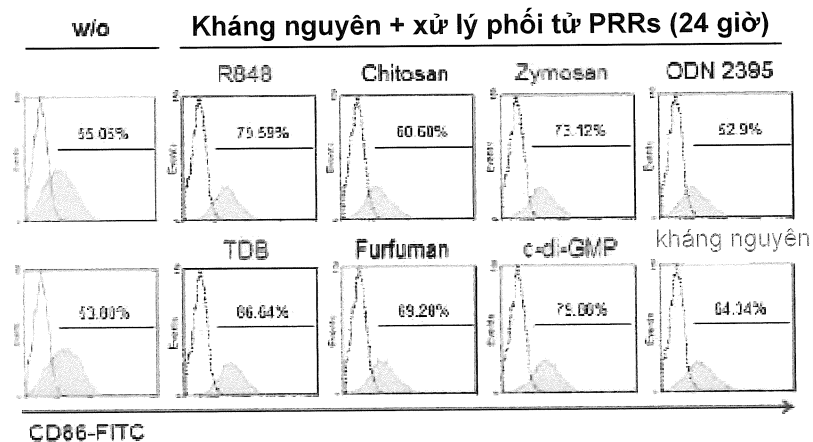
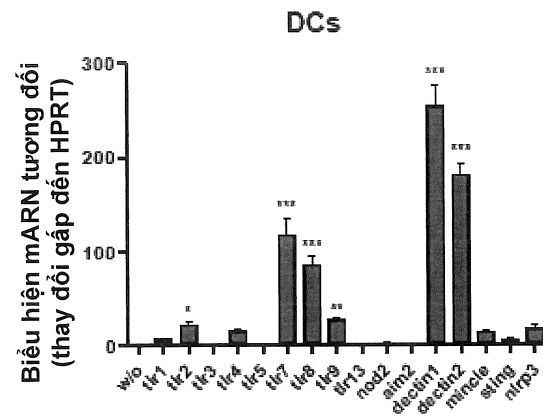
CD40**CD80****CD86**

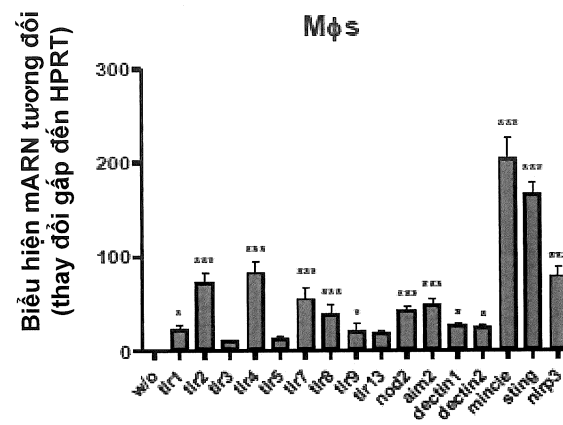
FIG. 13

18/42

(A)



(B)



(C)

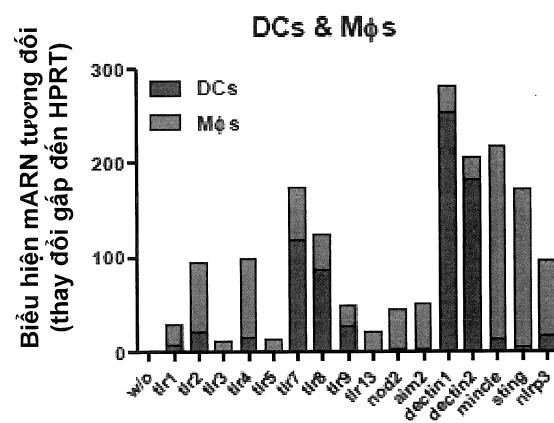


FIG. 14

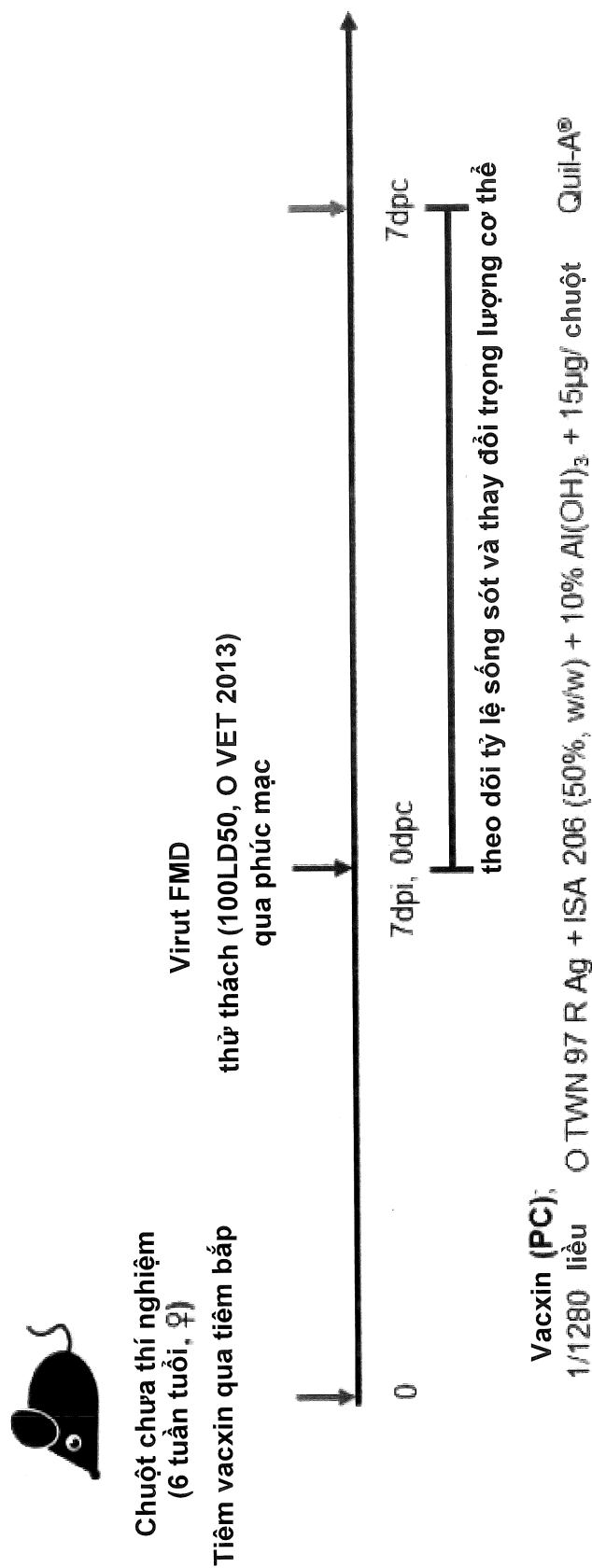


FIG. 15

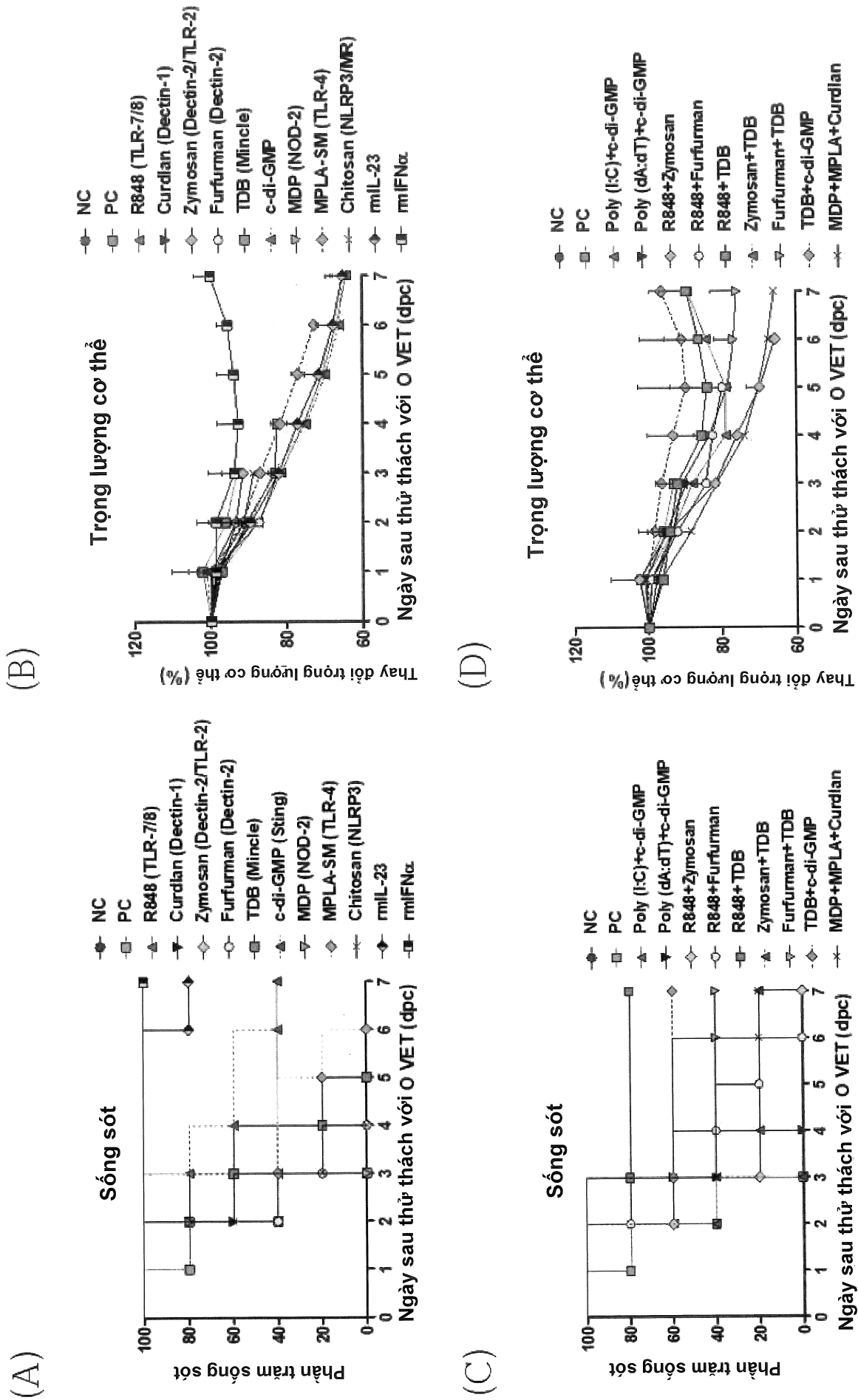


FIG. 16

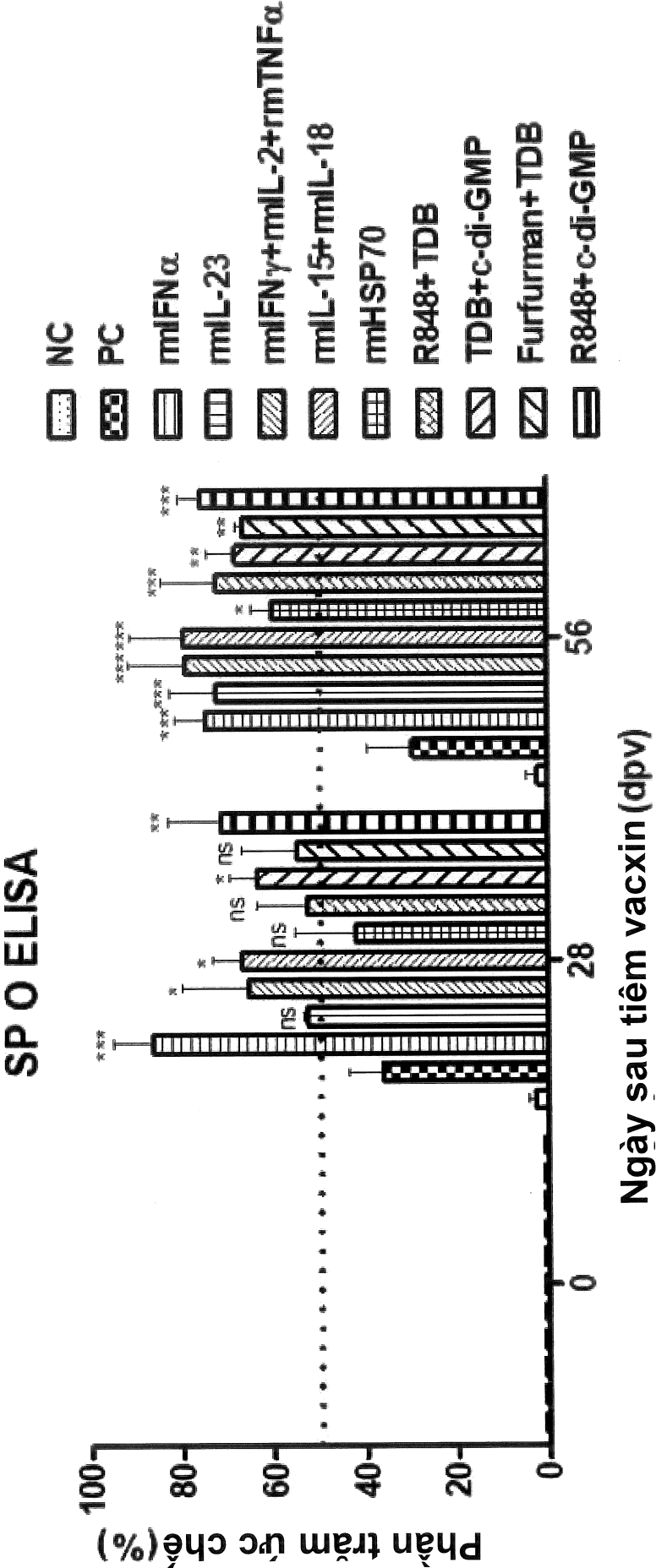


FIG 18a

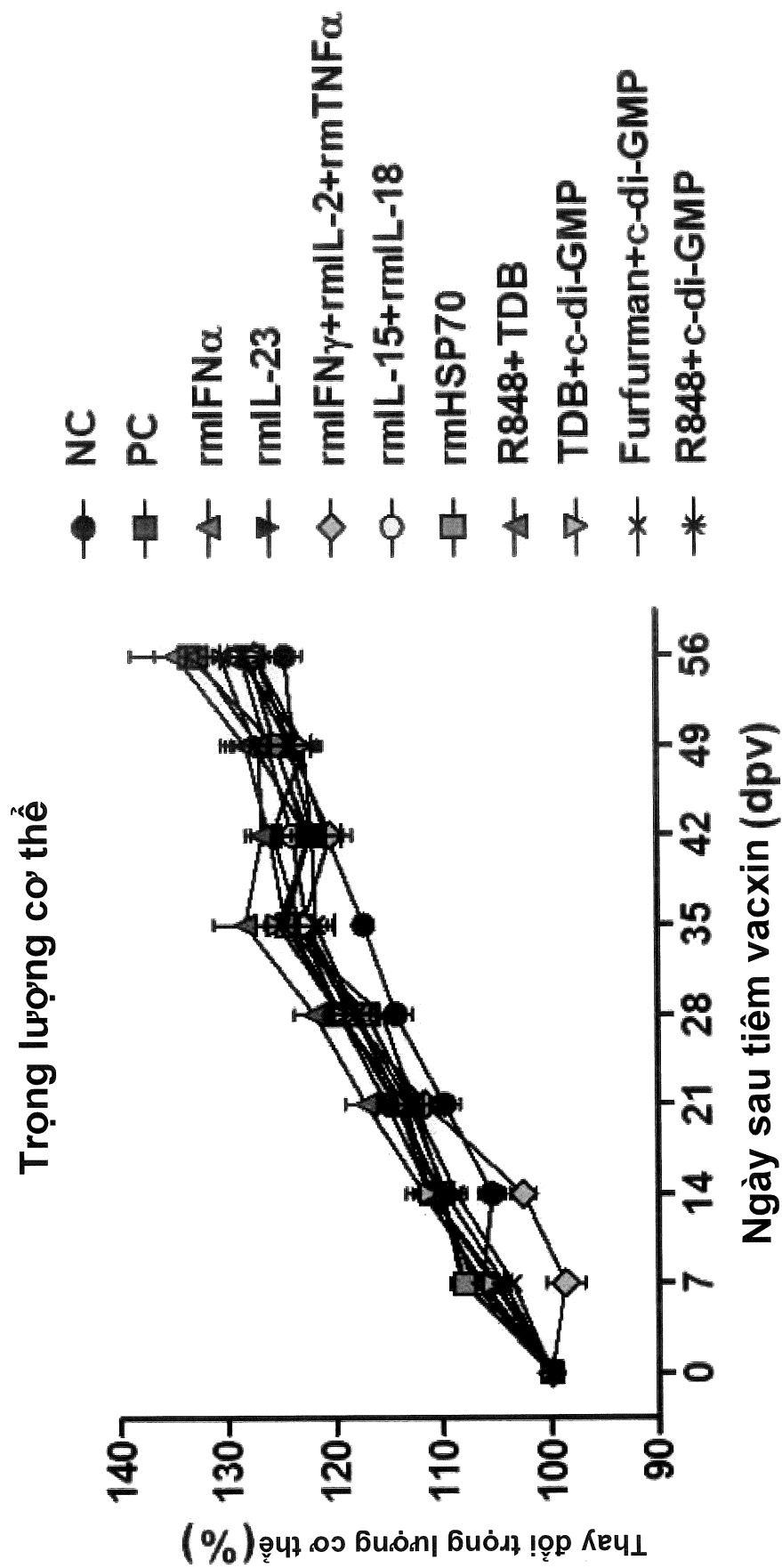


FIG. 18b

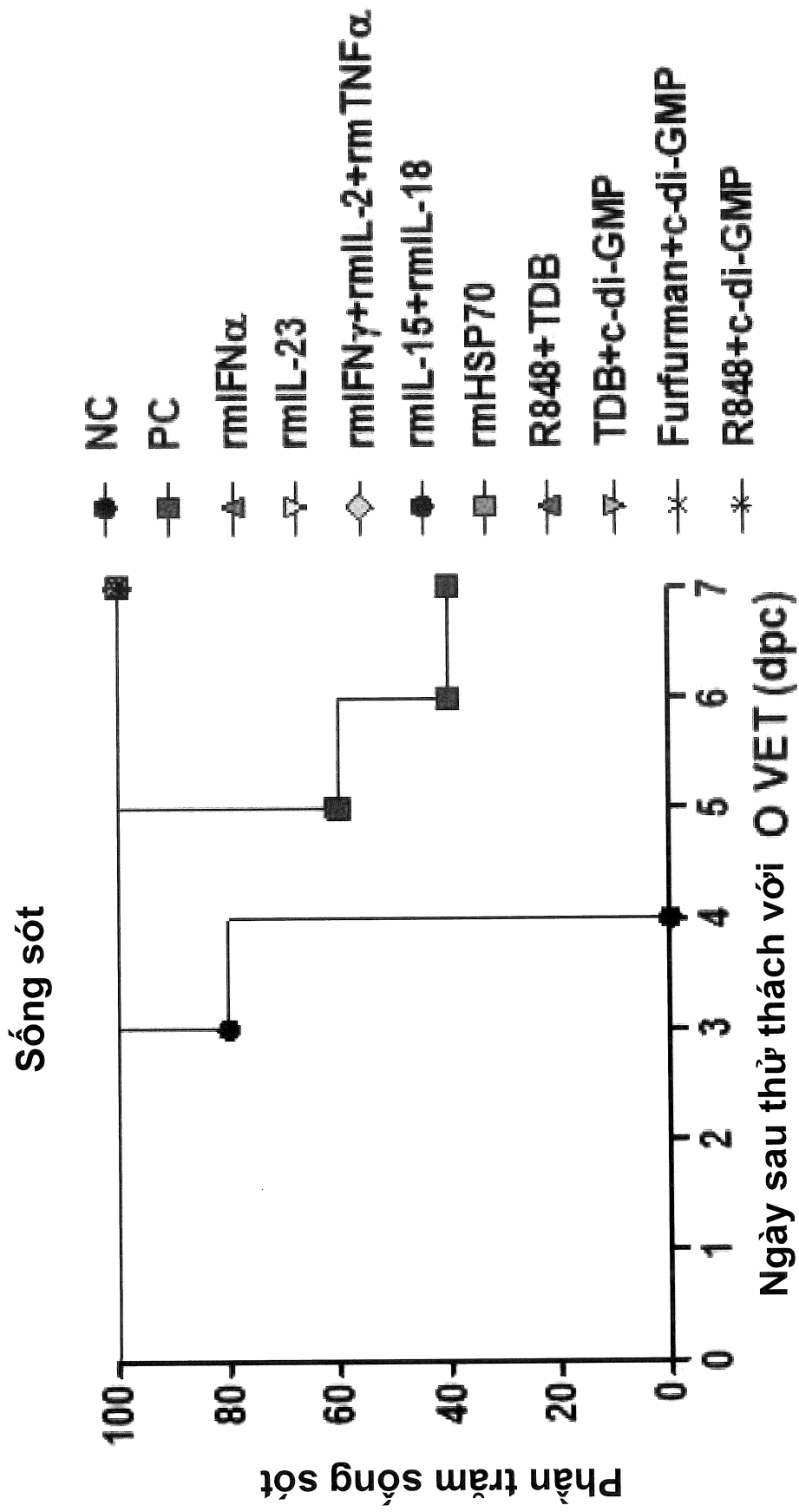


FIG. 18c

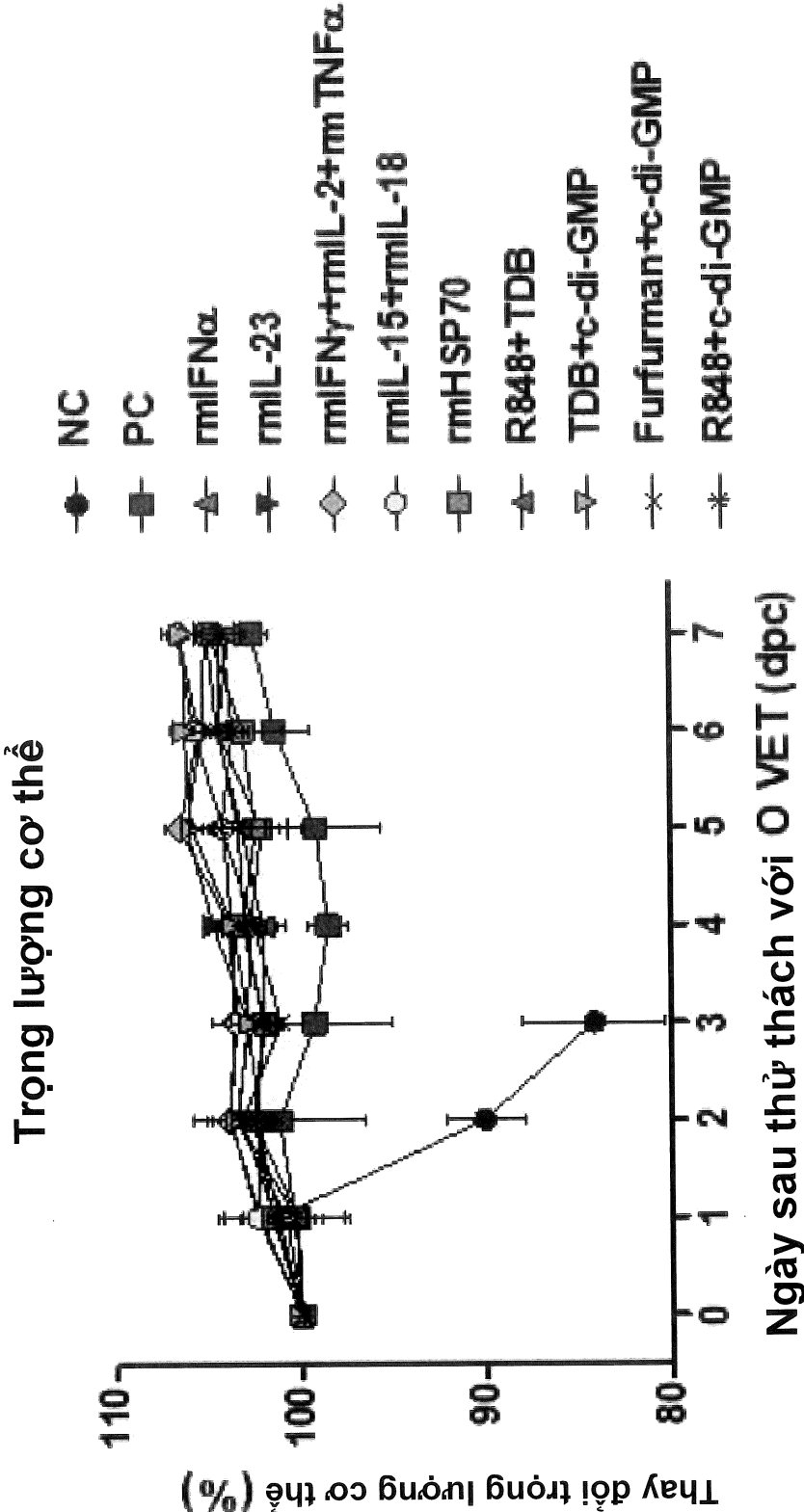


FIG. 18d

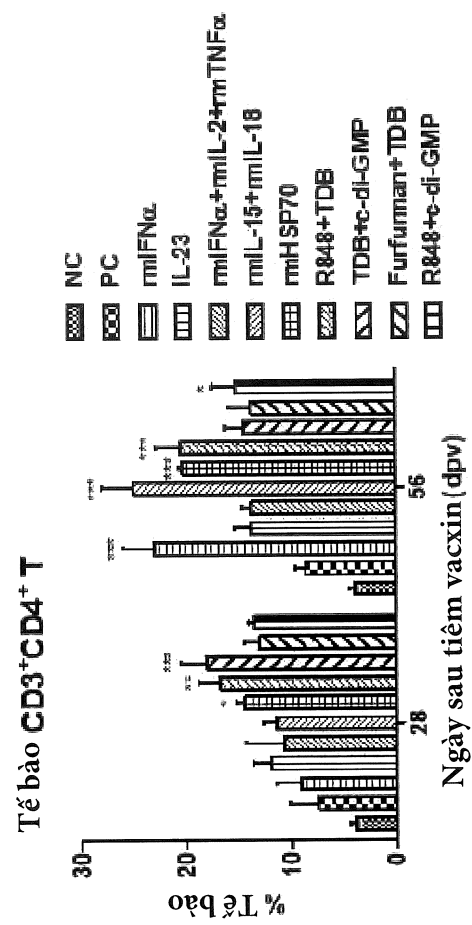


FIG. 19a

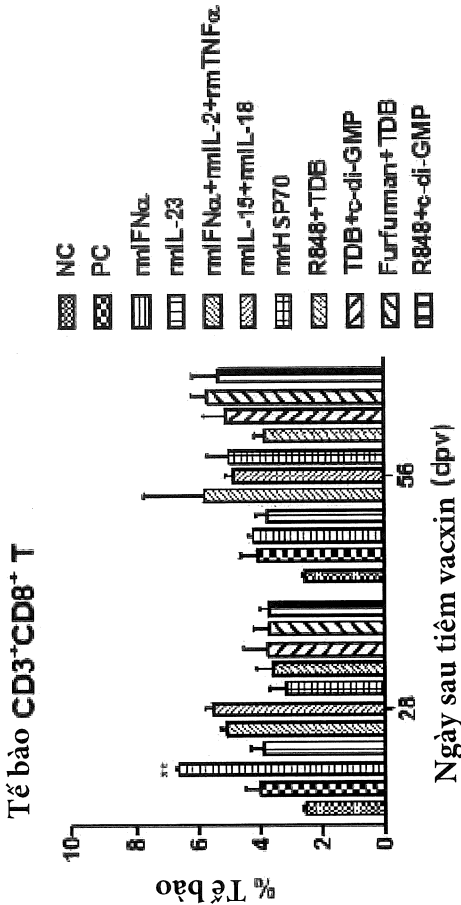


FIG. 19b

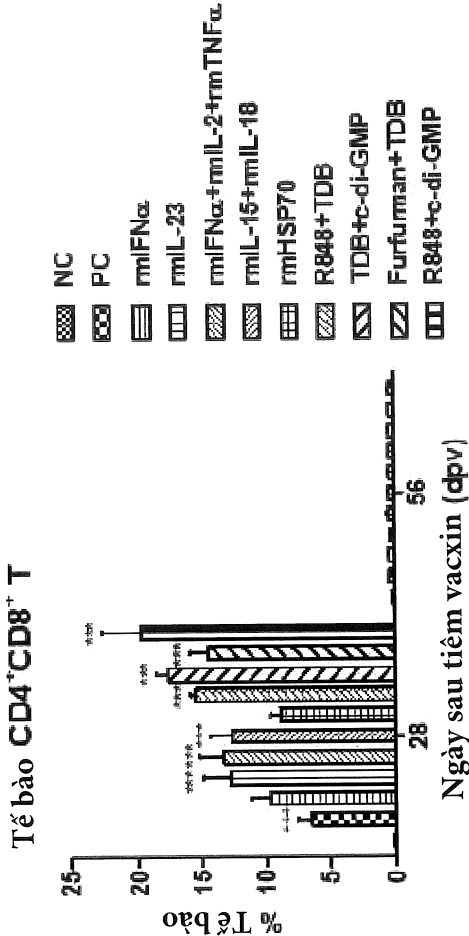


FIG. 19c

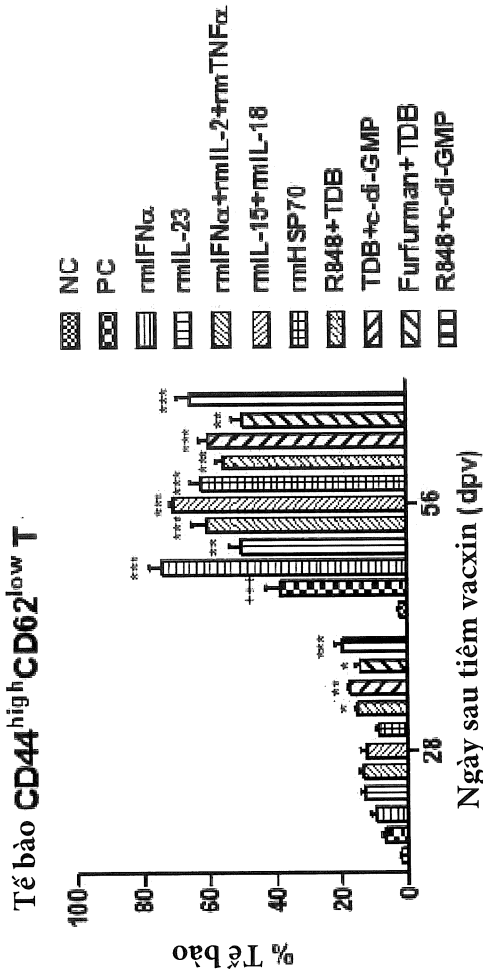


FIG. 19d

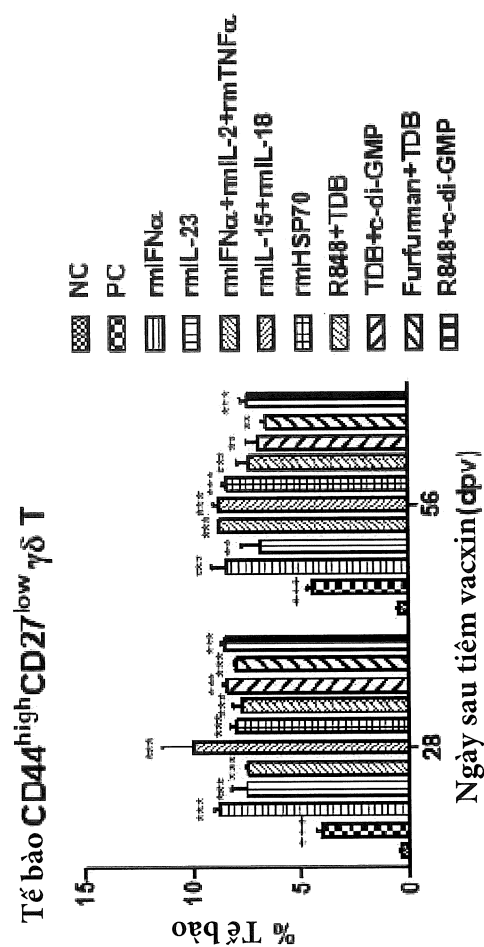


FIG. 19e

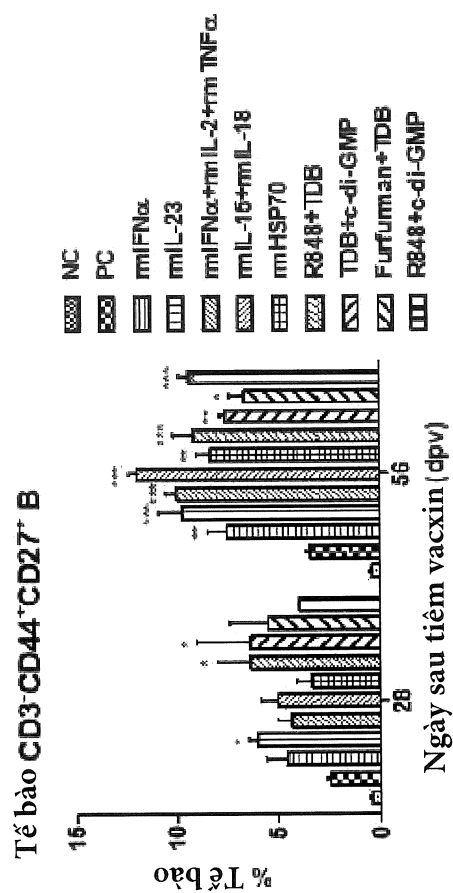


FIG. 19f

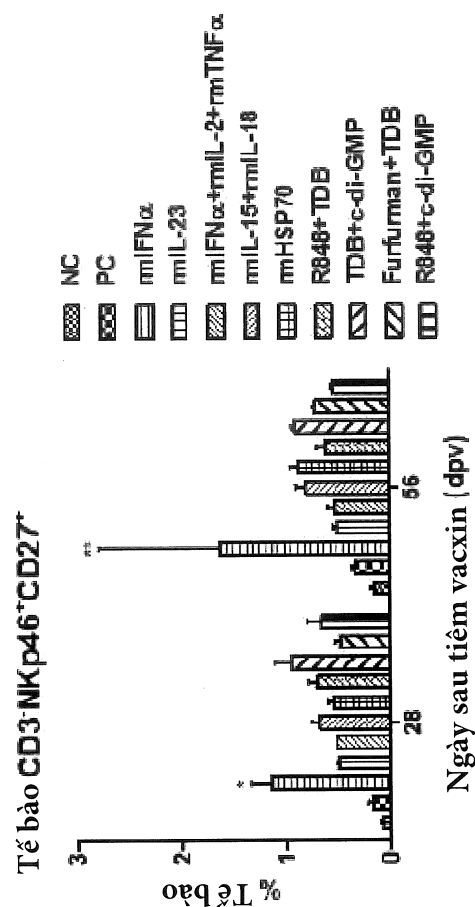
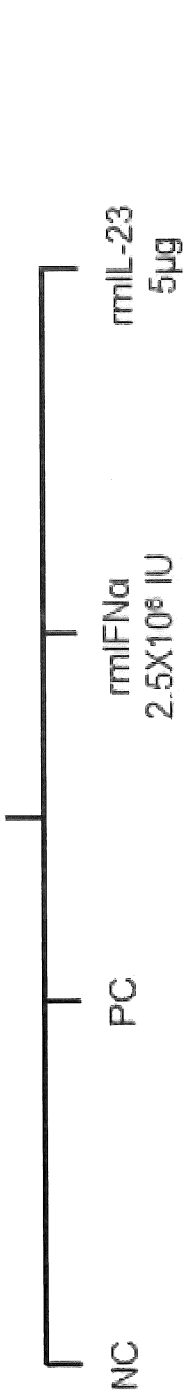


FIG. 19g



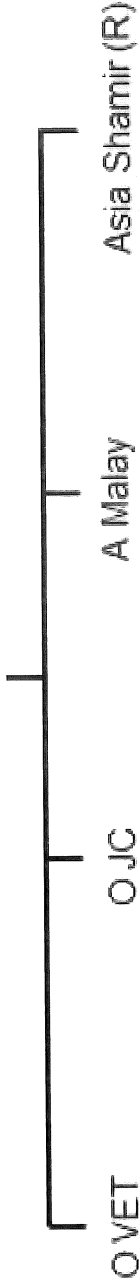
C57BL/6N

(6 tuần tuổi, ♀, n=5/nhóm)



Ag	-	-	-	-	-
ISA 206 (50%, w/w)	-	+	-	+	+
10% Al(OH) ₃	-	-	-	-	-
0.5mg Quil-A®	-	-	-	-	-
rmlFNα	-	-	-	+	-
rmlL-23	-	-	-	-	+

↓
Tiêm bắp
↓ 7dpi



↓
Thử thách với virus

↓

Theo dõi sống sót & thay đổi trọng lượng cơ thể trong 7 dpc

FIG. 20

34/42

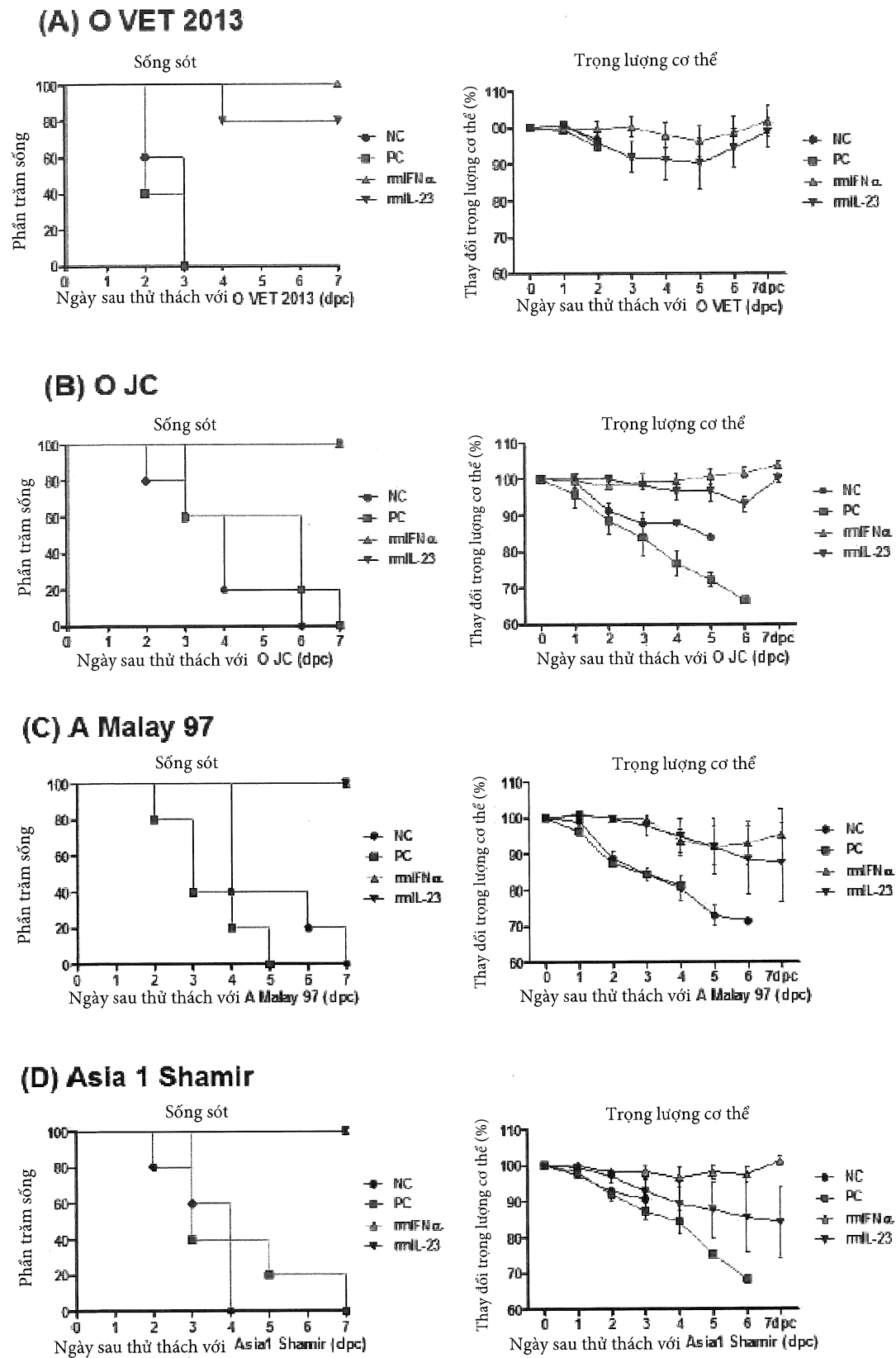
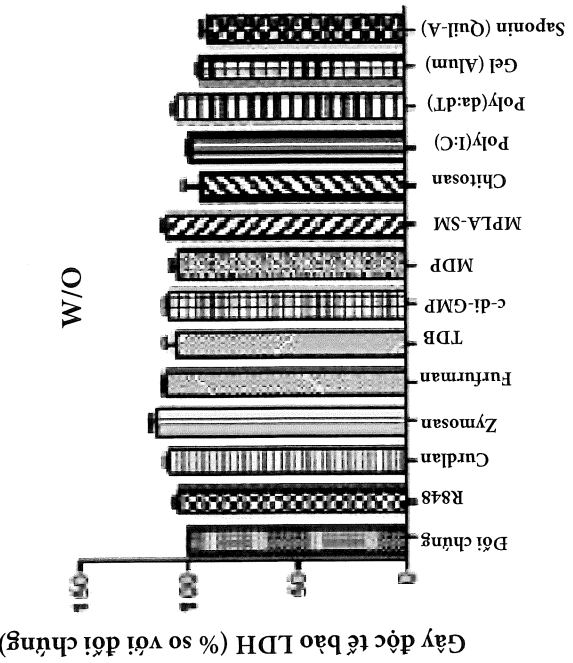


FIG. 21

(A)

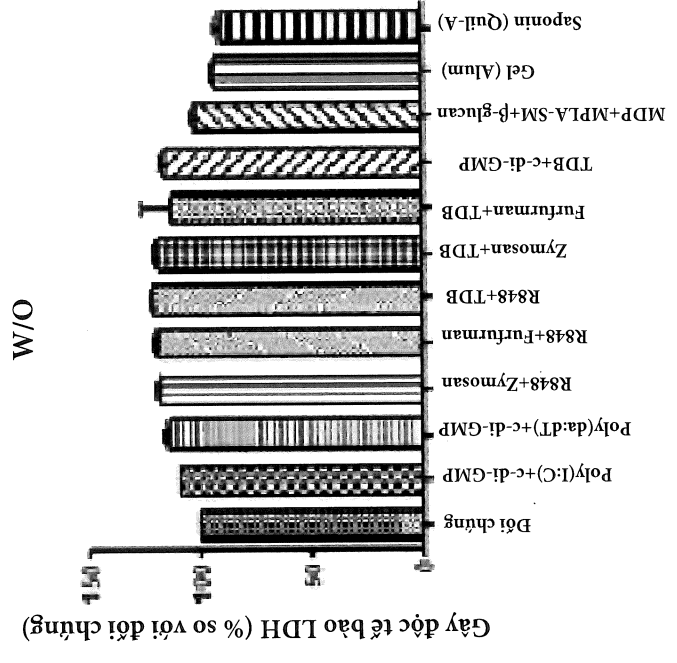
35/42

(B)



PBMC ở bò

(C)



PBMC ở bò

Gây độc tế bào LDH (% so với đối chứng)

Có Dầu + Gel + Saponin

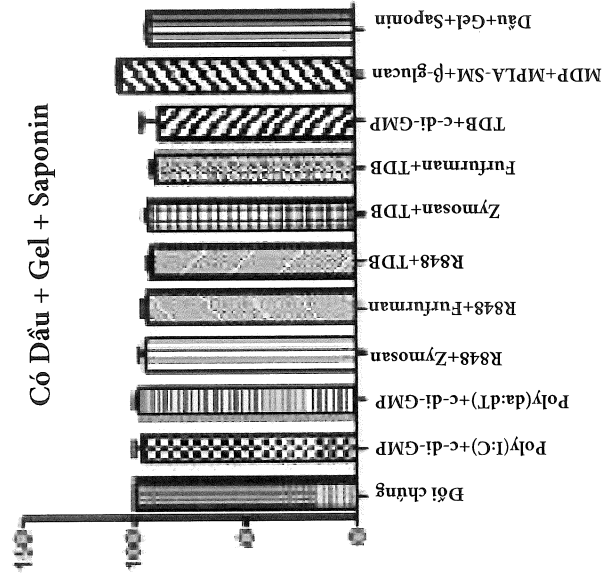
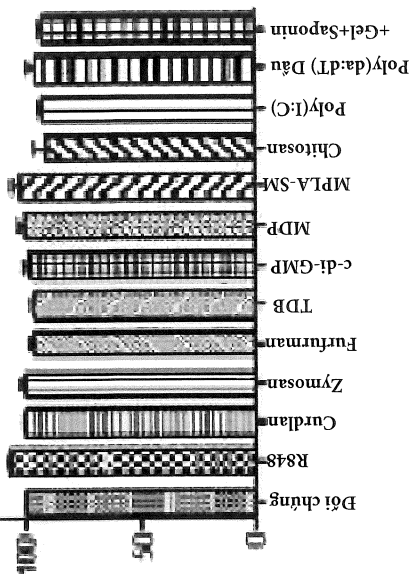


Fig. 22

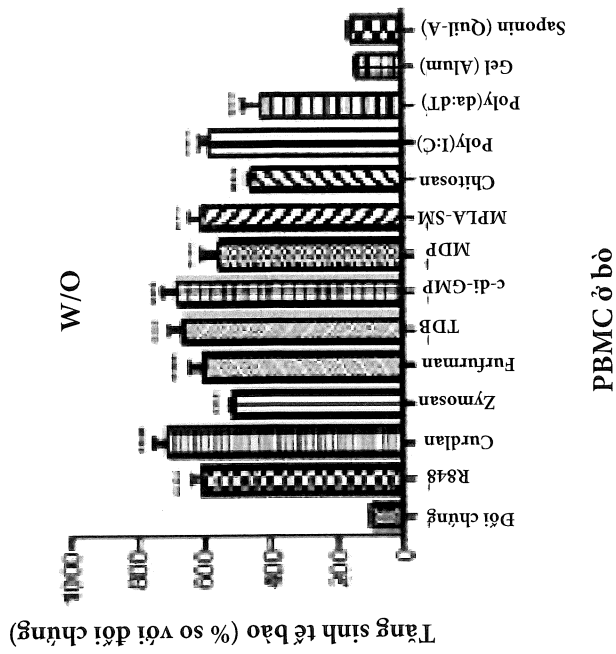
PBMC ở bò

Gây độc tế bào LDH (% so với đối chứng)

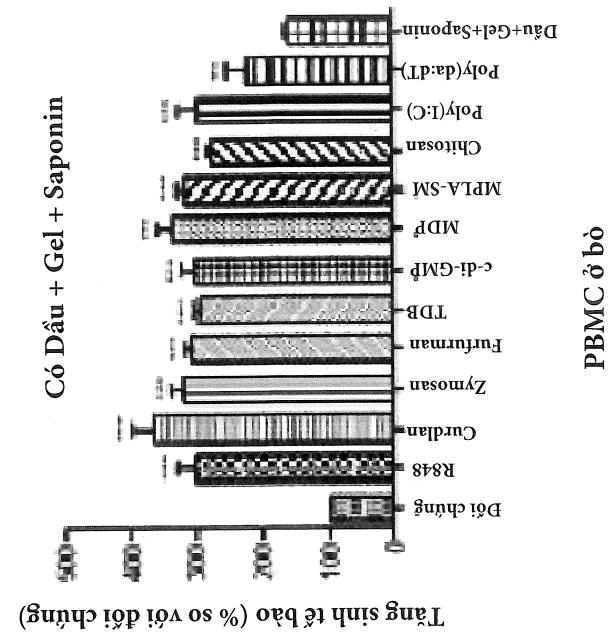
Có Dầu + Gel + Saponin



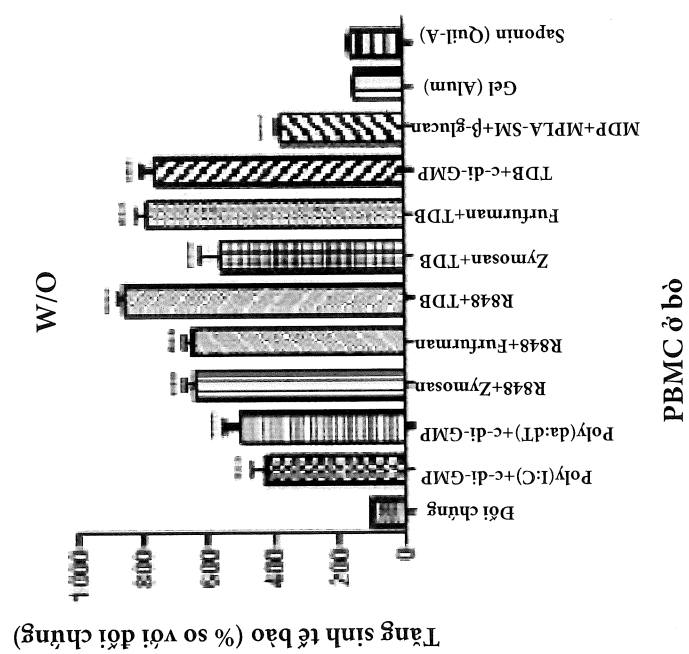
(A)



(B)



(C)



(D)

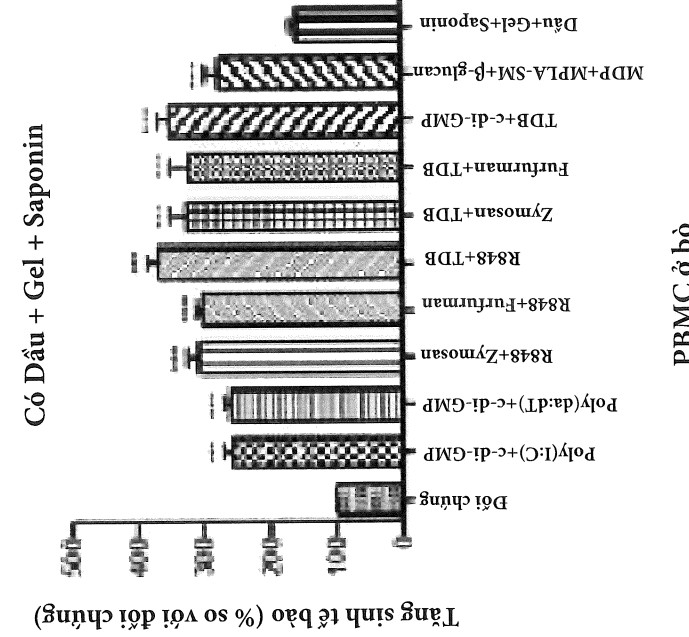


Fig. 23

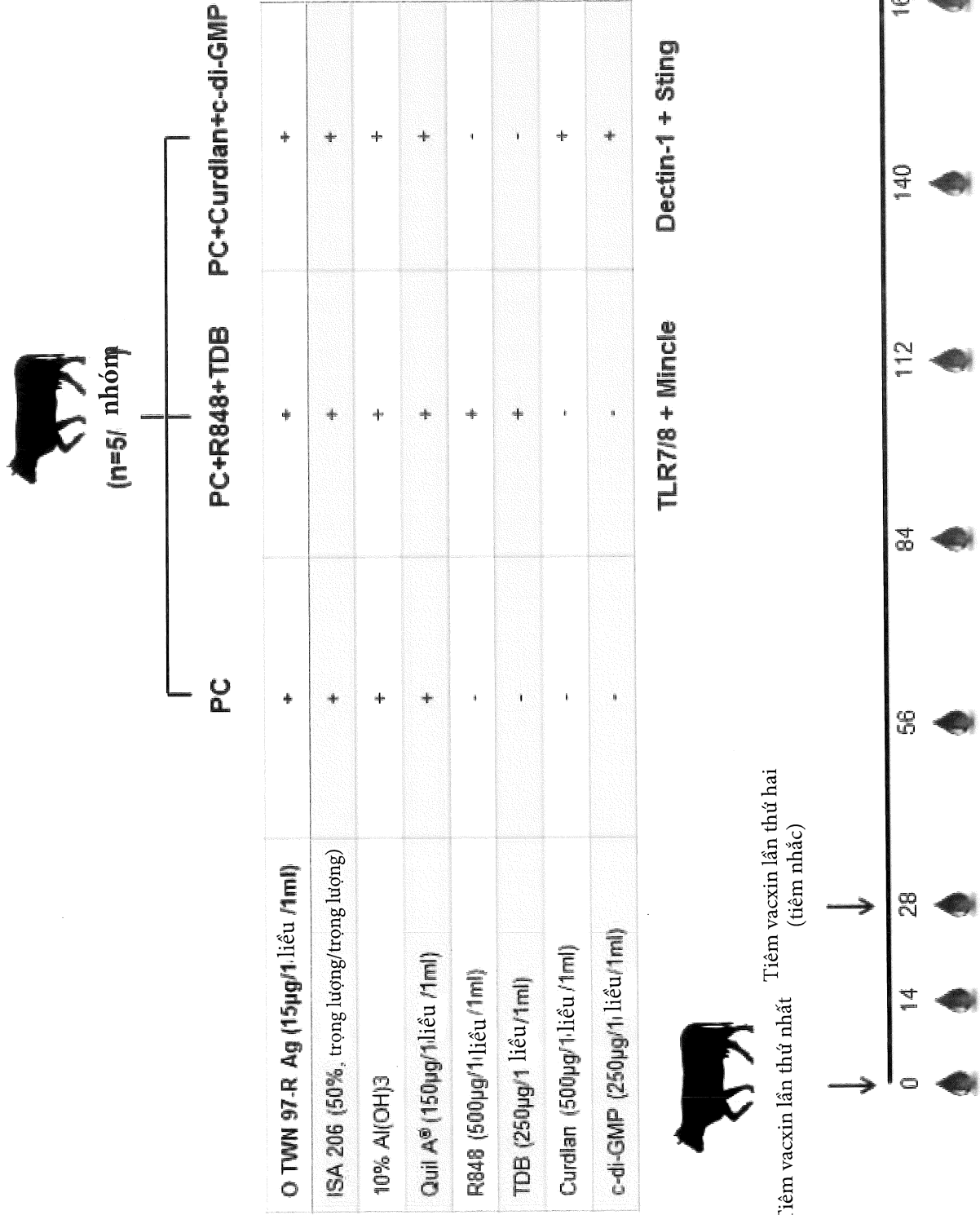


FIG. 24

38/42

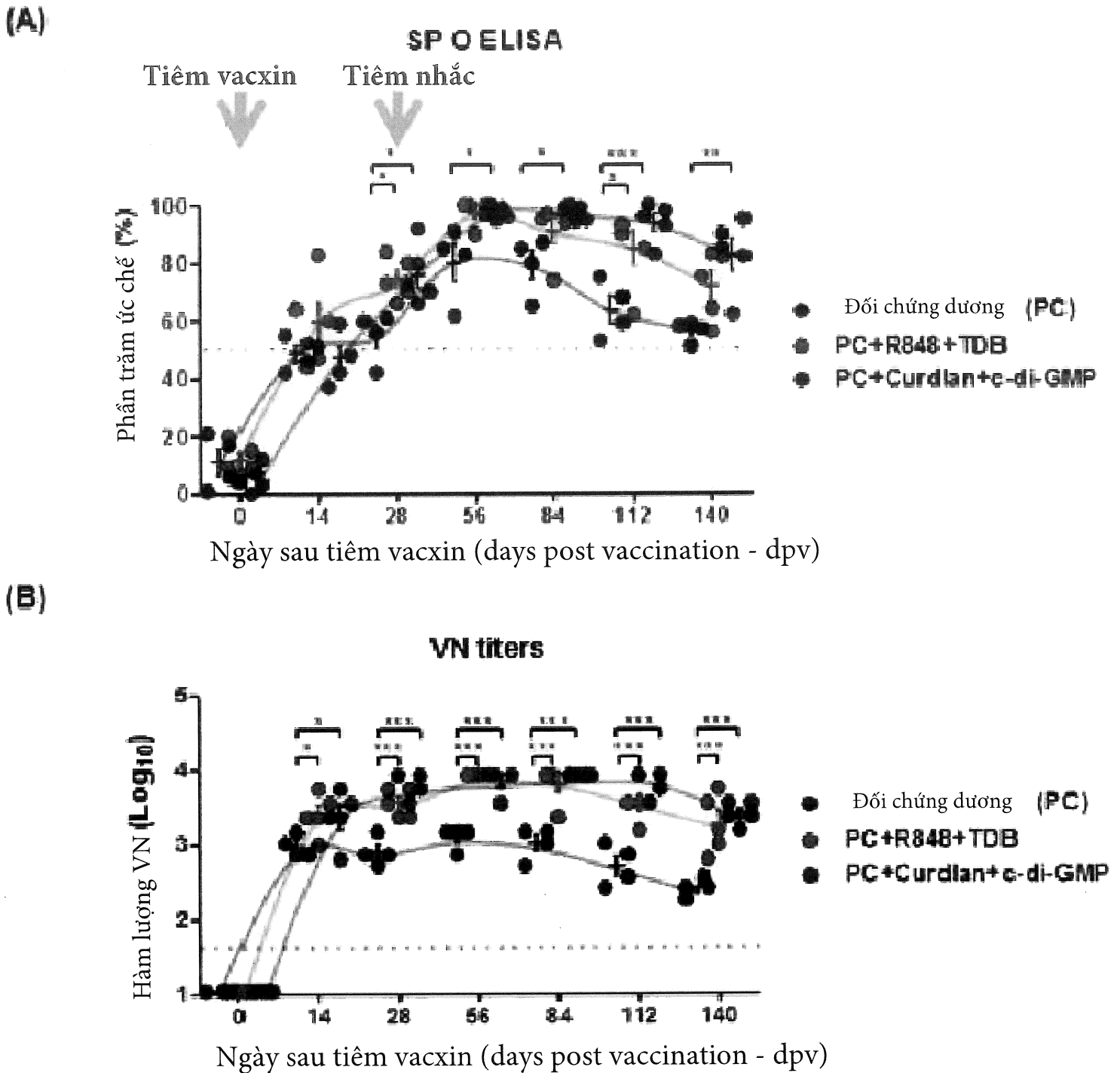
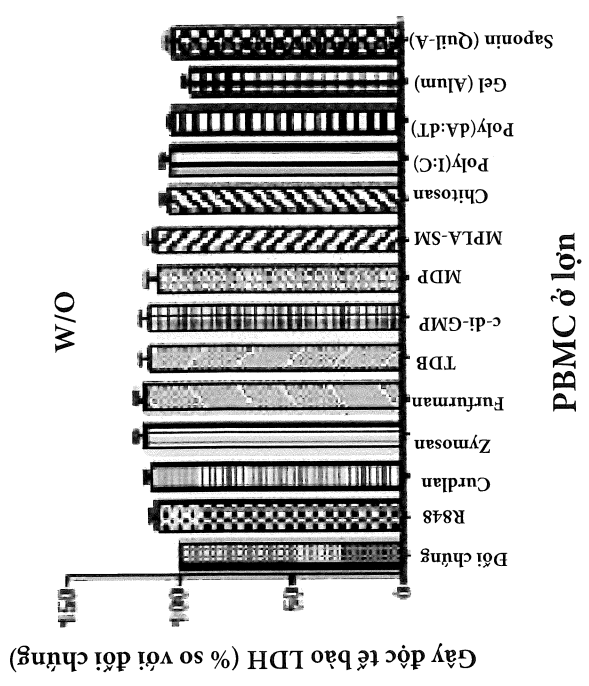


FIG. 25

(A)

39/42

(B)



Có Dầu + Gel + Saponin

Đôi chứng

R848

Curdlan

Zymosan

Furfurman

TDB

c-di-GMP

MDP

MPLA-SM

Chitosan

Poly(I:C)

Poly(dA:dT)

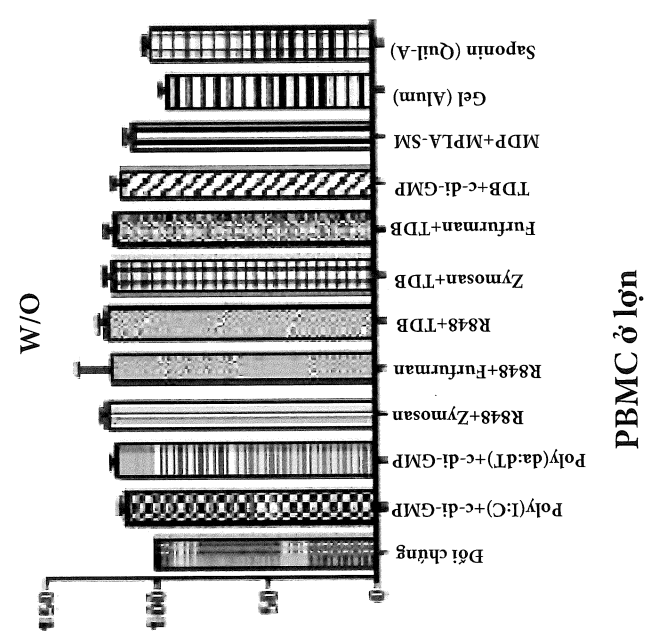
Dầu+Gel+Saponin

Gây độc tế bào LDH (% so với đối chứng)

PBMC ở lợn

(C)

Gây độc tế bào LDH (% so với đối chứng)



Gây độc tế bào LDH (% so với đối chứng)

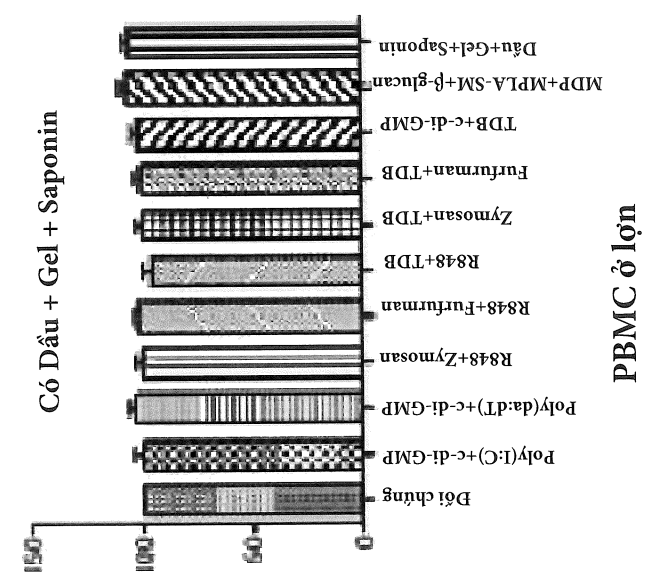


Fig. 26

(A)

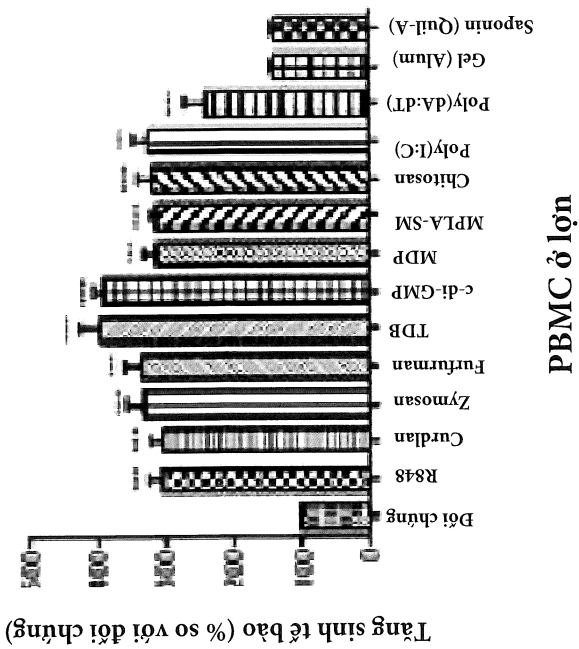
40/42

(B)

Có Dầu + Gel + Saponin

48199

69/71



(C)

W/O

(D)

Có Dầu + Gel + Saponin

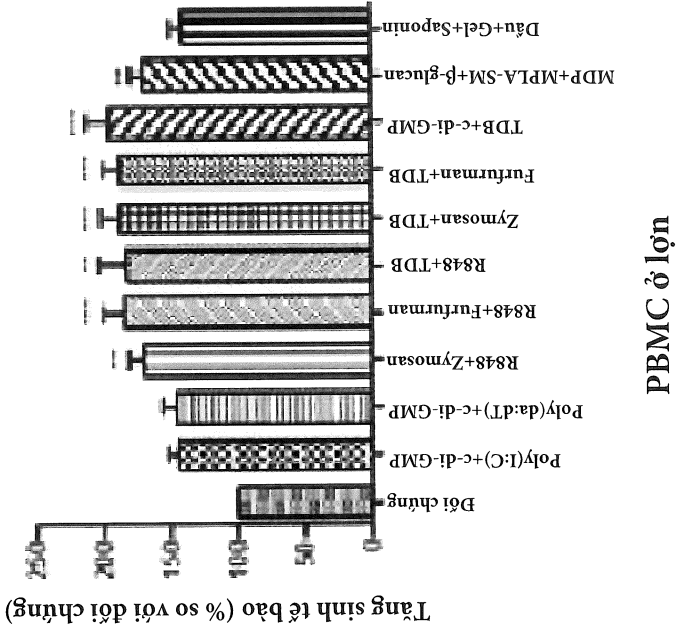
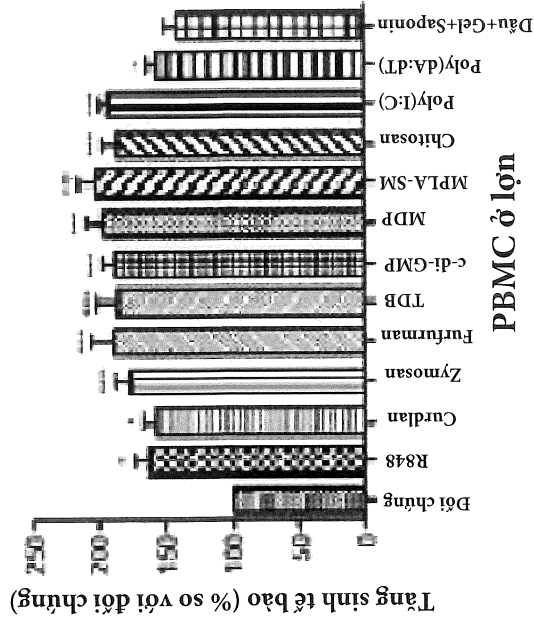
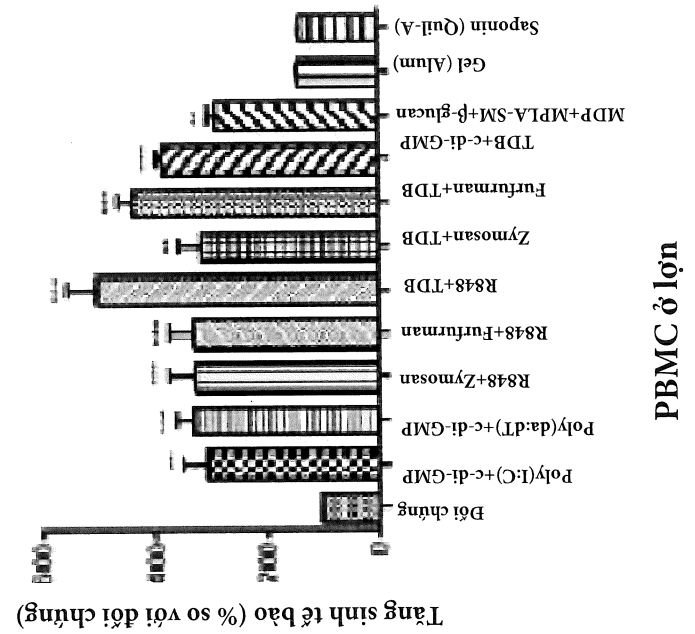
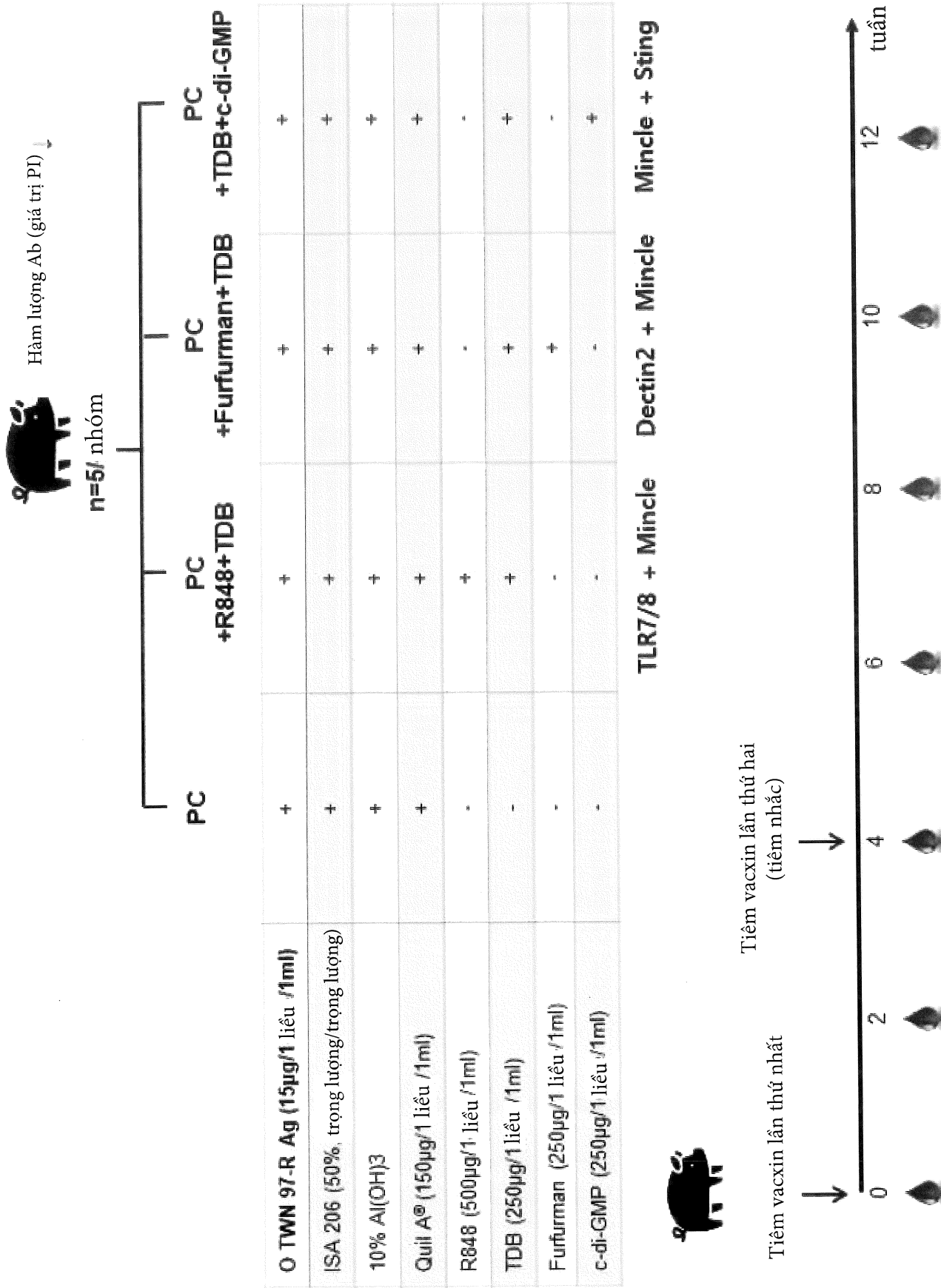
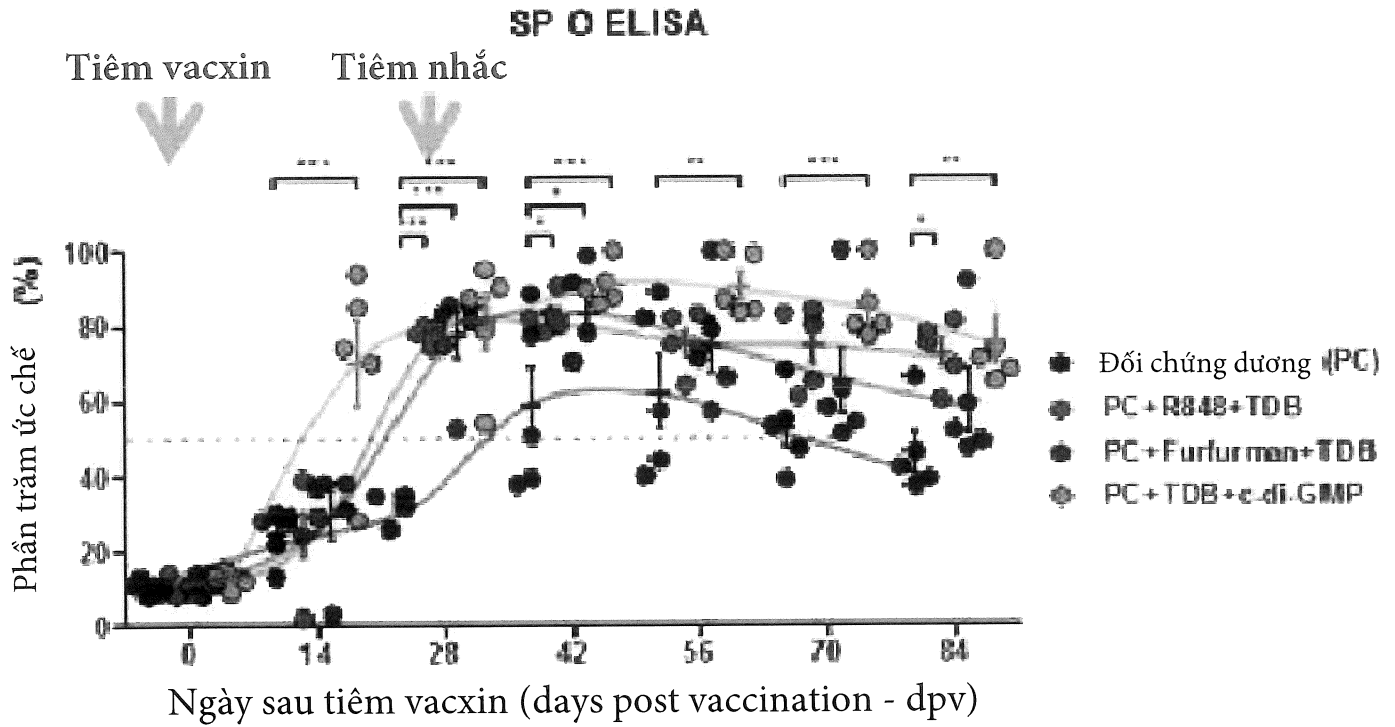


Fig. 27



42/42

(A)



(B)

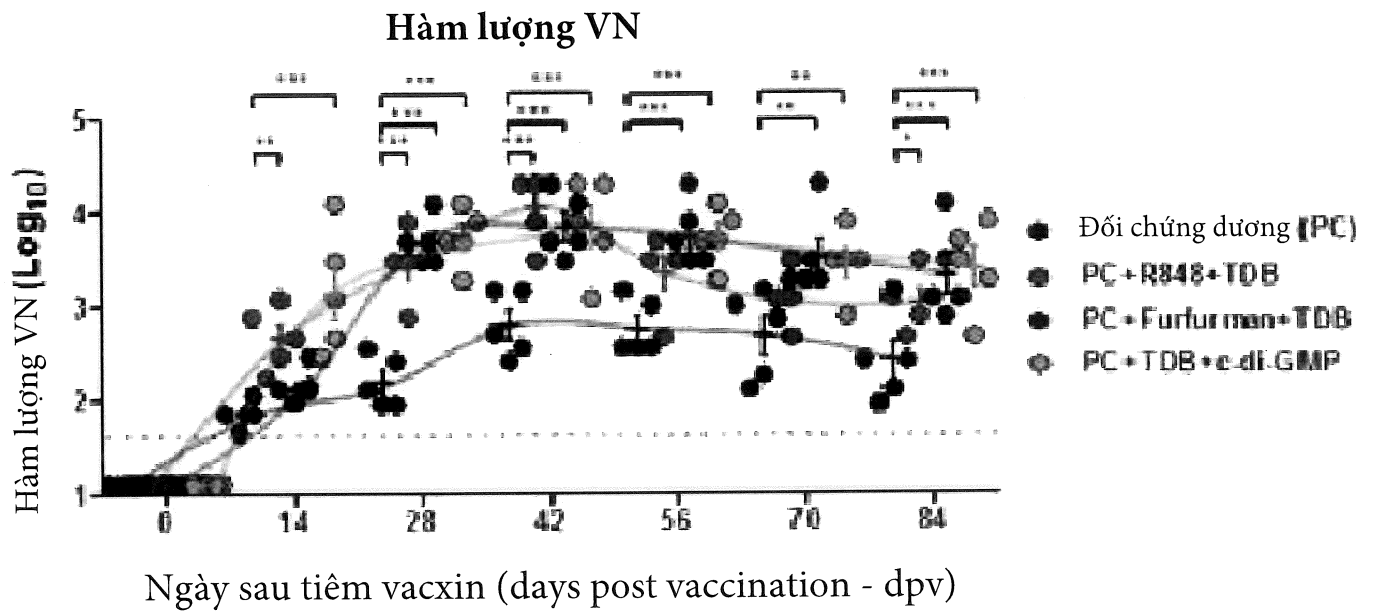


FIG.29