



(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)



1-0026029

(51)⁷ C12N 15/117; A61K 39/12; A61K 39/39; C12Q 1/68; C12N 5/10; A61K 39/02; A61P 37/04 (13) B

-
- (21) 1-2013-02006 (22) 29/12/2011
(86) PCT/EP2011/074211 29/12/2011 (87) WO/2012/089800 05/07/2012
(30) 10197435.0 30/12/2010 EP; 61/430,301 06/01/2011 US
(45) 26/10/2020 391 (43) 25/02/2014 311A
(73) INTERVET INTERNATIONAL B.V. (NL)
Wim de Koerverstraat 35, NL-5831 AN Boxmeer, Netherlands
(72) SCHRIER, Carla Christina (NL); ILG, Thomas Simon (DE).
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)
-

(54) OLIGODEOXYNUCLEOTIT KÍCH THÍCH MIỄN DỊCH, VECTƠ VÀ VACXIN CHỨA OLIGODEOXYNUCLEOTIT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến oligodeoxynucleotit kích thích miễn dịch, vectơ và vacxin chứa oligodeoxynucleotit này để sử dụng làm thuốc để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh truyền nhiễm.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến oligodeoxynucleotit kích thích miễn dịch, vector và vaccin bao gồm oligodeoxynucleotit này được sử dụng làm thuốc để ngăn ngừa hoặc điều trị các bệnh truyền nhiễm.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Trong suốt hai thập kỷ trước, nổi lên trong ngành khoa học miễn dịch là hệ miễn dịch của động vật có xương sống có cơ chế để phát hiện sự truyền nhiễm vi sinh vật và kích hoạt sự hoạt hóa miễn dịch nhanh thông qua sự nhận diện đặc điểm đặc trưng của yếu tố gây bệnh được điều biến bởi thụ thể, được gọi là mô hình phân tử liên quan đến yếu tố gây bệnh (PAMP) tương tác với thụ thể nhận diện yếu tố gây bệnh của vật chủ cùng nguồn (PRR) (Iwasaki A, Medzhitov R. 2001. *Science* **327**, 291-295. Medzhitov R., 2009. *Immunity* **30**, 766-775).

Hiện nay, rõ ràng là các dạng axit deoxyribonucleic (ADN) gây bệnh là một trong số các PAMP này. Vào năm 1995 đã có báo cáo rằng motif CpG không methyl hóa trong ADN vi khuẩn kích hoạt sự hoạt hóa tế bào B của chuột (Krieg et al. 1995). Nghiên cứu này lần đầu tiên phát hiện ra mối liên kết giữa sự nhận diện đặc hiệu của ADN chứa CpG không methyl hóa kích thích miễn dịch của vi khuẩn và sự ức chế CpG được nhận diện trước đó cũng như sự methyl hóa CpG phổ biến ở ADN của động vật có vú. Oligodeoxynucleotit CpG (CpG ODN) không methyl hóa kích thích tế bào B hiệu quả nhất được thể hiện là có yếu tố trình tự GACGTT.

Bài báo khoa học tiếp theo trong lĩnh vực này được công bố bởi phòng thí nghiệm của Shizuo Akira ở Osaka/Japan (Hemmi et al. 2000). Bằng phương pháp tách dòng gen và bất hoạt gen hướng đích ở chuột nhắt, có thể cho thấy rõ ràng rằng sự đáp ứng tế bào ở chuột nhắt đối với CpG-ODN được điều biến bởi thụ thể giống toll 9 (TLR9). Sau đó, đã được thấy rằng các CpG-ODN là các chất chủ vận đối với việc truyền tín hiệu TLR9 một cách ưu thế hơn thông qua con đường NF κ -B (Medzhitov 2001). Trong thập kỷ tiếp theo, nhiều nghiên cứu đã được công bố trên các chủ đề nghiên cứu cơ bản và các ứng dụng trị liệu miễn dịch phổ biến có tiềm năng (ví

dụ xem trong Krieg 2002, 2003, 2006; Klinman 2004, Vollmer 2005, Wilson et al. 2006, Kindrachuk et al. 2008, Dorn và Kippenberger 2008, Vollmer và Krieg 2009, Wilson et al. 2009). Nhiều bài báo tập trung vào các ứng dụng chống truyền nhiễm của CpG-ODN (Krieg 2007), việc sử dụng chất chủ vận TLR9 trong điều trị bệnh ung thư (Krieg 2007, Weiner 2009), hoạt hóa TLR9 để điều trị bệnh hen và bệnh dị ứng (Kline 2007, Kline và Krieg 2008, Fonseca và Kline 2009) và làm tá dược vaccin (Klinman et al. 2004, Klinman 2006, Daubenberger 2007, Wagner 2009, Mutwiri et al. 2009, Klinman et al. 2009).

Các CpG ODN cũng đã được mô tả và được thảo luận là chất kích thích miễn dịch và tá dược vaccin trong ứng dụng cho thú y, cụ thể là bò, lợn, cừu, chó, gà và cá (Babiuk et al. 2003, Carrington và Secombes 2006, Griebel et al. 2005, Mutwiri et al. 2003, Singh và O'Hagan 2003, Werling và Jungi 2003).

Trong lĩnh vực sử dụng cho thú y là gà, việc sử dụng CpG oligodeoxynucleotit, ví dụ, trong vaccin để bảo vệ gà chống lại bệnh Newcastle đã được mô tả (Linghua 2007).

Gần đây đã cho thấy rằng ở gà, TLR21 hoạt động như chất tương tự về mặt chức năng với TLR9 ở động vật có vú trong việc nhận diện CpG oligodeoxynucleotit (Brownlie et al., 2009).

Việc thiết kế các CpG ODN đặc hiệu làm chất điều biến miễn dịch cho đến nay là hoàn toàn ngẫu nhiên. Điều này đặc biệt đúng đối với CpG ODN không từ động vật có vú. Lý do của việc này là do nhiều yếu tố; trước hết là chưa có hiểu biết về mối tương quan giữa các motif CpG điều biến miễn dịch đối với TLR ở người và TLR không phải ở người, chưa kể đến các loài không phải động vật có vú. Thứ hai, không có hệ thống tế bào sẵn có với mức nhiễu nền đủ thấp để kiểm tra chọn lọc hiệu quả của CpG ODN ở các nồng độ rất thấp. Ngoài ra, không có phương pháp sàng lọc hiệu suất cao sẵn có và thậm chí nếu có thì cũng không có mối tương quan rõ ràng giữa hiệu lực *in vivo* với *in vitro* của CpG ODN làm chất điều biến miễn dịch ở các loài không phải động vật có vú.

Vì thế, rõ ràng là cần có CpG ODN mới mà có hiệu quả điều biến miễn dịch cao và do đó có hiệu quả ở liều thấp. Và cần có hệ thống chọn lọc CpG ODN có tính

chọn lọc và độ nhạy cho các mục đích dùng cho thú y mà thể hiện mối tương quan giữa hoạt tính *in vitro* và *in vivo* của hoạt tính CpG.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Một mục đích của sáng chế là đề xuất CpG ODN mới.

Theo khía cạnh này, một phương án của sáng chế đề cập đến oligodeoxynucleotit không methyl hóa kích thích miễn dịch có công thức chung 5' $[N_1]_x [N_7]_r \{N_3 [N_4]_p C G [N_5]_q N_6\}_n [N_8]_s [N_2]_z$ 3' trong đó

mỗi N_1 độc lập là C hoặc G; mỗi N_2 độc lập là C hoặc G; N_3 là T, C hoặc G, với điều kiện là dạng kết hợp trong đó N_3 và N_4 đều là C được loại trừ; mỗi N_4 và N_5 độc lập là C hoặc T; $N_6 = A, T, G$ hoặc C; $N_7 = A, T, C$ hoặc G; $N_8 = A, T, C$ hoặc G; $x = 3-10$; $z = 0-10$; $n = 2-100$; $p = 1-6$, hoặc 1-25 nếu $N_4 = T$; $q = 1-6$, hoặc 1-25 nếu $N_5 = T$; $r = 0-8$, hoặc 1-25 nếu $N_7 = T$ và $s = 0-8$, hoặc 1-25 nếu $N_8 = T$, hoặc muối được dùng của oligodeoxynucleotit này.

Thuật ngữ “oligodeoxynucleotit không methyl hóa kích thích miễn dịch” dùng để chỉ oligodeoxynucleotit, mà chứa trình tự di-nucleotit xytidin-phosphat-guanosin không methyl hóa kích thích sự khởi phát tăng truyền tín hiệu dẫn đến sự hoạt hóa yếu tố phiên mã như NF- κ B hoặc yếu tố điều hòa Interferon 3 (IRF3). Sự hoạt hóa này dẫn đến sự biểu hiện của các xytokin viêm và các sự kiện hoạt hóa tế bào khác. Vị trí liên kết NF- κ B và sự biểu hiện gen bị ảnh hưởng bởi NF- κ B được mô tả bởi Schindler và Baichwal (1994).

Thuật ngữ oligodeoxynucleotit nghĩa là polyme axit nucleic mạch ngắn của deoxynucleotit; tức là phân tử bao gồm nhiều deoxyriboza, được liên kết với nhóm phosphat và với bazơ hữu cơ có thể trao đổi. Bazơ hữu cơ này là pyrimidin được thế hoặc purin được thế. Ví dụ là xytosin và thymin tương ứng adenin và guanin.

Oligonucleotit theo sáng chế có thể bao gồm các cải biến. Ví dụ về các cải biến này là cải biến ở cầu nối phosphodiester giữa các nucleosit nằm ở đầu 3' và/hoặc 5' của nucleosit. Các cải biến này liên quan đến việc thay thế phosphodiester bằng, ví dụ phosphothioat hoặc phosphodithioat.

Các cải biến khác là, ví dụ các thay thế cầu nối phosphodiester bằng cầu nối dephospho. Ví dụ về cầu nối dephospho là các nhóm methylhydroxylamin, formaxetal và dimethylsulfon.

Các cải biến khác nữa là các cải biến liên quan đến việc thay thế bazơ nucleosit tự nhiên bằng bazơ nucleosit không tự nhiên như 5-floxytosin, guanin được thế 7-deaza-7, guanin được thế 7-deaza-8, 2-thiouraxil, dihydrouraxil, 5-bromo-xytosin, xytosin được thế 6, xytosin được thế N₄.

Các cải biến khác nữa là các cải biến liên quan đến việc thay thế nhóm đường; nhóm đường β -riboza hoặc đường β -D-2'-riboza bằng nhóm đường được cải biến như ví dụ L-2'-deoxyriboza hoặc 2'-L-arabinoza.

Sách trình bày thêm về oligonucleotit là ví dụ “PCR Primer: A Laboratory Manual”, tái bản lần thứ hai, 2003, được biên tập bởi Carl W. Dieffenbach, *National Institute of Allergy and Infection Diseases*; Gabriela S. Dreksler, *Uniformed Services University of the Health Sciences*, Cold Spring Harbor Laboratory Press ISBN 978-087969654-2.

Cấu trúc $\{N_3 [N_4]_p C G [N_5]_q N_6\}_n$ mang motif CpG là gốc kích thích miễn dịch có hoạt tính của ODN theo sáng chế. Do đó, sáng chế đề xuất oligodeoxynucleotit kích thích miễn dịch mà bao gồm cấu trúc được gọi là “khung chính”.

Nhận thấy rằng khung chính của oligodeoxynucleotit theo sáng chế, cấu trúc $\{N_3 [N_4]_p C G [N_5]_q N_6\}_n$ phải có mặt ít nhất hai, tốt hơn là ba lần. Do đó, n ít nhất phải bằng hai. Cũng nhận ra rằng hoạt tính của oligodeoxynucleotit tăng khi n tăng. Tác dụng này tăng khi n tăng. Do đó, về cơ bản, số lượng n của cấu trúc khung chính ít nhất phải bằng 2. Tốt hơn là, n nằm trong khoảng $3 \leq n \leq 100$, đơn giản vì thực tế là trình tự tổng hợp càng dài thì càng khó để tạo ra hơn. Trong thực tế, tốt hơn là n nằm trong khoảng $2 \leq n \leq 18$. Tốt hơn nữa là, n nằm trong khoảng $3 \leq n \leq 18$, còn tốt hơn nữa là n nằm trong khoảng $4 \leq n \leq 18$, vẫn còn tốt hơn nữa là n nằm trong khoảng $5 \leq n \leq 18$.

Việc nhận diện CpG ODN theo sáng chế có thể được thực hiện bằng cách sử dụng nhiều hệ thống phát hiện chọn lọc hơn so với các hệ thống hiện đang được sử dụng để phát hiện sự hoạt hóa NF- κ B. Brownlie et al. (2009) mô tả hệ thống chỉ thị

dựa trên luxiferaza NF- κ B. Các hệ thống khác là, ví dụ dựa trên việc đo bản phiên mã IL-8 hoặc sự tiết xytokin hoặc sự phát hiện tiết NO.

Trái ngược với điều này, theo sáng chế hệ thống phát hiện dựa trên phosphataza kiềm được tiết ra (SEAP) được sử dụng. SEAP là enzym chỉ thị trong hệ thống của động vật có vú (Yang et al., 1997). Hệ thống này được phát hiện là có độ nhạy bất ngờ và còn bất ngờ nữa là tạo ra mối tương quan mật thiết giữa hoạt tính *in vitro* và *in vivo* của CpG ODN được thử nghiệm. Hệ thống SEAP được sử dụng với *para*-nitrophenylphosphat (pNPP) làm cơ chất.

Một cải tiến khác đối với các hệ thống sẵn có là việc đưa vào và duy trì ổn định trong tế bào của plasmit mang gen SEAP. Đến nay, tất cả hệ thống phát hiện sử dụng sự chuyển nhiễm tế bào nhanh chóng bằng gen chỉ thị. Nhờ vào việc đưa vào và duy trì ổn định gen chỉ thị trong tế bào mà đến nay lần đầu tiên đường cong liều lượng/đáp ứng có thể được tạo ra. Đường cong này là cần thiết nếu việc so sánh tin cậy giữa các hoạt tính CpG ODN khác nhau cần được thực hiện.

Do đó, phương pháp và các dòng tế bào được mô tả chi tiết trong phần ví dụ của sáng chế lần đầu tiên cho phép thực hiện việc so sánh đặt cạnh nhau đáng tin cậy giữa các CpG ODN khác nhau.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1: Bản đồ plasmit của pcADN3.1(+)-chiTLR21.

Fig.2-5: Tổng quan về hoạt tính SEAP của các dòng tế bào vô tính kháng zeo/G418-kép khác nhau.

Fig.6: Thử nghiệm chuẩn độ bắt đầu ở 2000nM với dòng tế bào vô tính HD11-pNifTyhyg.

Fig.7: Kết quả dòng tế bào vô tính HEK293-pNifTy2-pcADN3.1-chiTLR21 thu được trong thử nghiệm chuẩn độ bắt đầu ở 100nM.

Fig.8: Kết quả dòng tế bào vô tính HD11-pNifTyhyg thu được trong thử nghiệm chuẩn độ bắt đầu ở 2000nM.

Fig.9: Kết quả dòng tế bào vô tính HEK293-pNifTy2-pcADN3.1-chiTLR21 thu được trong thử nghiệm chuẩn độ bắt đầu ở 100nM.

Fig.10: Kết quả dòng tế bào vô tính HD11-pNifTyhyg thu được trong thử nghiệm chuẩn độ bắt đầu ở 2000nM.

Fig.11-15: Kết quả dòng tế bào vô tính HEK293-pNifTy2-pcADN3.1-chiTLR21 thu được trong thử nghiệm chuẩn độ bắt đầu ở 100nM.

Fig.16-17: Kết quả dòng tế bào vô tính HEK293-pNifTy2-pcADN3.1-chiTLR21 thu được trong thử nghiệm chuẩn độ bắt đầu ở 50nM.

Fig.18: Kết quả dòng tế bào vô tính HEK293XL- pUNO-huTLR9-pNifTy2 thu được trong thử nghiệm chuẩn độ bắt đầu ở 50nM.

Fig.19: Kết quả dòng tế bào vô tính HEK293-pNifTy2-pcADN3.1-chiTLR21 thu được trong thử nghiệm chuẩn độ bắt đầu ở 20nM.

Fig.20: Kết quả dòng tế bào vô tính HEK293-pNifTy2-pcADN3.1-chiTLR21 thu được trong thử nghiệm chuẩn độ bắt đầu ở 25nM

Fig.21: Kết quả dòng tế bào vô tính HEK293-pNifTy2-pcADN3.1-chiTLR21 thu được trong thử nghiệm chuẩn độ bắt đầu ở 20nM.

Fig.22: Kết quả dòng tế bào vô tính HEK293-pNifTy2-pcADN3.1-chiTLR21 thu được trong thử nghiệm chuẩn độ bắt đầu ở 20nM.

Fig.23: Hiệu quả của số lượng các T tạo đường biên trime của khung chính.

Fig.24: Hiệu quả của số lượng các T tách các yếu tố CG.

Fig.25: Hiệu quả của số lượng các đoạn lặp TTCGTT.

Fig.26: Hiệu quả của số lượng các đoạn lặp TTCGTT.

Fig.27: Hiệu quả của loại trime lặp lại.

Fig.28: Hiệu quả của số lượng các gốc T ở đường biên của các đoạn lặp lại TTCGTT.

Fig.29: Hiệu quả của số lượng motip ODN-X42.

Fig.30 - 31: Hiệu quả của số lượng motip ODN-X43.

Fig.32: Các biến đổi thêm của ODN-X4.

Mô tả chi tiết sáng chế

Chi tiết hơn về hệ thống được sử dụng được nêu trong phần ví dụ.

Do các phương pháp và các dòng tế bào hiện nay cho phép việc so sánh đặt cạnh nhau đáng tin cậy giữa các CpG ODN khác nhau, có thể xác định rằng oligodeoxynucleotit theo sáng chế trong đó $N_6 = A, T$ hoặc C có mức hoạt tính cao hơn khi $N_6 = G$. Do đó, theo dạng ưu tiên của phương án này, $N_6 = A, T$ hoặc C .

Với lý do tương tự, theo dạng ưu tiên khác, N_3 là T hoặc G ; và $N_6 = Y$ ($Y = C$ hoặc T).

Theo dạng ưu tiên hơn của phương án này, N_3, N_4, N_5 và $N_6 = T$.

Một dạng ưu tiên khác của phương án này đề cập đến oligodeoxynucleotit theo sáng chế trong đó N_3, N_4 và $N_5 = T$ và $N_6 = C$.

Một dạng ưu tiên khác của phương án này đề cập đến oligodeoxynucleotit theo sáng chế trong đó N_3 là G và $N_6 = T$.

Một dạng ưu tiên khác nữa của phương án này đề cập đến oligodeoxynucleotit theo sáng chế trong đó $N_5 = T$ và $N_6 = C$.

Ngoài ra, dạng ưu tiên của phương án này đề cập đến oligodeoxynucleotit theo sáng chế trong đó $N_5 = C, N_6 = C$ và $q = 1$.

Một dạng ưu tiên khác của phương án này đề cập đến oligodeoxynucleotit theo sáng chế trong đó $N_4 = Y$ và $N_5 = Y$.

Dạng ưu tiên hơn của phương án cuối cùng này đề cập đến oligodeoxynucleotit theo sáng chế trong đó $N_4 = T$ và $N_5 = Y$.

Dạng ưu tiên hơn nữa của phương án cuối cùng này đề cập đến oligodeoxynucleotit theo sáng chế trong đó $N_4 = T$ và $N_5 = T$.

Một dạng khác của phương án này đề cập đến oligodeoxynucleotit theo sáng chế trong đó x là 4-7 và $r=0$ hoặc N_7 là A hoặc T .

Dạng ưu tiên của phương án này đề cập đến oligodeoxynucleotit theo sáng chế trong đó x là 6 và $r = 0$ hoặc N_7 là A hoặc T .

Một dạng khác của phương án này đề cập đến oligodeoxynucleotit theo sáng chế trong đó z là 0-6 và $s = 0$ hoặc N_8 là A hoặc T .

Dạng ưu tiên của phương án này đề cập đến oligodeoxynucleotit theo sáng chế trong đó z là 0-3 và $s = 0$ hoặc N_8 là A hoặc T .

Theo một dạng khác nữa của phương án này, N_1 là G.

Theo dạng ưu tiên của phương án này, N_2 là G.

Mặc dù có khoảng rộng số lượng nucleotit ở cả đầu 3' và 5', đã phát hiện ra rằng có khoảng tối ưu của cả hai giá trị này. Đã phát hiện ra rằng nếu $s = 0$ hoặc N_8 là A hoặc T, số lượng nucleotit $[N_2]$ mà tạo ra vùng bên sườn 3' của khung chính của oligodeoxynucleotit theo sáng chế tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0 đến 5 nucleotit, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0 đến 3 nucleotit.

Cũng phát hiện ra rằng nếu $r = 0$ hoặc N_7 là A hoặc T, thì số lượng nucleotit $[N_1]$ mà tạo ra vùng bên sườn 5' của khung chính của oligodeoxynucleotit theo sáng chế có khoảng tối ưu trong vùng nằm trong khoảng từ 4 đến 7 nucleotit.

Theo dạng ưu tiên nhất của phương án này, $r = 0$ hoặc N_7 là A hoặc T, và $s = 0$ hoặc N_8 là A hoặc T, và $n = 5-18$ và $x = 4-7$ và $z = 0-3$.

Như đã nêu trên, một vài loại cải biến trong cầu nối phosphodiester giữa các nucleosit nằm ở đầu 3' và/hoặc 5' của nucleosit có thể thực hiện được. Nhưng về cơ bản, tùy vào cách tổng hợp, các loại liên kết chung thông thường giữa hai nucleotit là: liên kết phosphodiester (PDE) và liên kết phosphothioat (PTO). Để cải thiện độ ổn định và hiệu quả kích thích miễn dịch của CpG ODN, khối tạo thành của oligodeoxynucleotit tổng hợp được cung cấp các phosphothioat, sao cho chúng tạo ra các liên kết PTO.

Tuy nhiên, bất ngờ phát hiện ra rằng, khi chỉ nucleotit $[N_1]$ và nucleotit $[N_2]$ được liên kết bằng các liên kết PTO và các nucleotit khác được liên kết bằng liên kết PDE, hiệu quả của oligodeoxynucleotit theo sáng chế được tăng mạnh. (Trong trường hợp này, liên kết N_1 với N_7 (GT) là PTO, trong khi liên kết N_8 với N_2 (TG) là PDE).

Đây đặc biệt là trường hợp khi nucleotit $[N_1]$ và $[N_2]$ là G.

Do đó, một dạng ưu tiên khác của phương án này đề cập đến oligodeoxynucleotit theo sáng chế trong đó N_1 và/hoặc N_2 có liên kết phosphothioat và các nucleotit còn lại có liên kết phosphodiester.

Đã phát hiện ra rằng đối với oligodeoxynucleotit theo sáng chế, oligodeoxynucleotit có hiệu quả hơn nữa thu được khi $N_7 = T$ và $N_8 = T$.

Vì thế, một dạng ưu tiên khác nữa của phương án này đề cập đến oligodeoxynucleotit theo sáng chế trong đó $N_7 = T$ và $N_8 = T$. Trong trường hợp này, r và s độc lập nằm trong khoảng từ 1 đến 25.

Không nhất thiết là khung chính của oligodeoxynucleotit theo sáng chế, cấu trúc $\{N_3 [N_4]_p C G [N_5]_q N_6\}_n$ phải giống nhau đối với mọi n . Điều này có nghĩa là oligodeoxynucleotit theo sáng chế có thể nhìn giống như sau: $\{T T C G T T\} \{C T C G T G\} \{G T C G T A\}$. Chuỗi gồm ba khung chính khác nhau liên tiếp như vậy được coi là các polyme khác loại. Cấu trúc đuôi của ba bản sao giống nhau sẽ được chỉ định là polyme đồng nhất.

Tốt hơn là, oligodeoxynucleotit theo sáng chế bao gồm polyme đồng nhất $\{N_3 [N_4]_p C G [N_5]_q N_6\}$.

Các CpG oligodeoxynucleotit theo sáng chế trong hầu hết các trường hợp đều có hoạt tính ở lượng nanomol, trong cả hệ thống thử nghiệm in vitro và in vivo. Tuy nhiên, một số CpG oligodeoxynucleotit theo sáng chế có hoạt tính cả ở lượng picomol (dưới nanomol); EC50 của chúng thấp hơn 1nM.

Nồng độ hữu hiệu bán tối đa (EC50) của oligodeoxynucleotit là lượng oligodeoxynucleotit cần để cảm ứng lượng enzym chỉ thị SEAP (mà tạo ra sản phẩm có màu được hấp thụ ở bước sóng 405nm) trong các tế bào chỉ thị (HEK293-pNifty2-TLR21 ở gà hoặc HD11-pNifTy2Hyg) mà tạo ra sự hấp thụ bán tối đa. Nếu EC50 của oligodeoxynucleotit thấp hơn 1nM trong các tế bào này, nó được coi là có hoạt tính ở các lượng picomol (dưới nanomol).

Hầu hết CpG ODN mà khớp với một trong bốn công thức chung được liệt kê dưới đây được thể hiện là tạo ra hiệu quả in vitro ở lượng nanomol:

1) $5' [G]_x \{T T C G T N_6\}_n [G]_z 3'$ trong đó $N_6 = A$ hoặc T , $n = 5-100$, $x = 3-10$, $z = 0-10$

2) $5' [G]_x \{N_3 T C G T C\}_n [G]_z 3'$ trong đó $N_3 = G$ hoặc T , $n = 5-100$, $x = 3-10$, $z = 0-10$

3) $5' [G]_x \{T T C G C C\}_n [G]_z 3'$ trong đó $n = 5-100$, $x = 3-10$, $z = 0-10$

4) $5' [G]_x \{T [T]_p C G [T]_q T\}_n [G]_z 3'$ trong đó $p = 1-10$, $q = 1-10$, $n = 5-100$, $x = 3-10$, $z = 0-10$

Đối với cả bốn công thức này, vì lý do hiệu quả chi phí, n tốt hơn là nằm trong khoảng từ 5 đến 18, X tốt hơn là nằm trong khoảng từ 4 đến 9, từ 5 đến 8, 6 hoặc 7 theo thứ tự ưu tiên, và z tốt hơn là 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 hoặc 0 theo thứ tự ưu tiên. Khi thích hợp, p tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1 đến 5 và q tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1 đến 5.

Oligodeoxynucleotit theo sáng chế rất có thể liên kết với chất mang hoặc bán kháng nguyên (hapten), thông qua nhóm hóa học có tính phản ứng. Các liên kết này tăng cường hiệu quả kích thích miễn dịch của các phân tử được kết hợp.

Ví dụ đơn thuần về các thành phần này là, ví dụ digoxigenin, aminohexyl-, đỏ Texas và biotin.

Các chất mang hoặc bán kháng nguyên được ưu tiên là đỏ Texas được đánh dấu đầu 3' và 5' và digoxigenin được đánh dấu đầu 5'. Liên kết của các oligodeoxynucleotit với bán kháng nguyên/chất mang được biết rộng rãi trong lĩnh vực.

Một phương án khác của sáng chế đề cập đến vectơ chứa oligodeoxynucleotit không metyl hóa kích thích miễn dịch theo sáng chế. Vectơ này có thể là phân tử axit nucleic như plasmit, virus, thể thực khuẩn hoặc vectơ khác bất kỳ được sử dụng trong sinh học phân tử. Chỉ nhằm ví dụ: vectơ chứa oligodeoxynucleotit không metyl hóa kích thích miễn dịch có thể là, ví dụ phân tử ADN như plasmit mà có thể được nhân lên trong vi khuẩn, mà oligodeoxynucleotit không metyl hóa kích thích miễn dịch theo sáng chế được tách dòng vào đó. Plasmit này tốt hơn là có điểm khởi đầu sao chép hoạt động, tạo ra số lượng lớn plasmit có mặt trong vật chủ. Sự phát triển của vi khuẩn này trên quy mô lớn sau đó là sự phân lập plasmit tạo ra phương pháp thay thế để sản xuất tổng hợp oligodeoxynucleotit không metyl hóa kích thích miễn dịch theo sáng chế.

Một trong số các mục đích của sáng chế là đề xuất CpG ODN mới mà có thể được sử dụng làm các thành phần kích thích miễn dịch thành công trong vaccin mà ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh truyền nhiễm cùng với thành phần kháng nguyên hoặc thông tin di truyền mã hóa thành phần kháng nguyên, và chất mang được dùng.

Nhìn chung, thuật ngữ thành phần kháng nguyên dùng để chỉ hợp phần của chất mà chứa ít nhất một epitop mà có thể cảm ứng, kích thích hoặc tăng cường đáp ứng miễn dịch khi được dùng cho người hoặc động vật.

Thành phần kháng nguyên có thể là loại thành phần kháng nguyên bất kỳ nhưng tốt hơn là thu được từ vi sinh vật hoặc virus mà ở dạng kiểu đại của nó sẽ gây bệnh cho người hoặc động vật.

Thành phần kháng nguyên có thể là toàn bộ yếu tố gây bệnh, tốt hơn là ở dạng bị bất hoạt hoặc bị giảm độc lực, phần chiết của yếu tố gây bệnh hoặc protein gây miễn dịch của yếu tố gây bệnh.

Nếu thành phần kháng nguyên là protein gây miễn dịch của yếu tố gây bệnh, protein gây miễn dịch đó tốt hơn là được biểu hiện trong và được thu hồi từ các tế bào được nuôi cấy in vitro.

Do đó, phương án khác đề cập đến vaccin để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh truyền nhiễm khác biệt ở chỗ vaccin này chứa lượng kích thích miễn dịch của oligodeoxynucleotit theo sáng chế và/hoặc vectơ theo sáng chế, lượng gây miễn dịch của thành phần kháng nguyên hoặc thông tin di truyền mã hóa thành phần kháng nguyên, và chất mang được dùng.

Tất nhiên, lượng kích thích miễn dịch của oligodeoxynucleotit và lượng gây miễn dịch của thành phần kháng nguyên có sự liên quan mật thiết. Một trong số các giá trị của sáng chế là sự có mặt của oligodeoxynucleotit theo sáng chế có thể làm giảm lượng thành phần kháng nguyên cần để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh truyền nhiễm.

Lượng thành phần kháng nguyên cần để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh truyền nhiễm được gọi là lượng gây miễn dịch của thành phần kháng nguyên.

Lượng kích thích miễn dịch của oligodeoxynucleotit là lượng mà có khả năng làm giảm lượng gây miễn dịch của thành phần kháng nguyên, tức là lượng thành phần kháng nguyên cần để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh truyền nhiễm.

Vì vậy về cơ bản, cách viết “lượng kích thích miễn dịch của oligodeoxynucleotit” và “lượng gây miễn dịch” phải được xem là có liên quan đến nhau.

Rõ ràng là nếu vaccin chứa thông tin di truyền mã hóa thành phần kháng nguyên, thì lượng thành phần kháng nguyên được biểu hiện bởi thông tin di truyền này cần phải đủ để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh truyền nhiễm, tức là nó phải là lượng gây miễn dịch.

Thực tế là oligodeoxynucleotit không metyl hóa theo sáng chế là kích thích miễn dịch, có nghĩa là chúng tăng cường hiệu quả miễn dịch của các thành phần kháng nguyên trong vaccin. Vì lý do này, vaccin theo sáng chế trong nhiều trường hợp sẽ chứa ít thành phần kháng nguyên hoặc thông tin di truyền mã hóa thành phần kháng nguyên hơn so với trường hợp không có mặt oligodeoxynucleotit theo sáng chế.

Trong một số trường hợp, thành phần kháng nguyên như vậy, mà không bổ sung oligonucleotit kích thích miễn dịch, có thể có đặc tính gây miễn dịch thấp mà lượng cao phải được đưa ra, mặc dù không đạt tới mức độ gây miễn dịch mong muốn. Trong trường hợp này, thành phần kháng nguyên có thể được đưa ra ở nồng độ cao thông thường, tuy nhiên hiện nay cùng với oligodeoxynucleotit theo sáng chế để thu được nồng độ mong muốn của tính gây miễn dịch.

Vì thế, lượng thành phần kháng nguyên hoặc thông tin di truyền mã hóa thành phần kháng nguyên được dùng với oligonucleotit theo sáng chế, theo kinh nghiệm, sẽ bằng hoặc thấp hơn lượng đưa ra khi không có oligonucleotit. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sản xuất vaccin cụ thể sẽ biết lượng cho vaccin cụ thể này. Ngoài ra, các ví dụ đưa ra, ví dụ hướng dẫn đầy đủ về lượng thành phần kháng nguyên được sử dụng, ví dụ trong ba vaccin virus bị bất hoạt khác nhau: vaccin virus gây bệnh Newcastle, vaccin virus viêm phế quản truyền nhiễm và vaccin viêm mũi-khí quản gà tây.

Lượng oligodeoxynucleotit theo sáng chế cần được dùng cùng với thành phần kháng nguyên hoặc thông tin di truyền mã hóa thành phần kháng nguyên này phụ thuộc vào cả oligodeoxynucleotit và thành phần kháng nguyên được chọn.

Lượng oligodeoxynucleotit thích hợp theo sáng chế thường thay đổi trong khoảng từ 1 đến 100 nanomol. Các kết quả *in vivo* rất tốt thu được, ví dụ với lượng từ 1 đến 10 μ g oligodeoxynucleotit theo sáng chế với chiều dài trung bình gồm 30 deoxynucleotit được thể hiện là có hoạt tính trong thử nghiệm *in vitro* trong khoảng nanomol.

Nếu oligodeoxynucleotit được chọn từ nhóm oligodeoxynucleotit có hoạt tính trong khoảng picomol, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ biết rằng lượng thấp hơn, có thể thấp hơn rất nhiều, 1 nanomol, tức là lượng picomol, cần được thử nghiệm trước khi thử nghiệm các lượng nanomol.

Vacxin theo sáng chế chứa chất mang được dụng. Bản chất của chất mang này phụ thuộc vào đường dùng. Nếu đường dùng là qua đường miệng hoặc qua mũi, chất mang có thể chỉ đơn giản là nước vô trùng, dung dịch muối sinh lý hoặc chất đệm. Nếu tiêm là đường dùng được ưu tiên, thì chất mang tốt hơn là đẳng trương và có giới hạn độ pH để nó thích hợp để tiêm. Tuy nhiên, các chất mang này đã được biết rộng rãi trong lĩnh vực.

Ngoài thành phần kháng nguyên hoặc thông tin di truyền mã hóa thành phần kháng nguyên, và oligodeoxynucleotit theo sáng chế, vacxin theo sáng chế có thể chứa cả tá dược. Tá dược thường là các chất giúp tăng cường đáp ứng miễn dịch của vật chủ theo cách không đặc hiệu.

Nhiều tá dược được biết trong lĩnh vực là thích hợp, như tá dược Freund hoàn chỉnh và không hoàn chỉnh, vitamin E, polyme khối không ion và polyamin như dextran sulphat, carbopol và pyran, nhôm hydroxit. Các tá dược cũng thường được sử dụng là alumin phosphat, saponin, dầu thực vật như tocopherol và dầu khoáng. Các tá dược rất hữu hiệu là nhũ tương dầu trong nước và đặc biệt là nhũ tương nước trong dầu, còn được gọi là tá dược dầu trong nước và tá dược nước trong dầu. Các nhũ tương này đã được biết rộng rãi trong lĩnh vực. Vì thế, tốt hơn là, vacxin này chứa tá dược nước trong dầu.

Tốt hơn là, thành phần kháng nguyên là hoặc thu được từ virus hoặc từ vi sinh vật mà dạng kiểu đại của nó gây bệnh ở gia cầm.

Tốt hơn nữa là, virus hoặc vi sinh vật này được chọn từ nhóm bao gồm virus viêm phế quản truyền nhiễm, virus gây bệnh Newcastle, bệnh Bursal truyền nhiễm (bệnh Gumboro), tác nhân gây thiếu máu ở gà, Reovirus gia cầm, *Mycoplasma gallisepticum*, virus viêm mũi-khí quản gà tây, *Haemophilus paragallinarum* (Coryza), virus đậu mùa ở gà, virus viêm não tùy ở gia cầm, virus gây hội chứng giảm đẻ, virus viêm thanh khí quản truyền nhiễm, virus herpes ở gà tây, loài *Eimeria*,

Ornithobacterium rhinotracheale, *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma synoviae*, loài *Salmonella* và *Escherichia coli*.

Phương án khác nữa của sáng chế đề xuất oligodeoxynucleotit không metyl hóa kích thích miễn dịch theo sáng chế được dùng làm thuốc.

Phương án khác nữa của sáng chế đề xuất oligodeoxynucleotit không metyl hóa kích thích miễn dịch theo sáng chế được dùng để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh truyền nhiễm ở gia cầm.

Đến nay, tất cả hệ thống phát hiện đều sử dụng phương pháp chuyển nhiễm tạm thời tế bào với gen chỉ thị. Các hệ thống tạm thời này không cho phép so sánh đặt cạnh nhau đáng tin cậy về hiệu lực của CpG ODN. Như đã nêu trên, sự cải tiến chính so với các hệ thống sẵn có là việc đưa vào và duy trì ổn định plasmit mang gen chỉ thị trong tế bào. Ổn định có nghĩa là plasmit vẫn có mặt trong tế bào sau vài chu kỳ phân chia tế bào.

Một cách thường xuyên, việc duy trì ổn định plasmit thu được bằng cách cho tế bào phát triển dưới áp lực của một hoặc nhiều chất chọn lọc, như chất kháng sinh trong đó gen kháng có mặt trên plasmit. Việc mất plasmit sau đó có thể làm chết tế bào đã bị mất plasmit. Các tế bào sống còn lại sẽ vẫn mang plasmit.

Vì thế, một phương án khác nữa của sáng chế đề xuất tế bào chứa thụ thể TLR21 và plasmit mã hóa gen chỉ thị NF- κ B, plasmit này được duy trì ổn định trong tế bào. Các tế bào này rất thích hợp để sử dụng trong sàng lọc phân tử CpG, cụ thể hơn là sàng lọc phân tử CpG theo sáng chế.

Các ví dụ đưa ra hướng dẫn đầy đủ về cách thu được tế bào chứa plasmit mã hóa gen chỉ thị có thể được duy trì ổn định trong tế bào.

Như đã được nêu trên, hệ thống phát hiện dựa trên phosphataza kiềm được tiết ra (SEAP) được thấy là rất thích hợp cho hệ thống phát hiện được sử dụng.

Vì thế, tốt hơn là gen chỉ thị là gen mã hóa phosphataza kiềm được tiết ra.

Về cơ bản, tế bào hoặc dòng tế bào bất kỳ mang TLR21 mà cho phép đưa vào và tốt hơn là sự duy trì ổn định của plasmit mang gen chỉ thị NF- κ B, tốt hơn là gen SEAP như mô tả ở trên là thích hợp để thử nghiệm CpG ODN đặc hiệu TLR21.

Một ví dụ được ưu tiên của dòng tế bào thích hợp để thử nghiệm CpG ODN đặc hiệu TLR21 là dòng tế bào HD11 ở gà.

Do đó, tốt hơn là dòng tế bào được dùng trong hệ thống phát hiện được sử dụng là dòng tế bào HD11 chứa plasmid ổn định mã hóa gen chỉ thị.

Các dòng tế bào của gà như dòng tế bào HD11 biểu hiện toàn bộ TLR của gà. Trong các điều kiện nhất định, điều này có thể tạo ra hoạt tính cơ bản nhất định.

Do đó, các dòng tế bào không từ gia cầm như dòng tế bào của động vật có vú là các dòng tế bào được ưu tiên hơn. Ví dụ về dòng tế bào động vật có vú này là tế bào HEK293 trong đó TLR21 được tách dòng. Dòng tế bào này có tính chọn lọc đặc hiệu hơn đối với tín hiệu hoạt hóa TLR21.

Do đó, tốt hơn nữa là, dòng tế bào được dùng trong hệ thống phát hiện là dòng tế bào của động vật có vú HEK293 chứa gen chỉ thị được duy trì ổn định và có tế bào HEK293 TLR21 được tách dòng vào đó.

Một phương án khác nữa của sáng chế đề xuất phương pháp phát hiện oligodeoxynucleotit kích thích miễn dịch theo sáng chế, trong đó phương pháp này bao gồm bước a) cho oligodeoxynucleotit tiếp xúc với tế bào theo sáng chế, b) phát hiện mức sản phẩm của gen chỉ thị.

Theo dạng ưu tiên của phương pháp này, sản phẩm của gen chỉ thị là SEAP.

Dạng ưu tiên hơn của phương án này đề xuất phương pháp phát hiện oligodeoxynucleotit kích thích miễn dịch theo sáng chế, trong đó tế bào này là tế bào của dòng tế bào HD11 ở gà, hoặc dòng tế bào HEK293 mà TLR21 ở gà được tách dòng vào đó.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Tách dòng gen và biểu hiện khác loại của TLR21 ở gà

Sự tiến triển gần đây trong nghiên cứu về TLR ở gà gợi ý rằng TLR21 là thể tương đồng về mặt chức năng của TLR9 ở động vật có vú trong các loài gia cầm (Keestra 2008, Brownlie et al. 2009).

Tóm tắt quy trình tách dòng gen TLR21

Dựa trên trình tự cơ sở dữ liệu ngân hàng gen NM_001030558, cặp mồi được tổng hợp để khuếch đại bằng phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) của gen TLR21 ở gà:

Ga-TLR21-for1

GAAGCTTACCATGATGGAGACAGCGGAGAAGGC

Ga-TLR21-rev1

GGCGGCCGCTACATCTGTTTGTCTCCTTCCCTG

Các đoạn mồi được thiết kế để tạo ra vị trí tách dòng giới hạn vùng bên sườn (được gạch chân) và trình tự Kozak (in nghiêng) cho codon khởi đầu và codon kết thúc (in đậm). RT-PCR được thực hiện bằng cách sử dụng các đoạn mồi này và ARN tổng số trong tế bào lách của gà làm khuôn. Sản phẩm PCR có kích thước mong muốn (~ 3000 bp) được tách dòng vào pCR2.1-Topo và 5 dòng plasmid độc lập (P1, P2, P12, P13, P14) được giải trình tự.

Trình tự ADN của TLR21 ở gà, khi được sử dụng.

AAGCTTACCATGATGGAGACAGCGGAGAAGGCATGGCCCAGCACCAGGATGTGC
CCCTCCCACTGCTGTCCACTCTGGCTGCTGCTGCTGGTGACAGTGACACTGATGCC
GATGGTGCACCCGTATGGCTTTCGCAACTGCATTGAGGATGTCAAGGCACCTTTG
TACTTCCGCTGCATCCAGCGCTTCCTGCAGTCGCCGGCCCTGGCAGTGTCTGACCT
GCCACCACATGCCATCGCGCTCAATCTGTCATAACAACAAAATGCGCTGCCTGCAG
CCCTCTGCCTTTGCCCACCTGACACAGCTGCATACCCTGGACCTGACCTACAACCT
CCTGGAGACCCTCTCCCCTGGTGCCTTCAATGGGCTGGGTGTGCTGGTGGTGTGCTG
GACCTGTCTCACAACAAGCTGACCACACTTGCTGAAGGGGTGTTCAACAGCTTGG
GCAACCTGTCCTCGCTGCAGGTACAACATAACCCCTCAGCACGGTGTACCAAG
TGCTCTGCTACCCCTGGTCAACCTGCGCCGCCTGTCTCTACGGGGCGGGCGGCTG
AATGGGTTGGGGGCAGTGGCAGTGGCAGTGCAGGGCTTGGCACAGCTGGAGCTG
TTGGACCTATGTGAAAACAACCTGACAACGCTGGGGCCAGGCCACCGCTACCCG
CCTCGCTGCTCACCTGCAGCTGTGCAACAACCTCGCTGAGGGAGTTAGCGGGGGG
CAGCCCGGAGATGCTATGGCACGTGAAGATACTCGACCTCTCCTACAACAGTATC
TCACAGGCGGAGGTCTTACCCAGCTCCACCTGCGCAACATCAGCCTGCTCCACC
TGATCGGCAACCCCTTGGATGTCTTCCACCTGTTGGACATCTCTGACATCCAACCT
CGCAGCCTGGATTTCTCTGGGTGGTGTGCTGGGGGCTCAGGGGCTGGATAAGGTGT
GCCTGAGGCTGCAGGGTCCCCAGGCCTTGCGGCGGCTGCAGCTACAACGCAACG
GGCTGAAGGTGCTGCATTGTAATGCACTGCAGTTGTGTCCTGTGCTGAGAGAGCT

GGACCTGTCCTGGAACCGGCTACAGCACGTGGGCTGTGCCGGCCGGCTGCTGGGC
AAGAAGCAGCGGGAGAAGCTGGAAGTGCTGACAGTGGAACACAACCTGCTGAAG
AAACTGCCGTCTTGCTGGGGGCCCAGGTGCTGCCTCGGCTGTACAACATTTCTT
CCGCTTTAACCGCATCCTGACTGTTGGGCCCCAAGCCTTTGCCTACGCCCCGGCCC
TGCAGGTGTTGTGGCTCAATATTAACAGCCTGGTGTGGCTGGACAGGCAGGCACT
GTGGAGGCTGCACAACCTGACAGAGCTGCGCCTGGACAACAACCTGCTGACCGA
CCTCTATCACAACCTCCTTCATTGACCTCCACAGACTGCGCACCCCTCAACCTGCGCA
ACAACCGTGTCTCCGTCCTCTTCTCTGGTGTCTTCCAGGGGCTGGCTGAGCTGCAG
ACGCTGGATTTAGGGGGCAACAACCTGCGCCACCTGACTGCACAGTCACTGCAGG
GGCTGCCCCAACTGCGCAGGCTGTACCTGGACCGCAACAGATTGCTGGAGGTGA
GCAGCACTGTGTTGCCCCAGTGCAGGCTACCCTGGGGGTGCTGGACCTGCGGGC
CAACAACCTGCAGTACATCTCACAGTGGCTGCGCAAGCCGCCACCCTTCCGCAAC
CTGAGCAGCCTGTACGACCTGAAGCTGCAGGCGCAGCAGCCCTATGGACTGAAG
ATGCTGCCTCACTACTTCTTCCAGGGGCTTGGTGAGGCTGCAGCAGCTGTCGCTGTC
ACAGAACATGCTGCGGTCCATCCCACCGGATGTCTTCGAGGACTTGGGCCAGCTG
CGCTCCCTGGCATTGGCTGACAGCAGCAATGGGCTGCATGACCTGCCTGACGGCA
TCTTCAGAAACCTGGGCAACCTGCGGTTCTTGGACCTGGAGAATGCAGGGGCTGCA
CTCGCTCACTCTGGAAGTCTTCGGCAATCTCAGCCGGCTGCAGGTGCTGCACTTG
GCCAGAAACGAGCTGAAGACCTTCAATGACAGCGTTGCCAGCCGGCTGTCCTCCT
TGCGCTACCTGGACCTGCGCAAGTGTCCGCTCAGCTGCACCTGTGACAACATGTG
GCTGCAGGGCTGGCTGAACAACAGCCGTGTGCAGGTTGTCTACCCCTACAACCTAC
ACCTGTGGCTCACAGCACAATGCCTACATCCACAGCTTTGACACACACGTCTGCT
TCCTGGACCTGGGGCTCTATCTCTTTGCTGGGACTGCACCGGCAGTGCTGCTGCTG
CTGGTGGTGCCGGTGGTGTACCACCGCGCCTACTGGAGGCTGAAGTACCACTGGT
ACCTTCTGCGGTGCTGGGTCAACCAGCGGTGGCGGCGGGAGGAAAAGTGCTACC
TCTATGACAGCTTTGTGTCTACAATTCAGCTGATGAAAGTTGGGTGTTGCAGAA
GCTGGTGCCTGAGCTGGAGCACGGTGCCTTCCGCTCTGCTTGCAACCACCGCGAC
TTCCAGCCGGGCGCAGCATCATTGACAACATTGTGGATGCTGTCTACAACAGCC
GGAAGACGGTGTGCGTGGTGAGCCGCAGCTACCTGCGCAGCGAGTGGTGCTCTCT
AGAGGTGCAGTTGGCCAGCTACCGGCTGTTGGATGAGCGGCGTGACATCCTGGTA
CTGGTGCTGCTGGAGGACGTGGGTGATGCTGAGCTGTCTGCCTACCACCGCATGC
GGCGGGTGCTGCTGCGGCGCACCTACCTGCGCTGGCCTCTTGACCCCGCAGCTCA
GCCGCTCTTTTGGGCACGGCTGAAGAGGGCACTGAGGTGGGGAGAGGGAGGAGA
GGAGGAGGAAGAAGAAGGTTTGGGTGGAGGGACGGGAAGGCCAGGGAAGGAG
ACAAACAGATGTAGCGGCCGC

Chuyển nhiễm HEK293-pNifTy2-Zeo (dòng tế bào vô tính) với pcADN3.1(+)-Neo-chiTLR21

Tế bào thận phôi người (HEK) 293 được tạo ra vào những năm 1970 bằng cách biến nạp virus (Graham et al., 1977), và đến nay là có sẵn cho cộng đồng nghiên cứu thông qua kho chứa dòng tế bào, như ATCC.

pNifty2 là plasmid mà cho phép phát hiện sự hoạt hóa yếu tố phiên mã NF κ B, là dấu hiệu của nhiều hoạt động kích thích miễn dịch, sự hoạt hóa thụ thể giống toll là một trong số chúng. Gen chỉ thị trong pNifTy2 phụ thuộc vào sự hoạt hóa NF κ B trong quá trình phiên mã/dịch mã của nó là phosphatase kiềm được tiết (SEAP). Chi tiết được mô tả trong trang thông tin của công ty bán plasmid này: Invivogen. Sự kiện biến nạp/chuyển nhiễm bởi pNifty2 được chọn ở cả tế bào vi khuẩn và tế bào động vật có vú bằng cách bổ sung zeoxin vào môi trường sinh trưởng.

Các tế bào HEK293 được chuyển nhiễm với pNifTy2 bằng phương pháp chuẩn (chuyển gen qua liposom), dòng tế bào ổn định được chọn, chức năng của trục NF- κ B/SEAP được thiết lập bằng cách kích thích bằng yếu tố hoại tử khối u ở người α (Sigma). SEAP được tiết trong dịch nổi bề mặt nuôi cấy của các tế bào được kích thích được xác định bằng thử nghiệm đo màu trên đĩa vi chuẩn độ sử dụng cơ chất sinh màu p-nitrophenylphosphat (pNPP, 5mM) trong chất đệm kiềm (NaHCO₃ 50mM, độ pH bằng 9,6, MgCl₂ 2mM). Sự tăng màu (λ = 405nm) được giám sát bởi thiết bị đọc đĩa vi chuẩn độ. Kết quả đọc này cũng được sử dụng để lựa chọn các dòng vô tính (bằng phương pháp pha loãng giới hạn) có tỷ lệ tín hiệu trên độ nhiễu cao. Một trong số các dòng được chọn này (dòng được làm phẳng 11) sau đó được sử dụng để nghiên cứu thêm với TLR21 ở gà.

pcADN3.1(+)-neo là vector biểu hiện ở động vật có vú chuẩn được mua từ Invitrogen. Việc tách dòng phụ gen TLR21 ở gà vào vector này được thực hiện thông qua việc kẹp sườn vị trí Hind III (codon khởi đầu) và Not I (codon kết thúc) được đưa vào bằng PCR. (Xem Fig.1).

Sau đó, plasmid này được chuyển nhiễm (chuyển gen qua liposom) vào dòng tế bào vô tính HEK293-pNifty2-zeo, và các tế bào tái tổ hợp được chọn lọc bằng cách bổ sung cả zeoxin và G418 vào môi trường sinh trưởng. Chức năng của dòng tế bào tái tổ hợp đa dòng thu được được đánh giá bằng cách kích thích nuôi cấy bằng ODN-X4 và

ODN-HEK1-PTO và phát hiện SEAP. Các dòng vô tính vượt trội sau đó được nhận diện bằng phương pháp pha loãng giới hạn, sau đó kích thích và phát hiện SEAP.

SEAP là enzym chỉ thị trong hệ thống của động vật có vú (Yang et al., 1997). SEAP là dạng được tiết ra của phosphatase kiềm ở phôi người. Ưu điểm chính của nó là tính ổn định cao và hoạt tính đặc hiệu cực cao, đảm bảo độ nhạy và độ chắc chắn trong việc phát hiện. Một số cơ chất đã được mô tả để phát hiện SEAP, nhưng pNPP có tính kinh tế và chắc chắn được chọn lọc, do sản phẩm phản ứng của nó p-nitrophenolat được phát hiện có độ nhạy cao ($\epsilon_{405} = 18500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Trong các cài đặt thử nghiệm, tác giả sáng chế thực hiện các thử nghiệm động học, do chúng tạo ra khoảng định lượng động học rộng hơn.

Các tế bào HEK293-pNifTy2-Zeo được chuyển nhiễm với pcADN3.1(+)-Neo-chiTLR21 (được đuôi thẳng bằng Pvu I) và dòng tế bào đa dòng được chọn bằng cách bổ sung vào môi trường 350 $\mu\text{g/ml}$ zeoxin và 600 $\mu\text{g/ml}$ G418. Thử nghiệm chức năng được thực hiện bằng cách kích thích tế bào bằng ODN-X4 (PDE) và ODN-HEK1 (PTO). Phosphatase kiềm được tiết ra (SEAP) được sản xuất bởi các tế bào được chọn, nhưng không phải bởi dòng tế bào HEK293-pNifTy2-Zeo bố mẹ. Việc tách dòng tế bào đơn được thực hiện và các dòng riêng rẽ được phân tích sự đáp ứng của chúng đối với ODN-X4 (PDE) (GGGGGGTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTGGGGG) và ODN-HEK1 (PTO) (TCGTCGTTTTGTCGTTTGTCTGTT).

Trong số 46 dòng tế bào vô tính kháng zeo/G418-kép, chỉ có 3 dòng là đáp ứng rõ ràng với sự kích thích bằng ODN, trong khi 3 – 4 dòng tế bào khác thể hiện các tín hiệu yếu hơn. Do đó, 85% các dòng được chọn không có chức năng.

Trong tất cả các nghiên cứu tiếp theo, dòng tế bào vô tính 38, tạo ra tín hiệu đọc SEAP cao nhất đối với việc đáp ứng với kích thích ODN-X4 (PDE) và ODN-HEK1 (PTO), được sử dụng.

Fig.2 đến Fig.5 là tổng quan về hoạt tính SEAP của các dòng tế bào vô tính kháng zeo/G418-kép khác nhau.

Ví dụ 2: Phân tích sự ảnh hưởng của bản chất N₃-N₆ đối với hoạt tính

Các PDE CpG-ODN sau được thử nghiệm:

ODN-X1	GGGGGGGAC CG TCGAC CG TCGAC CG TCGGGGG (,chuột')
ODN-X2	GGGGGGGT CG TTGT CG TTGT CG TTGGGGG (,người')
ODN-X3	GGGGGGAAC CG TTAAC CG TTAAC CG TTGGGGG
ODN-X4	GGGGGGTT CG TTTT CG TTTT CG TTGGGGG
ODN-X5	GGGGGGAAC CG AAAA CG AAAA CG AAGGGGG
ODN-X6	GGGGGGCG CG CGCG CG CGCG CG CGGGGGG
ODN-X7	GGGGGGTT CG AATT CG AATT CG AAGGGGG

Hơn nữa, dùng làm đối chứng, phiên bản PDE của ODN-2006 (CpG7909), mà bản sao PTO của nó là ứng viên được chất/vacxin trong việc điều trị khối u ở người được sử dụng làm đối chứng dương, trong khi bản sao GpC của nó được sử dụng làm đối chứng âm (ODN2006-đối chứng).

Với dòng tế bào vô tính HD11-pNifTyhyg, kết quả thu được trong thử nghiệm chuẩn độ bắt đầu ở 2000nM được thể hiện trên Fig.6.

Sự xếp loại hoạt tính được dựa trên thử nghiệm này:

ODN-X4 > ODN-X2 > ODN-X1 >> ODN-2006 (PDE)

Hoạt tính thấp hơn:

ODN-X3, ODN-X5, ODN-X6, ODN-X7, ODN-2006-đối chứng (PDE)

Với dòng tế bào vô tính HEK293-pNifTy2-pcADN3.1-chiTLR21, kết quả thu được trong thử nghiệm chuẩn độ bắt đầu ở 100nM được thể hiện trên Fig.7.

Sự xếp loại hoạt tính được dựa trên thử nghiệm này:

ODN-X4 >> ODN-X2

Hoạt tính thấp hơn:

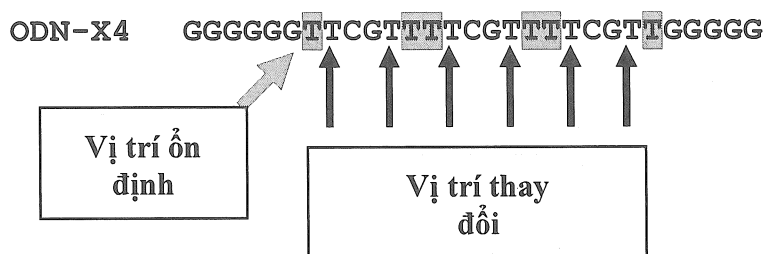
ODN-X1, ODN-X3, ODN-X5, ODN-X6, ODN-X7

Cùng với nhau, từ các thử nghiệm này, PDE CpG ODN-X4, và không phải là (ODN-X1) ở chuột và (ODN-X2) ở người điển hình được chứng tỏ là chất phản ứng có hiệu quả nhất ở cả dòng tế bào HD11 ở gà và ở hệ thống thử nghiệm TLR21 ở gà khác loại.

Ví dụ 3: Vai trò của các nucleotit liền kề với motif CpG

Để nhận diện hoạt tính của các motif trình tự hexanucleotit khác nhau đối với các tế bào HD11 ở gà và TLR21 ở gà được biểu hiện khác loại, các dẫn xuất được tạo ra ở các vị trí ngay sát của yếu tố CpG được hoán vị:

Dựa trên motif [TNCCNT]₃



ODN-Y1	GGGGGGTGC CG GTTG CG GTTG CG GTTGGGGG
ODN-Y2	GGGGGGTAC CG GTTAC CG GTTAC CG GTTGGGGG
ODN-Y3	GGGGGGTT CG GTTT CG GTTT CG GTTGGGGG
ODN-Y4	GGGGGGTCC CG GTTCC CG GTTCC CG GTTGGGGG
ODN-Y5	GGGGGGTGC CG ATTG CG ATTG CG ATGGGGG
ODN-Y6	GGGGGGTAC CG ATTAC CG ATTAC CG ATGGGGG
ODN-Y7	GGGGGGTT CG ATTT CG ATTT CG ATGGGGG
ODN-Y8	GGGGGGTCC CG ATTCC CG ATTCC CG ATGGGGG
ODN-Y9	GGGGGGTGC CG TTTTC CG TTTTC CG TTTGGGGG
ODN-Y10	GGGGGGTAC CG TTTTC CG TTTTC CG TTTGGGGG
ODN-Y11	GGGGGGTT CG TTTTT CG TTTTT CG TTTGGGGG
ODN-Y12	GGGGGGTCC CG TTTTC CG TTTTC CG TTTGGGGG
ODN-Y13	GGGGGGTGC CG CTTG CG CTTG CG CTGGGGG
ODN-Y14	GGGGGGTAC CG CTTAC CG CTTAC CG CTGGGGG
ODN-Y15	GGGGGGTT CG CTTTT CG CTTTT CG CTGGGGG
ODN-Y16	GGGGGGTCC CG CTTCC CG CTTCC CG CTGGGGG

Cần chỉ ra ở đây rằng, sự hoán vị của các trình tự này dẫn đến một trường hợp trở lại motif ODN-X4 (⇒ ODN-Y11).

Với dòng tế bào vô tính HD11-pNifTyhyg, kết quả thu được trong thử nghiệm chuẩn độ bắt đầu ở 2000nM được thể hiện trên Fig.8.

Sự xếp loại hoạt tính được dựa trên thử nghiệm này trong HD11-pNiftyhyg:

ODN-Y11 (= ODN-X4) > ODN-Y15 > ODN-Y12 > ODN-Y9 > ODN-Y3 > ODN-Y16 > ODN-Y7 ~ ODN-Y6 ~ ODN-Y10 ~ ODN-Y14 > ODN-Y8 ~ ODN-Y5

Hoạt tính thấp hơn: ODN-Y1, ODN-Y2, ODN-Y4, ODN-Y13

Với dòng tế bào vô tính HEK293-pNifTy2-pcDNA3.1-chiTLR21, kết quả thu được trong thử nghiệm chuẩn độ bắt đầu ở 100nM được thể hiện trên Fig.9.

Sự xếp loại hoạt tính được dựa trên thử nghiệm này: trong HEK293-pNifty2-pcADN3.1-chiTLR21: ODN-Y11 (= ODN-X4) >> ODN-Y15 > ODN-Y9 > ODN-Y12 > ODN-Y14 ~ ODN-Y6 > ODN-Y7 ~ ODN-Y8 ~ ODN-Y10 ~ ODN-Y16 > ODN-Y3~ ODN-Y5

Hoạt tính thấp hơn: ODN-Y1, ODN-Y2, ODN-Y4, ODN-Y13

Cùng với nhau, từ cả hai hệ thống thử nghiệm, các kết luận tương tự có thể được rút ra:

ODN-Y11, giống với ODN-X4, được xác nhận là chất kích thích mạnh nhất của đại thực bào HD11 và của tế bào HEK293 mà biểu hiện khác loại TLR21 ở gà. Rõ ràng là khả năng phân biệt của dòng tế bào vô tính HEK293-pNifTy2-pcADN3.1-chiTLR21 là cao hơn của HD11-pNiftyhyg.

Ví dụ 4: Vai trò của các vị trí liền kề đầu 3' của yếu tố TpCpGpT trong ODN-X4

Để nhận diện hơn nữa motif trình tự hexanucleotit được ưu tiên đối với các tế bào HD11 ở gà và TLR21 ở gà được biểu hiện khác loại, các vị trí liền kề đầu 3' của yếu tố TpCpGpT trong ODN-X4 được hoán vị:

Dựa trên motif (TTCGTN)₃

ODN-X4	GGGGGGTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTGGGGG
ODN-X41	GGGGGGTTCGTGTTTCGTGTTTCGTGGGGG
ODN-X42	GGGGGGTTCGTATTTCGTATTTCGTAGGGGG
ODN-X43	GGGGGGTTCGTCTTCGTCTTCGTCTGGGGG

Với dòng tế bào vô tính HD11-pNifTyhyg, kết quả thu được trong thử nghiệm chuẩn độ bắt đầu ở 2000nM được thể hiện trên Fig.10.

Sự xếp loại hoạt tính được dựa trên thử nghiệm này trong HD11-pNiftyhyg:
ODN-X4 ~ ODN-X43 > ODN-X42 ~ ODN-X41

Với dòng tế bào vô tính HEK293-pNifTy2-pcADN3.1-chiTLR21, kết quả thu được trong thử nghiệm chuẩn độ bắt đầu ở 100nM được thể hiện trên Fig.11.

Sự xếp loại hoạt tính được dựa trên thử nghiệm này trong HEK293-pNifTy2-pcDNA3.1-chiTLR21: ODN-X43 >> ODN-X4 ~ ODN-X42 > ODN-X41

Ví dụ 5: Vai trò của các vị trí liền kề đầu 5' của yếu tố TpCpGpT trong ODN-X4

Để nhận diện hơn nữa motif trình tự hexanucleotit đối với các tế bào HD11 ở gà, các vị trí liền kề đầu 5' của yếu tố TpCpGpT trong ODN-X4 được hoán vị:

Dựa trên motif (NTCGTT)₃

ODN-X2	GGGGGGGTCGTTGTCGTTGTCGTTGGGGG
ODN-X24	GGGGGGATCGTTATCGTTATCGTTGGGGG
ODN-X25	GGGGGGCTCGTTCTCGTTCTCGTTGGGGG
ODN-X26/4	GGGGGGTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTGGGGG

Với dòng tế bào vô tính HEK293-pNifTy2-pcADN3.1-chiTLR21, kết quả thu được trong thử nghiệm chuẩn độ bắt đầu ở 100nM được thể hiện trên Fig.12.

Sự xếp loại hoạt tính được dựa trên thử nghiệm này trong HEK293-pNifTy2-pcADN3.1-chiTLR21: ODN-X4 >> ODN-X25 > ODN-X2 > ODN-X24

Ví dụ 6: Hiệu quả của việc làm ngắn hoặc xóa 5'-dG₆

Để mô tả thêm đặc điểm mối quan hệ cấu trúc-hoạt tính (SAR) cho PDE-ODN X4 trong các tế bào HD11 ở gà và TLR21 ở gà được biểu hiện khác loại, hiệu quả của việc làm ngắn hoặc xóa 5'-dG₆ được kiểm tra.

ODN-X4	GGGGGGTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTGGGGG
ODN-X4-5MIN1	GGGGGTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTGGGGG
ODN-X4-5MIN2	GGGGTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTGGGGG
ODN-X4-5MIN3	GGGTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTGGGGG
ODN-X4-5MIN4	GGTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTGGGGG
ODN-X4-5MIN5	GTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTGGGGG
ODN-X4-5MIN6	TTCGTTTTTCGTTTTTCGTTGGGGG

Với dòng tế bào vô tính HEK293-pNifTy2-pcADN3.1-chiTLR21, kết quả thu được trong thử nghiệm chuẩn độ bắt đầu ở 100nM được thể hiện trên Fig.13.

Sự xếp loại hoạt tính được dựa trên thử nghiệm này trong HEK293-pNifTy2-pcADN3.1-chiTLR21: ODN-X4 > ODN-X4-5'-1 > ODN-X4-5'-2 > ODN-X4-5'-3 >> ODN-X4-5'-4 > ODN-X4-5'-6 ≈ ODN-X4-5'-5.

ODN X4-5'-4-6 có hoạt tính thấp hơn trong khoảng nồng độ này.

Ví dụ 7: Hiệu quả của việc làm ngắn hoặc xóa 3'-dG₅

Để mô tả thêm đặc điểm mối quan hệ cấu trúc-hoạt tính (SAR) cho PDE-ODN X4 trong các tế bào HD11 ở gà và TLR21 ở gà được biểu hiện khác loại, hiệu quả của việc làm ngắn hoặc xóa 3'-dG₅ được kiểm tra.

ODN-X4-3MIN1 GGGGGGTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTGGGGG
 ODN-X4-3MIN1 GGGGGGTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTGGGG
 ODN-X4-3MIN2 GGGGGGTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTGGG
 ODN-X4-3MIN3 GGGGGGTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTGG
 ODN-X4-3MIN4 GGGGGGTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTG
 ODN-X4-3MIN5 GGGGGGTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTT

Với dòng tế bào vô tính HEK293-pNifTy2-pcADN3.1-chiTLR21, kết quả thu được trong thử nghiệm chuẩn độ bắt đầu ở 100nM được thể hiện trên Fig.14.

Sự xếp loại hoạt tính được dựa trên thử nghiệm này trong HEK293-pNifTy2-pcADN3.1-chiTLR21: ODN-X4-5'-5 $\approx$ ODN-X4-5'-4 $\approx$ ODN-X4-5'-3 $\approx$ ODN-X4-5'-2 > ODN-X4-5'-1 > ODN-X4

ODN X4-minusG thiếu cả 3'dG₆ và 3'dG₅ có hoạt tính thấp hơn trong khoảng nồng độ này.

Ngoài ra, cũng được kiểm tra xem liệu các G bổ sung trong 5'-dG₆ và 3'-dG₅ có hiệu quả hay không:

ODN-X4 GGGGGGTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTGGGGG
 ODN-X4-plus1 GGGGGGGTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTGGGGGG
 ODN-X4-plus2 GGGGGGGGTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTGGGGGGG

Với dòng tế bào vô tính HEK293-pNifTy2-pcADN3.1-chiTLR21, kết quả thu được trong thử nghiệm chuẩn độ bắt đầu ở 100nM được thể hiện trên Fig.15.

Trong khi bổ sung một G ở cả hai phía của ODN-X4 không có lợi cũng không có hại đối với hoạt tính kích thích trong HEK293-pNifTy2-pcADN3.1-chiTLR21, việc bổ sung hai G dường như khiến cho phân tử có hoạt lực thấp hơn.

Ví dụ 8: Thay thế liên kết phosphodiester (PDE) bằng chất tương tự phosphothioat (PTO)

Để cải thiện độ ổn định và khả năng kích thích miễn dịch của CpG-ODN, sự thay thế liên kết phosphodiester (PDE) bằng chất tương tự phosphothioat (PTO) được kiểm tra. Để mô tả thêm đặc điểm khía cạnh về mối quan hệ cấu trúc-hoạt tính (SAR) đối với PDE-ODN X4 trong đại thực bào HD11-pNifTyhyg ở gà và TLR21 ở gà được biểu hiện khác loại, hiệu quả của việc thay thế tất cả các liên kết PDE bằng PTO

(ODN-X4-PTO) và các liên kết PDE bằng chỉ PTO trong các lần chạy 5'-dG₆ và 3'-dG₅ (ODN-X4-PTO-G duy nhất) được kiểm tra.

Với dòng tế bào vô tính HEK293-pNifTy2-pcADN3.1-chiTLR21, kết quả thu được trong thử nghiệm chuẩn độ bắt đầu ở 50nM được thể hiện trên Fig.16.

Trong hệ thống kết quả đọc này, hoạt lực thấp hơn của X4-PTO so với X4-PDE được phát hiện. X4-PTO-G duy nhất chứng minh là có hoạt lực trong HEK293-pNifTy2-pcADN3.1-chiTLR21 cao hơn X4-PDE bố mẹ.

Xếp loại hoạt lực in vitro:

ODN-X4-PTO-G_{duy nhất} > ODN-X4 (PDE) > ODN-X4-PTO

Ví dụ 9: Kiểm tra tính đặc hiệu loài của ODN-X4 (PDE)

Để kiểm tra tính đặc hiệu loài của tế bào ODN-X4 (PDE), HEK293-XL-pUNO-TLR9 ở người được mua, sau đó được chuyển nhiễm với pNifTy2, sự đáp ứng của chúng đối với các PTO-CpG trong tài liệu được thiết lập, các dòng tế bào chức năng vô tính được tạo ra và một trong số chúng được sử dụng cho các thử nghiệm so sánh với HEK293-pNifTy2-pcADN3.1-chiTLR21.

Trong các thử nghiệm so sánh này, ngoài ODN-X4 (PDE), các thiết lập rõ đối với PTO-ODN 2006 (= CpG7909) và 2007 hoạt lực cao ở TLR9 ở người và bản sao đối chứng GpC của chúng được sử dụng.

Với dòng tế bào vô tính HEK293-pNifTy2-pcADN3.1-chiTLR21, kết quả thu được trong thử nghiệm chuẩn độ bắt đầu ở 50nM được thể hiện trên Fig.17.

Thứ tự xếp loại hoạt tính sau đây thu được:

ODN-X4 (PDE) ~ PTO-2006 > PTO-2007.

PTO-ODN 2006 và 2007 đối chứng GpC là không có hoạt tính trong các khoảng nồng độ được xem xét ở đây.

Với dòng tế bào vô tính HEK293XL-pUNO-huTLR9-pNifTy2, kết quả thu được trong thử nghiệm chuẩn độ bắt đầu ở 50nM được thể hiện trên Fig.18.

Thứ tự xếp loại hoạt tính sau đây thu được:

PTO-2006 > PTO-2007.

PTO-ODN 2006 và 2007 đối chứng GpC và ODN-X4 (PDE) là không có hoạt tính trong các khoảng nồng độ được xem xét.

Kết quả này đã chứng tỏ tính đặc hiệu loài của ODN-X4 (PDE) ở gà.

Ví dụ 10: Kiểm tra số lượng tối ưu của các đoạn lặp TTCGTT

Để kiểm tra số lượng tối ưu của các đoạn lặp TTCGTT, các cấu trúc sau được tạo ra:

1 X4-đơn	GGGGGGTTCGTTGGGGG
2 X4-đôi	GGGGGGTTCGTTTTTCGTTGGGGG
3 X4-ba	GGGGGGTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTGGGGG
4 X4-bốn	GGGGGGTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTGGGGG
5 X4-năm	GGGGGGTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTGGGGG
6 X4-sáu	GGGGGGTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTGGGGG

Với dòng tế bào vô tính HEK293-pNifTy2-pcDNA3.1-chiTLR21, kết quả thu được trong thử nghiệm chuẩn độ bắt đầu ở 20nM được thể hiện trên Fig.19,

Sự xếp loại hoạt lực kích thích sau đây được nhận diện đối với HEK293-pNifTy2-pcDNA3.1-chiTLR21:

X4-sáu ~ X4-năm > X4-bốn > X4-ba (= X4 'cổ điển')

X4-đôi và X4-đơn là không có hoạt tính ở các nồng độ thử nghiệm được áp dụng ở đây.

Ví dụ 11: Hiệu quả của số lượng các T phân tách

Để kiểm tra hiệu quả của số lượng các T phân tách motif CpG, các cấu trúc sau được tạo ra:

1 X4-Li1	GGGGGGTTCGTCGTCGTTGGGGG
2 X4-Li2	GGGGGGTTCGTTTCGTTTCGTTGGGGG
3 X4-Li3	GGGGGGTTCGTTTTCGTTTTCGTTGGGGG
4 X4-Li4	GGGGGGTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTGGGGG
5 X4-Li5	GGGGGGTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTGGGGG
6 X4-Li6	GGGGGGTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTGGGGG

Với dòng tế bào vô tính HEK293-pNifTy2-pcADN3.1-chiTLR21, kết quả sau đây thu được trong thử nghiệm chuẩn độ bắt đầu ở 25nM được thể hiện trên Fig.20.

Sự xếp loại hoạt lực kích thích sau đây được nhận diện đối với HEK293-pNifTy2-pcADN3.1-chiTLR21:

$X4-Li6 \sim X4-Li5 \sim X4-Li4 (= X4 \text{ “cổ điển”}) > X4-Li3 > X4-Li2 \sim X4-Li1$

Ví dụ 12: Kiểm tra số lượng tối ưu của các gốc T ở đường biên với các lần chạy dG

Để kiểm tra số lượng tối ưu của các gốc T ở đường biên với các lần chạy dG, các cấu trúc sau được tạo ra:

X4-Bo1	GGGGGGTCGTTTTTCGTTTTTCGTGGGGG
X4-Bo2	GGGGGGTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTGGGGG
X4-Bo3	GGGGGGTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTTGGGGG
X4-Bo4	GGGGGGTTTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTTTGGGGG

Với dòng tế bào vô tính HEK293-pNifTy2-pcADN3.1-chiTLR21, kết quả thu được trong thử nghiệm chuẩn độ bắt đầu ở 20nM được thể hiện trên Fig.21.

Sự xếp loại hoạt lực kích thích sau đây được nhận diện đối với HEK293-pNifTy2-pcADN3.1-chiTLR21:

$X4-Bo4 \sim X4-Bo3 > X4-Bo2 (= X4 \text{ “cổ điển”}) > X4-Bo1$

Để kiểm tra thêm số lượng tối ưu của các gốc T ở đường biên với các lần chạy dG, các cấu trúc (tương tự và dài hơn) sau đây được tạo ra và được thử nghiệm (lại):

X4-Bo1	GGGGGGTCGTTTTTCGTTTTTCGTGGGGG
X4-Bo2	GGGGGGTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTGGGGG
X4-Bo3	GGGGGGTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTTGGGGG
X4-Bo4	GGGGGGTTTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTTTGGGGG
X4-Bo5	GGGGGGTTTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTTTTGGGGG
X4-Bo6	GGGGGGTTTTTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTTTTTGGGGG

Với dòng tế bào vô tính HEK293-pNifTy2-pcADN3.1-chiTLR21, kết quả thu được trong thử nghiệm chuẩn độ bắt đầu ở 20nM được thể hiện trên Fig.22.

Sự xếp loại hoạt lực kích thích sau đây được nhận diện đối với HEK293-pNifTy2-pcDNA3.1-chiTLR21:

X4-Bo6 > X4-Bo5 > X4-Bo4 > X4-Bo3 > X4-Bo2 (= X4 “cổ điển”) > X4-Bo1

Ví dụ 13: Kiểm tra thêm về hiệu quả của số lượng T tạo đường biên cho trime của khung chính

Để kiểm tra số lượng tối ưu của T tạo đường biên cho trime của khung chính, các cấu trúc sau được tạo ra:

X4-Bo1b	GGGGGGTCGTTTTTCGTTTTTCGTGGGGG
X4-Bo2b	GGGGGGTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTGGGGG
X4-Bo3b	GGGGGGTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTTGGGGG
X4-Bo4b	GGGGGGTTTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTTTGGGGG
X4-Bo5b	GGGGGGTTTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTTTTGGGGG
X4-Bo6b	GGGGGGTTTTTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTTTTTGGGGG
X4-Bo7	GGGGGGTTTTTTTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTTTTTTGGGGG
X4-Bo8	GGGGGGTTTTTTTTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTTTTTTTGGGGG
X4-Bo9	GGGGGGTTTTTTTTTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTTTTTTTTGGGGG
X4-Bo10	GGGGGGTTTTTTTTTTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTTTTTTTTTGGGGG

Rõ ràng là đối với cả sự kích thích tối đa lần ‘nồng độ hữu hiệu 50%’ (= EC50), sự tăng gây ra bởi việc bổ sung thêm các T từ X4-Bo5 là ở biên hoặc không có mặt. Tuy nhiên, X4-Bo10 vẫn có hoạt tính cao. Do đó, có thể giả định an toàn rằng hiệu quả của việc bổ sung nhiều T hơn là ngang bằng. Có thể dễ dàng hình dung rằng các cấu trúc lên đến X4-Bo20, X4-Bo25 hoặc thậm chí là X4-Bo30 vẫn rất thích hợp. Xem Fig.23.

Ví dụ 14: Kiểm tra thêm hiệu quả của số lượng T ,phân tách’ yếu tố CG

Để kiểm tra số lượng tối ưu của các T tách các yếu tố CG, các cấu trúc sau được tạo ra:

X4-Li1b	GGGGGGTTCGTCGTCGTTGGGGG
X4-Li2b	GGGGGGTTCGTTTCGTTTCGTTGGGGG

X4-Li3b	GGGGGGTTCGTTTTCGTTTTCGTTGGGGG
X4-Li4b	GGGGGGTTCGTTTTCGTTTTCGTTGGGGG
X4-Li5b	GGGGGGTTCGTTTTCGTTTTCGTTGGGGG
X4-Li6b	GGGGGGTTCGTTTTCGTTTTCGTTGGGGG
X4-Li7	GGGGGGTTCGTTTTCGTTTTCGTTGGGGG
X4-Li8	GGGGGGTTCGTTTTCGTTTTCGTTGGGGG
X4-Li9	GGGGGGTTCGTTTTCGTTTTCGTTGGGGG
X4-Li10	GGGGGGTTCGTTTTCGTTTTCGTTGGGGG

Như được thấy ở trên, X4-Li1 và X4-Li2 không có hoạt tính trong khoảng nồng độ được xem xét ($< 20\text{nM}$). Có vẻ là trong khi EC50 không thay đổi nhiều từ X4-Li3 đến X4-Li7, thì sự kích thích tối đa có thể đạt được tăng theo thứ tự này. Bất ngờ là việc nhảy EC50 từ X4-Li7 đến X4-Li8, cũng kèm theo sự gia tăng kích thích tối đa. X4-Li8, X4-Li9 và X4-Li10 có hoạt lực gần tương đương đối với EC50 và sự kích thích tối đa. Tuy nhiên, X4-Li10 vẫn có hoạt tính cao. Vì thế có thể giả định an toàn rằng hiệu quả của việc bổ sung nhiều T hơn là ngang bằng. Có thể dễ dàng hình dung rằng cấu trúc lên đến X4-Li20, X4-Li25 hoặc thậm chí là X4-Li30 vẫn rất thích hợp. Xem Fig.24.

Ví dụ 15: Kiểm tra thêm hiệu quả của số lượng các đoạn lặp TTCGTT

Để kiểm tra số lượng tối ưu của các đoạn lặp TTCGTT, các cấu trúc sau được tạo ra:

X4-đơn-b	GGGGGGTTCGTTGGGGG
X4-đôi-b	GGGGGGTTCGTTTTCGTTGGGGG
X4-ba-b	GGGGGGTTCGTTTTCGTTTTCGTTGGGGG
X4-bốn-b	GGGGGGTTCGTTTTCGTTTTCGTTTTCGTTGGGGG
X4-năm-b	GGGGGGTTCGTTTTCGTTTTCGTTTTCGTTTTCGTTGGGGG
X4-sáu-b	GGGGGGTTCGTTTTCGTTTTCGTTTTCGTTTTCGTTTTCGTTGGGGG
X4-bảy	

GGGGGGTTCGTTTTCGTTTTCGTTTTCGTTTTCGTTTTCGTTTTCGTTGGGGG

X4-tám

GGGGGGTTCGTTTTCGTTTTCGTTTTCGTTTTCGTTTTCGTTTTCGT
TGGGGG

X4-chín

GGGGGGTTCGTTTTCGTTTTCGTTTTCGTTTTCGTTTTCGTTTTCGT
TTTCGTTGGGGG

X4-mười

GGGGGGTTCGTTTTCGTTTTCGTTTTCGTTTTCGTTTTCGTTTTCGT
TTTCGTTTTCGTTGGGGG

Như được thấy ở trên, X4-đơn và X4-đôi không có hoạt tính trong khoảng nồng độ được xem xét ($< 20\text{nM}$). Có vẻ là sự kích thích tối đa có thể đạt được tăng mạnh từ X4-ba đến X4-bảy, và theo thứ tự này EC50 cũng giảm mạnh. Cụ thể, việc nhảy từ X4-bốn đến X4-năm là đáng chú ý. Từ X4-bảy đến X4-mười, sự kích thích tối đa tăng và EC50 giảm nhẹ, nhưng liên tục. Vì thế, có thể giả định an toàn rằng hiệu quả của việc bổ sung nhiều trime hơn là ngang bằng. Có thể dễ dàng hình dung rằng các cấu trúc lên đến X4-X, X4-XV hoặc thậm chí là X4-XVIII vẫn rất thích hợp. Tuy nhiên, các cấu trúc này có độ khó tổng hợp gia tăng. Xem Fig.25 và Fig.26.

Ví dụ 16: Kiểm tra thêm hiệu quả của các loại các trime lặp lại

Để kiểm tra loại tối ưu của các trime lặp lại, các cấu trúc sau được tạo ra:

X4	GGGGGGTTCGTTTTCGTTTTCGTTGGGGG
X4-I	GGGGGGTTTCGTTTTTTTCGTTTTTCGTTTGGGGG
X4-II	GGGGGGTTTTCGTTTTTTTTCGTTTTTTTCGTTTTGGGGG
X4-III	GGGGGGTTTTTCGTTTTTTTTTTCGTTTTTTTTTCGTTTTTGGGGG

Mức độ kích thích tăng mạnh từ X4-ba đến X4-I đến X4-II/X4-III. Hơn nữa, EC50 giảm mạnh từ X4 đến X4-I và sau đó giảm dần dần đến X4-III.

X4-III vẫn có hoạt tính cao. Xem Fig.27.

Ví dụ 17: Kiểm tra thêm hiệu quả của các đoạn lặp TTTCGTTT

Để kiểm tra số lượng tối ưu của các góc T ở đường biên của các đoạn lặp TTCGTT, các cấu trúc sau được tạo ra:

X4-I-đơn	GGGGGGTTTCGTTTGGGGG
----------	---------------------

X4-I-đôi GGGGGGTTTCGTTTTTTCGTTTGGGGG

X4-I-ba GGGGGGTTTCGTTTTTTCGTTTTTTCGTTTGGGGG

X4-I-bốn GGGGGGTTTCGTTTTTTCGTTTTTTCGTTTTTTCGTTTGGGGG

X4-I-năm
GGGGGGTTTCGTTTTTTCGTTTTTTCGTTTTTTCGTTTTTTCGTTTGGGGG

X4-I-sáu
GGGGGGTTTCGTTTTTTCGTTTTTTCGTTTTTTCGTTTTTTCGTTTTTTCGTTT
GGGGG

Như trong chuỗi X4, X4-I-đơn và X4-I-đôi không có hoạt tính trong khoảng nồng độ được xem xét ($< 20\text{nM}$). ODN có tiềm năng đầu tiên là X4-I, và sự kích thích tối đa có thể đạt được tăng thêm đối với X4-bốn và X4-I-năm/X4-I-sáu. EC₅₀ có thứ tự độ lớn tương tự (nM thấp) đối với X4-I-ba – X4-I-sáu.

X4-I-sáu vẫn có hoạt tính cao. Xem Fig.28.

Ví dụ 18: Kiểm tra thêm motif CG hexame kiểu trime – vị trí đường biên 3'

Để kiểm tra motif CG hexame kiểu trime tối ưu – vị trí đường biên 3', các cấu trúc sau được tạo ra:

ODN-X4	GGGGGGTTTCGTTTTCGTTTTCGTTGGGGG
ODN-X41	GGGGGGTTTCGTGTTGTTGTTGGGGG
ODN-X42	GGGGGGTTTCATTGTTGTTAGGGGG
ODN-X43	GGGGGGTTTCCTTCCTTCCTTCGGGGG

Tính toán EC₅₀: X4: 61,6nM

X41: không xác định được, $>> 100\text{nM}$

X42: 62,1nM

X43: 3,3nM

Dựa trên các kết quả này (và trước đây), ODN-X43 là vượt trội so với ODN-X4 về cả sự kích thích tối đa và giá trị EC₅₀. ODN-X42 thấp hơn một chút về tín hiệu tối ưu, nhưng EC₅₀ là tương tự như EC₅₀ của ODN-X4.

Ví dụ 19: Kiểm tra thêm motif CG hexame kiểu trime – nhận diện GTCGTC

Để tìm hiểu khả năng của PDE-ODN dựa vào ODN-X2, các ODN sau đây được tổng hợp dưới dạng các cải biến đầu 5' và 3' của hexame. Kết quả của X2, X24, X25 và X26/X4 được báo cáo ở trên.

ODN-X2	GGGGGGGTCGTTGTCGTTGTCGTTGGGGG
ODN-X21	GGGGGGGTCGTGGTCGTGGTCGTGGGGGG
ODN-X22	GGGGGGGTCGTAGTCGTAGTCGTAGGGGGG
ODN-X23	GGGGGGGTCGTCGTCGTCGTCGTCGGGGG
ODN-X24	GGGGGGATCGTTATCGTTATCGTTGGGGG
ODN-X25	GGGGGGCTCGTTCTCGTTCTCGTTGGGGG
ODN-X26/4	GGGGGGTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTGGGGG

X2, X24, X25, giống X21 và X22, chỉ có hoạt tính rất thấp hoặc không có hoạt tính so với X26/X4. Tuy nhiên, X23 thể hiện hoạt tính cao bất ngờ vượt trội hơn so với hoạt tính của X26/X4.

Tính toán EC ₅₀ :	X23:	3,1nM
	X4:	61,6nM

Dựa trên các kết quả này (và trước đây), ODN-X23 là vượt trội so với ODN-X4 về cả sự kích thích tối đa và giá trị EC₅₀.

Ví dụ 20: Hiệu quả của số motif ODN-X42

ODN-X42 được dựa trên trime của motif TTCGTA. Để thử nghiệm hiệu quả của số motif, số motif được kiểm tra từ 1 đến 6:

X42-đơn	GGGGGGTTCGTAGGGGG
X42-đôi	GGGGGGTTCGTATTCGTAGGGGG
X42-ba	GGGGGGTTCGTATTCGTATTCGTAGGGGG
X42-bốn	GGGGGGTTCGTATTCGTATTCGTATTCGTAGGGGG
X42-năm	GGGGGGTTCGTATTCGTATTCGTATTCGTATTCGTAGGGGG
X42-sáu	GGGGGGTTCGTATTCGTATTCGTATTCGTATTCGTATTCGTAGGGGG

EC₅₀

ODN-X4-ba	40,6nM
-----------	--------

ODN-X42-ba	33nM
ODN-X42-bốn	3,1nM
ODN-X42-năm	0,84nM
ODN-X42-sáu	0,37nM
ODN-X4-ba-PTO-G duy nhất	6,8nM

Như được quan sát trong thử nghiệm trước đây, hoạt lực của X4-ba và X42-ba là tương đương. Sự giảm số lượng các đoạn lặp hexanucleotit trong chuỗi X42 dẫn đến mất hoạt tính (X42-đơn, X42-đôi), trong khi việc tăng số lượng lên đến 4, 5 và 6 dẫn đến tăng tín hiệu tối đa và EC50 theo thứ tự này, đạt được hoạt lực picomol ở X42-năm. Cũng đáng chú ý là trong thực tế, từ X42-bốn đến ODN là vượt trội so với ODN-X4-ba-PTO-G duy nhất.

Có thể dễ dàng hình dung rằng các cấu trúc lên đến $n = 10$, $n = 15$ hoặc thậm chí là $n = 18$ vẫn rất thích hợp. Tuy nhiên, các cấu trúc này có độ khó tổng hợp gia tăng. Xem Fig.29.

Ví dụ 21: Hiệu quả của số motif ODN-X43

ODN-X43 dựa vào trime của motif TTCGTC. Để thử nghiệm hiệu quả của số motif, số motif được kiểm tra từ 1 đến 6.

Ngoài ra, các biến thể PTOG-duy nhất của X43-ba – X43-sáu được tổng hợp và được thử nghiệm.

X43-đơn	GGGGGGTTCGTCGGGGG
X43-đôi	GGGGGGTTCGTCTTCGTCGGGGG
X43-ba	GGGGGGTTCGTCTTCGTCTTCGTCGGGGG
X43-bốn	GGGGGGTTCGTCTTCGTCTTCGTCTTCGTCGGGGG
X43-năm	GGGGGGTTCGTCTTCGTCTTCGTCTTCGTCTTCGTCGGGGG
X43-sáu	GGGGGGTTCGTCTTCGTCTTCGTCTTCGTCTTCGTCTTCGTCGGGGG
X43-ba-PTOg	ggggggTTCGTCTTCGTCTTCGTCggggg
X43-bốn-PTOg	ggggggTTCGTCTTCGTCTTCGTCTTCGTCggggg
X43-năm-PTOg	ggggggTTCGTCTTCGTCTTCGTCTTCGTCTTCGTCggggg

X43-sáu-PTOg

[illegible]

	EC ₅₀ [nM]
ODN-X4-ba	40,6
ODN-X43-ba	1,2
ODN-X43-bốn	0,56
ODN-X43-năm	0,4
ODN-X43-sáu	0,38
ODN-X43-ba-PTOG-duy nhất	1,12
ODN-X43-bốn-PTOG-duy nhất	0,51
ODN-X43-năm-PTOG-duy nhất	0,32
ODN-X43-sáu-PTO-G duy nhất	0,38
X4-PTOG-duy nhất	6,8

Như được quan sát trong thử nghiệm trước đây, hoạt lực của X43-ba là vượt trội so với hoạt lực của X4-ba. Việc giảm số lượng các đoạn lặp hexanucleotit trong các chuỗi X43 dẫn đến sự mất hoạt tính (X43-đơn, X43-đôi), trong khi việc tăng số lượng lên đến 4, 5 và 6 dẫn đến tăng tín hiệu tối đa và EC₅₀ theo thứ tự này, đạt được hoạt lực picomol ở X43-bốn. Cũng đáng chú ý là, trong thực tế, tất cả X43-ODN từ X43-ba trở đi là vượt trội so với ODN-X4-ba-PTO-G duy nhất.

Các phiên bản PTOG-duy nhất của X43-ba-X43-sáu ít nhất là có hoạt tính như các phiên bản ODN được liên kết với phosphodiester tinh khiết.

X43-sáu và X43-sáu-PTOG-duy nhất vẫn có hoạt tính cao, tức là các giới hạn và/hoặc giá trị tối ưu chưa đạt được.

Một lần nữa, có thể dễ dàng hình dung rằng các cấu trúc lên đến $n = 10$, $n = 15$ hoặc thậm chí là $n = 18$ vẫn rất thích hợp. Tuy nhiên, các cấu trúc này có độ khó tổng hợp gia tăng. Xem Fig.30 và Fig.31.

Ví dụ 22: Các cải biến thêm của ODN-X4

Với mục đích khám phá thêm khả năng của PDE-ODN dựa vào ODN-X4, ODN được tổng hợp với sự thay thế các TT dinucleotit 5' và 3' của yếu tố CpG bằng GG, AA và CC, theo thứ tự.

X4-TT = TT-X4	GGGGGGTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTGGGGG
X-GG	GGGGGGGGCGTTGGCGTTGGCGTTGGGGG
X-AA	GGGGGGAACGTTAACGTTAACGTTGGGGG
X-CC	GGGGGGCCCGTTCCCGTTCCCGTTGGGGG
GG-X	GGGGGGTTCGGGTTCGGGTTCGGGGGGGG
AA-X	GGGGGGTTCGAATTCGAATTCGAAGGGGG
CC-X	GGGGGGTTCGCCTTCGCCTTCGCCGGGGG

Trong các thử nghiệm kích thích HEK293-pNifty2-chiTLR21, X4-GG, X4-AA, X4-CC, GG-X và AA-X được chứng tỏ là không có hoạt tính trên các khoảng nồng độ được xem xét. Tuy nhiên, CC-X ($EC_{50} = 6,94nM$) thể hiện hoạt tính EC_{50} vượt trội ở hệ số 7 so với hoạt tính EC_{50} của X4 ($EC_{50} = 52,3nM$) và cũng thể hiện tín hiệu kích thích tối đa cao hơn. Xem Fig.32.

Ví dụ 23: Thử nghiệm motif CpG ở động vật theo sáng chế

1 Giới thiệu

1.1 Đối tượng

Để đánh giá liệu phối tử TLR (thụ thể giống toll) kết hợp với lượng tối thiểu của kháng nguyên NDV dòng 30 bị bất hoạt kết hợp với nhũ tương nước trong dầu có thể tạo ra sự bảo vệ chống lại thử thách NDV Herts 33/56 sống hay không.

1.2

2 Vật liệu và phương pháp

2.1 Tóm tắt thử nghiệm

18 nhóm gà Leghorn trắng SPF 3 tuần tuổi, được đặt trong thiết bị cách ly, được tiêm chủng duy nhất một lần trong cơ (i.m.) vào cơ ức phải với một trong số các chế phẩm được chỉ ra trong bảng 1 “Phân nhóm và định liều”. Từ mỗi nhóm gồm 12 con vật chỉ có 10 con gà được tiêm chủng, 2 con còn lại được dùng làm đối chứng. Các mẫu máu được lấy 1 ngày trước khi tiêm chủng ($T = 0$) từ 18 con vật được lấy ngẫu nhiên (1 từ

mỗi nhóm) và ở T = 3 tuần sau khi tiêm chủng từ tất cả các con vật từ tất cả các nhóm. Sau khi lấy mẫu máu ở T = 3 tuần sau khi tiêm chủng tất cả các con gà được thử thách qua đường trong cơ (i.m.) vào cơ chân phải với 0,2ml ($10^{6,0}$ EID₅₀) NDV độc lực cao chủng Herts 33/56 trên mỗi con gà. Trong khoảng thời gian 14 ngày sau khi thử thách, các con gà được ghi lại hàng ngày đối với các biểu hiện về bằng chứng lâm sàng của việc nhiễm NDV hoặc chết. Hai tuần sau khi thử thách, máu được lấy từ tất cả các con vật còn lại sau khi các con vật này bị giết. Phản ứng tại chỗ được kiểm tra nhìn bằng mắt thường và được ghi lại. Các mẫu để nghiên cứu mô học thông thường được lấy khi có thể quan sát các phản ứng hoặc tổn thương.

2.2 Vật liệu thử nghiệm

2.2.1

2.2.1.1 Vacxin: 0,25% theo khối lượng kháng nguyên NDV dòng 30 bị bất hoạt trong nhũ tương nước trong dầu

2.2.1.2 Phối tử TLR:

X4-PDE (Y11) - được sản xuất bởi Biolegio – Hà Lan

X4-PTO (Y11) - được sản xuất bởi TibMolBiol-Berlin – Đức

X4-PTO-G-duy nhất (Y11) - được sản xuất bởi TibMolBiol

2007-PTO (đã biết trong tài liệu) - được sản xuất bởi TibMolBiol

2.2.1.3 Trình tự CpG:

X4-PDE (Y11): GGGGGGTTCTTTTCGTTTTCGTTGGGGG (khung chính PDE hoàn chỉnh)

X4-PTO (Y11): gsgsgsgsgsgsTsTsCsgsTsTsTsTsCsgsTsTsTsTsCsgsTsTsgsgsgsgsgs
(khung chính PTO hoàn chỉnh)

X4-PTO-G-đuy nhất (Y11): gsgsgsgsgsgsTTCGTTTTCGTTTTCGTTgsgsgsgsgs
(PTO g-duỗi thẳng)

2007-PTO: TsCsgsTsCsgsTsTsTsTsCsgsTsTsTsTsCsgsTsTs (khung chính PTO hoàn chỉnh)

PTO = phospho(ro)thioat (được chỉ ra bởi “s”) (= kháng nucleaza); PDE = phosphodiester (tổng hợp oligo chuẩn)

Bảng 1: Phân nhóm và định liều

Nhóm	N	IP nr	Vaccin	Phối tử TLR	TLR
1	10	100132.1	0,25% theo khối lượng NDV trong nhũ tương nước trong dầu	-- (PBS)	--
	2	--	--	--	
2	10	100132.4	0,25% theo khối lượng NDV trong nhũ tương nước trong dầu	1 µg/liều lượng X4-PDE (Y11)	TLR21
	2	--	--	--	
3	10	100132.5	0,25% theo khối lượng NDV trong nhũ tương nước trong dầu	10 µg/liều lượng X4-PDE (Y11)	TLR21
	2	--	--	--	
4	10	100132.7	0,25% theo khối lượng NDV trong nhũ tương nước trong dầu	1 µg/liều lượng X4-PTO (Y11)	TLR21
	2	--	--	--	
5	10	100132.8	0,25% theo khối lượng NDV trong nhũ tương nước trong dầu	10 µg/liều lượng X4-PTO (Y11)	TLR21
	2	--	--	--	
6	10	100132.10	0,25% theo khối lượng NDV trong nhũ tương nước trong dầu	1 µg/liều lượng X4-PTO-G-duy nhất (Y11)	TLR21
	2	--	--	--	
7	10	100132.11	0,25% theo khối lượng NDV trong nhũ tương nước trong dầu	10 µg/liều lượng X4-PTO-G-duy nhất (Y11)	TLR21
	2	--	--	--	
8	10	100132.13	0,25% theo khối lượng NDV trong nhũ tương nước trong dầu	1 µg/liều lượng 2007-PTO	TLR21
	2	--	--	--	
9	10	100132.14	0,25% theo khối lượng NDV trong nhũ tương nước trong dầu	10 µg/liều lượng 2007-PTO	TLR21
	2	--	--	--	

2.2.2 Bào chế vaccin

Với mỗi phối tử TLR dung dịch pha loãng mới tạo ra được bổ sung vào [0,25% theo khối lượng NDV trong nhũ tương nước trong dầu]-vaccin đến nồng độ cuối cùng bằng 2,5% theo thể tích thu được liều bằng 1µg hoặc 10µg trong mỗi 0,5ml. (Liều vaccin đầy đủ của vaccin thử nghiệm được dùng ở đây chứa 8,06% khối lượng/thể tích dịch niệu nang của trứng bị nhiễm NDV/nhũ tương nước trong dầu). Sau khi bổ sung phối tử TLR vào vaccin, nó được trộn đều bằng cách sử dụng máy trộn xoáy nhỏ.

(“¼ liều virus gây bệnh Newcastle bị bất hoạt” có nghĩa là ¼ lượng tối thiểu của NDV bị bất hoạt đã biết để tạo ra hiệu giá kháng thể có khả năng bảo vệ gia cầm chống lại sự nhiễm NDV khi không có mặt oligodeoxynucleotit).

2.3 Tiêm chủng

Mười con vật từ mỗi nhóm được tiêm chủng với 0,5ml vacxin i.m. vào cơ ức phải ở độ tuổi 3 tuần tuổi. 2 con vật còn lại trong mỗi nhóm không được tiêm chủng và được dùng làm đối chứng.

2.4 Thử thách

Vào 3 tuần sau khi tiêm chủng cả 12 con vật từ tất cả 18 nhóm được thử thách với 0,2ml NDV Herts 33/56 sống ($10^{6,0}$ EID₅₀ mỗi con gà) qua đường i.m. vào cơ chân phải.

2.5 Các mẫu máu

Các mẫu máu để nghiên cứu huyết thanh học được lấy 1 ngày trước khi tiêm chủng ($T = 0$) từ 18 con vật được lấy ngẫu nhiên (1 từ mỗi nhóm) và ở $T = 3$ tuần sau khi tiêm chủng lần đầu từ tất cả các con vật. Hai tuần sau khi thử thách, máu được lấy từ tất cả các động vật còn lại mà sống sót sau thử thách NDV.

2.6 Thử nghiệm HI

Các mức huyết thanh của kháng thể đặc hiệu NDV được xác định bằng thử nghiệm ức chế ngưng kết hồng cầu (HI). Dịch pha loãng hai lần theo dãy của huyết thanh được chuẩn bị trong đĩa vi chuẩn độ và được trộn với thể tích bằng nhau chứa 8 đơn vị ngưng kết hồng cầu/50 μ l kháng nguyên NDV. Hiệu giá được biểu diễn dưới dạng hàm thuận nghịch của độ pha loãng cao nhất gây ra sự ức chế hoàn toàn việc ngưng kết hồng cầu của tế bào hồng cầu ở gà (1% (theo thể tích) trong nước muối được đệm). Các mẫu được xem là dương tính đối với sự ức chế ngưng kết hồng cầu ở độ pha loãng $\geq 1:2$.

3 Kết quả

0,25% (theo khối lượng) NDV dòng 30 trong GNE				
		Ở 3 wkpv*	↕	Ở 5 wkpv (= 2wkpc*)
Nhóm	Phối tử TLR	Hiệu giá HI NDV Log2 trung bình	% gà được bảo vệ	Hiệu giá HI NDV Log2 trung bình
1	--	0,0±0,0	0%	--
2	1µg/liều X4-PDE (Y11)	1,5±1,7	40%	9,3±1,0
3	10µg/liều X4-PDE (Y11)	4,3±1,9	70%	9,1±1,1
4	1µg/liều lượng X4- PTO (Y11)	1,7±1,3	30%	8,7±0,6
5	10µg/liều X4-PTO (Y11)	2,3±2,2	40%	8,3±0,5
6	1µg/liều X4-PTO-G- duy nhất (Y11)	2,2±1,6	40%	9,3±1,0
7	10µg/liều X4-PTO-G- duy nhất (Y11)	5,0±1,5	90%	8,8±0,7
8	1 µg/liều 2007-PTO	2,5±1,6	60%	8,7±0,8
9	10 µg/liều 2007-PTO	3,3±2,1	70%	9,0±0,6
*: wkpv = tuần sau khi tiêm chủng; wkpc = tuần sau khi thử thách				

Hiệu giá HI NDV:

Từ các kết quả rõ ràng là hiệu giá HI NDV tương quan chặt chẽ với sự bảo vệ. Với mỗi phối tử TLR mà tạo ra sự bảo vệ, hiệu giá HI cao nhất được thấy là tương quan với sự bảo vệ cao nhất, tức là ở 10µg mỗi liều. Ngược lại, ở liều cao nhất của phối tử TLR, hiệu giá HI là thấp nhất.

Mô học và bệnh lý học:

Khi kiểm tra nhìn bằng mắt thường các vị trí tiêm, không có sự khác biệt chính nhìn bằng mắt thường được phát hiện giữa các vị trí tiêm của các con gà từ các nhóm

khác nhau. Các quan sát này chỉ ra rằng các phối tử TLR được sử dụng là an toàn và chúng không gây ra tác dụng phụ, ví dụ, phản ứng tại chỗ.

Sự bảo vệ/sống sót:

Từ các kết quả trên, rõ ràng là không có sự bảo vệ thu được với NDV trong chỉ nhũ tương nước trong dầu (nhóm 1), trong khi trong một số nhóm khác có từ 20% đến 90% con gà được bảo vệ do việc bổ sung phối tử TLR vào 0,25% (theo khối lượng) NDV dòng 30 trong nhũ tương nước trong dầu.

Không quan sát thấy sự bảo vệ ở gà đối chứng không được tiêm chủng (n=36).

Ví dụ 24: Thử nghiệm thêm đối với các motif CpG ở động vật theo sáng chế

1 Giới thiệu

1.1 Đối tượng

Để đánh giá ảnh hưởng của X4-năm-PDE kết hợp với nhũ tương nước trong dầu (nhũ tương nước trong dầu dựa trên dầu khoáng) đối với hiệu giá kháng thể kháng NDV, kháng IBV và kháng TRT ở gà.

1.2 Sự vận động

Trong thử nghiệm này, tác giả sáng chế đã kiểm tra việc bổ sung X4-năm-PDE vào một phần tư liều đầy đủ của kháng nguyên NDV, IBV hoặc TRT bị bất hoạt được kết hợp với nhũ tương nước trong dầu có thể gây ra hiệu giá kháng thể bằng hoặc cao hơn khi so với liều đầy đủ của NDV và TRT, hoặc nửa liều của IBV.

2 Vật liệu và phương pháp

2.1 Tóm tắt thử nghiệm

Nhóm gà Leghorn trắng SPF 4 tuần tuổi (n = 10 mỗi nhóm) được tiêm chủng một lần i.m. vào cơ chân phải với một trong số các chế phẩm được chỉ ra trong bảng 2. Các mẫu máu được lấy trước khi tiêm chủng (T = 0) từ 20 con vật được lấy ngẫu nhiên và ở T = 4 và T = 6 tuần sau khi tiêm chủng từ tất cả các con vật từ tất cả các nhóm. Huyết thanh được sử dụng để xác định hiệu giá kháng thể kháng NDV, kháng IBV và kháng TRT.

2.2 Vật liệu thử nghiệm

2.2.1 Vật thử nghiệm

2.1.1 Kháng nguyên (bất hoạt):

NDV dòng 30: Liều vaccin đầy đủ chứa 8,06% khối lượng/thể tích dịch niệu nang của trứng bị nhiễm NDV/nhũ tương nước trong dầu.

IBV-249G: Liều vaccin đầy đủ chứa 30% khối lượng/thể tích dịch niệu nang của trứng bị nhiễm IB/nhũ tương nước trong dầu.

TRT: mẻ sản xuất chuẩn. Liều vaccin đầy đủ chứa 100 E.U./liều.

2.2.1.2 Vaccin: xem bảng 2

2.2.1.3 Chất kích thích miễn dịch:

X4-năm-PDE:

5'- GGGGGGTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTGGGGG -3'

(Eurofins MWG Operon (Đức))

2.2.2 Bào chế vaccin

Dung dịch pha loãng trước của phối tử TLR X4-năm-PDE được tạo mới và được bổ sung vào vaccin đến nồng độ cuối cùng bằng 2,5% theo thể tích thu được liều bằng 1µg hoặc 10µg trong mỗi 0,5ml vaccin. Sau khi bổ sung phối tử TLR, vaccin được trộn đều bằng cách sử dụng máy trộn xoáy nhỏ.

2.3 Tiêm chủng

Các con vật từ mỗi nhóm được tiêm chủng với 0,5ml vaccin i.m. vào cơ chân phải ở 4 tuần tuổi.

2.4 Các mẫu máu

Các mẫu máu để nghiên cứu huyết thanh học được lấy trước khi tiêm chủng (T = 0) từ 20 con vật được lấy ngẫu nhiên và ở T = 4 tuần sau khi tiêm chủng lần đầu từ tất cả các con vật.

2.5 Hiệu giá kháng thể

2.5.1 Thử nghiệm HI NDV

Các mức huyết thanh của kháng thể đặc hiệu NDV được xác định bằng thử nghiệm ức chế ngưng kết hồng cầu (HI). Dịch pha loãng hai lần theo dãy của huyết thanh được chuẩn bị trong các đĩa vi chuẩn độ và được trộn với thể tích bằng nhau

chứa 8 đơn vị ngưng kết hồng cầu/50 μ l kháng nguyên NDV. Hiệu giá được biểu diễn dưới dạng hàm thuận nghịch của độ pha loãng cao nhất gây ra sự ức chế hoàn toàn việc ngưng kết hồng cầu của tế bào hồng cầu ở gà (1% (theo thể tích) trong nước muối được đệm). Các mẫu được xem là dương tính đối với sự ức chế ngưng kết hồng cầu ở độ pha loãng $\geq 1:4$ và được biểu diễn theo 2log.

2.5.2 Thử nghiệm HI IBV

Các mức huyết thanh của kháng thể đặc hiệu IB được xác định bằng thử nghiệm ức chế ngưng kết hồng cầu (HI). Dịch pha loãng hai lần theo dãy của huyết thanh được chuẩn bị trong các đĩa vi chuẩn độ và được trộn với thể tích bằng nhau chứa từ 8 đến 16 đơn vị ngưng kết hồng cầu/50 μ l kháng nguyên IBV-D274. Hiệu giá được biểu diễn dưới dạng hàm thuận nghịch của độ pha loãng cao nhất gây ra sự ức chế hoàn toàn việc ngưng kết hồng cầu của tế bào hồng cầu ở gà (1% (theo thể tích) trong nước muối được đệm). Các mẫu được xem là dương tính đối với sự ức chế ngưng kết hồng cầu ở độ pha loãng $\geq 1:16$ và được biểu diễn theo 2log.

2.5.3 ELISA TRT

Các mức huyết thanh của kháng thể đặc hiệu TRT được xác định bằng ELISA chuẩn. Tóm lại, 100 μ l nguyên liệu kháng nguyên TRT được pha loãng theo tỷ lệ 1:200 được phủ trong đĩa vi chuẩn độ. Huyết thanh được pha loãng trước theo tỷ lệ 1:100 và 1:800 và được bổ sung vào đĩa vi chuẩn độ. Độ chuẩn huyết thanh được coi là dương tính ở độ chuẩn ≥ 5 và được biểu diễn theo 2log.

2.5.4 Kết luận

Nội dung dưới đây có thể ngay lập tức được kết luận từ kết quả của bảng 2:

- 1) ¼ liều NDV-vaccin khi được dùng cùng với 10 μ g X4-năm tạo ra hiệu giá tương đương với hiệu giá của liều NDV đầy đủ mà không bổ sung X4-năm.
- 2) ¼ liều NDV/IBV-vaccin kết hợp khi được dùng cùng với 10 μ g X4-năm tạo ra hiệu giá NDV và IBV tương đương với liều đầy đủ của NDV/IBV-vaccin kết hợp mà không bổ sung X4-năm.
- 3) ¼ liều TRT- vaccin khi được dùng cùng với 10 μ g X4-năm tạo ra hiệu giá tương đương với liều đầy đủ của TRT-vaccin mà không bổ sung X4-năm.

3 Kết quả

Vaccin (+ LV-nhũ tương nước trong dầu)				T = 4 tuần			T = 6 tuần		
NDV	IBV-249G	TRT	PAMP	NDV	IBV	TRT	NDV	IBV	TRT
đầy đủ	--	--	--	9,3 ± 0,7	--	--	9,2±0,8	--	--
--	½	--	--	--	9,3 ± 1,8	--	--	9,4±0,7	--
đầy đủ	½	--	--	9,2 ± 0,9	9,1 ± 1,5	--	8,6±1,1	9,2±0,8	--
¼	--	--	10µg X4-năm	9,2 ± 1,0	--	--	8,8±0,9	--	--
¼	¼	--	10µg X4-năm	9,5 ± 0,5	9,9 ± 2,0	--	9,0±0,8	9,5±0,5	--
--	--	đầy đủ	--	--	--	11,7 ± 0,4	--	--	12,4±0,3
--	--	¼	10µg X4-năm	--	--	12,2 ± 0,4	--	--	12,3±0,8
đầy đủ = 8,06% khối lượng/thể tích	đầy đủ = 30,1% khối lượng/thể tích	đầy đủ = 100 EU							

Bảng 2.

Tài liệu tham khảo

Babiuk L.A., Gomis S., Hecker R., 2003. Molecular approaches to disease control. *Poult. Sci.* **82**, 870-875.

Brownlie, R., Zhu J., Allan B., Mutwiri G.K., Babiuk L.A., Potter A., Griebel P., 2009. Chicken TLR21 acts as a functional homologue to mammalian TLR9 in the recognition of CpG oligodeoxynucleotides. *Mol. Immunol.* **46**, 3163-3170

Carrington A.C., Secombes C.J., 2006. A review of CpGs and their relevance to aquaculture. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **112**, 87-101.

Daubenberger C.A., 2007. TLR9 agonists as adjuvants for prophylactic and therapeutic vaccines. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **9**, 45-52.

Dorn A., Kippenberger S., 2008. Clinical application of CpG-, non-CpG-, and antisense oligodeoxynucleotides as immunomodulators. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **10**, 10-20.

Fonseca D.E., Kline J.N., 2009. Use of CpG oligodeoxynucleotides in treatment of asthma and allergic disease. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **61**, 256-262.

Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., Nairn, R., 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* **36**, 59–74.

Griebel P.J., Brownlie R., Manuja A., Nichani A., Mookherjee N., Popowych Y., Mutwiri G., Hecker R., Babiuk L.A., 2005. Bovine toll-like receptor 9: a comparative analysis of molecular structure, function and expression. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **108**, 11-16.

Hemmi H., Takeuchi O., Kawai T., Kaisho T., Sato S., Sanjo H., Matsumoto M., Hoshino K., Wagner H., Takeda K., Akira S., 2000. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408**, 740-745.

Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. 2010. *Science* **327**, 291-295.

Keestra A.M., 2008. Molecular dissection of the chicken Toll-like receptor repertoire. PhD thesis (Proefschrift), University of Utrecht, The Netherlands

Kline J.N., 2007. Immunotherapy of asthma using CpG oligodeoxynucleotides. *Immunol. Res.* **39**, 279-286.

Kline J.N., Krieg A.M., 2008. Toll-like receptor 9 activation with CpG oligodeoxynucleotides for asthma therapy. *Drug News Perspect.* **21**, 434-439.

Klinman D.M., 2004. Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 249-258.

Klinman D.M, Currie D., Gursel I., Verthelyi D., 2004. Use of CpG oligodeoxynucleotides as immune adjuvants. *Immunol. Rev.* **199**, 201-216.

Klinman D.M., 2006. Adjuvant activity of CpG oligodeoxynucleotides. *Int. Rev. Immunol.* **25**, 135-154.

Klinman D.M., Klaschik S., Sato T., Tross D., 2009. CpG oligodeoxynucleotides as adjuvants for vaccines targeting infectious diseases. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **61**, 248-255.

Kindrachuk J., Potter J., Wilson H.L., Griebel P., Babiuk L.A., Napper S., 2008. Activation and regulation of toll-like receptor 9: CpGs and beyond. *Mini Rev. Med. Chem.* **8**, 590-600.

Krieg A.M., Yi A.K., Matson S., Waldschmidt T.J., Bishop G.A., Teasdale R., Koretzky G.A., Klinman D.M., 1995. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* **374**, 546-549.

Krieg A.M., 2002. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 709-760.

Krieg A.M., 2003. CpG motifs: the active ingredient in bacterial extracts? *Nat. Med.* **9**, 831-835.

Krieg A.M., 2006. Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**, 471-484.

Krieg A.M., 2007a. Anti-infective applications of toll-like receptor 9 agonists. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **4**, 289-294.

Krieg A.M., 2007b. Development of TLR9 agonists for cancer therapy. *J. Clin. Invest.* **117**, 1184-1194.

Linghua Zhang et al., 2007. Vaccination with Newcastle disease vaccine and CpG oligodeoxynucleotides induces specific immunity and protection against Newcastle disease virus in SPF chicken. *Vet. Immun. And Immunopath.* **115**, 216-222.

Medzhitov R., 2001. CpG DNA: security code for host defense. *Nat. Immunol.* **2**, 15-16.

Medzhitov R., Approaching the asymptote: 20 years later. 2009. *Immunity* **30**, 766-775)

Mutwiri G., van Drunen Littel-van den Hurk S., Babiuk L.A., 2009. Approaches to enhancing immune responses stimulated by CpG oligodeoxynucleotides. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **61**, 226-232.

Mutwiri G., Pontarollo R., Babiuk S., Griebel P., van Drunen Littel-van den Hurk S., Mena A., Tsang C., Alcon V., Nichani A., Ioannou X., Gomis S., Townsend

H., Hecker R., Potter A., Babiuk L.A., 2003. Biological activity of immunostimulatory CpG DNA motifs in domestic animals. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **91**, 89-103.

Schindler, U., and Baichwal, V.R., 1994. *Moll. Cell. Biol.* **14**: 5820-5831.

Singh M., O'Hagan D.T., 2003. Recent advances in veterinary vaccine adjuvants. *Int. J. Parasitol.* **33**, 469-478.

Vollmer J., 2005. Progress in drug development of immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotide ligands for TLR9. *Expert Opin. Biol. Ther.* **5**, 673-682.

Vollmer J., Krieg A.M., 2009. Immunotherapeutic applications of CpG oligodeoxynucleotide TLR9 agonists. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **61**, 195-204.

Wagner H., 2009. The immunogenicity of CpG-antigen conjugates. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **61**, 243-247.

Weiner G.J., 2009. CpG oligodeoxynucleotide-based therapy of lymphoid malignancies. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **61**, 263-267.

Werling D., Jungi T.W., 2003. TOLL-like receptors linking innate and adaptive immune response. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **91**, 1-12.

Wilson H.L., Dar A., Napper S.K., Marianela Lopez A., Babiuk L.A., Mutwiri G.K., 2006. Immune mechanisms and therapeutic potential of CpG oligodeoxynucleotides. *Int. Rev. Immunol.* **25**, 183-213.

Wilson K.D., de Jong S.D., Tam Y.K., 2009. Lipid-based delivery of CpG oligodeoxynucleotides enhances immunotherapeutic efficacy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **61**, 233-242.

Yang, T.T., Sinai, P., Kitts, P.A., Kain, S.R., 1997. Quantification of gene expression with a secreted alkaline phosphatase reporter system. *Biotechniques* **23**, 1110-1114.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Oligodeoxynucleotit không metyl hóa kích thích miễn dịch có công thức chung:



trong đó

mỗi N_1 là G;

mỗi N_2 độc lập là C hoặc G;

$N_3 = T, C$ hoặc G, với điều kiện là dạng kết hợp trong đó N_3 và N_4 đều là C được loại trừ;

mỗi N_4 và N_5 độc lập là C hoặc T;

$N_6 = A, T, G$ hoặc C;

$N_7 = A, T, C$ hoặc G;

$N_8 = A, T, C$ hoặc G;

$x = 3-10$;

$z = 0-10$;

$n = 2-100$;

$p = 1-6$ hoặc $1-25$ nếu $N_4 = T$;

$q = 1-6$ hoặc $1-25$ nếu $N_5 = T$;

$r = 0-8$ hoặc $1-25$ nếu $N_7 = T$;

$s = 0-8$ hoặc $1-25$ nếu $N_8 = T$;

hoặc muối được dụng của nó.

2. Oligodeoxynucleotit theo điểm 1, trong đó $N_6 = A, T$ hoặc C.

3. Oligodeoxynucleotit theo điểm 1 hoặc 2, trong đó N_3 là T hoặc G, và N_6 là Y.

4. Oligodeoxynucleotit theo điểm 3, trong đó N_3, N_4, N_5 và $N_6 = T$.

5. Oligodeoxynucleotit theo điểm 1 hoặc 2, trong đó N_3, N_4 và $N_5 = T$ và $N_6 = C$.

6. Oligodeoxynucleotit theo điểm 1 hoặc 2, trong đó N_3 là G và $N_6 = T$.

7. Oligodeoxynucleotit theo điểm 1 hoặc 2, trong đó $N_5 = T$ và $N_6 = C$.

8. Oligodeoxynucleotit theo điểm 1 hoặc 2, trong đó $N_5 = C$, $N_6 = C$ và $q = 1$.
9. Oligodeoxynucleotit theo điểm 1 hoặc 2, trong đó $N_4 = T$ và $N_5 = Y$.
10. Oligodeoxynucleotit theo điểm 9, trong đó $N_4 = T$ và $N_5 = T$.
11. Oligodeoxynucleotit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, trong đó x nằm trong khoảng từ 4 đến 7, và $r = 0$ hoặc N_7 là A hoặc T.
12. Oligodeoxynucleotit theo điểm 11, trong đó $x = 6$.
13. Oligodeoxynucleotit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12, trong đó z nằm trong khoảng từ 0 đến 6, và $s = 0$ hoặc N_8 là A hoặc T.
14. Oligodeoxynucleotit theo điểm 13, trong đó z nằm trong khoảng từ 0 đến 3.
15. Oligodeoxynucleotit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14, trong đó N_2 là G.
16. Oligodeoxynucleotit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 15, trong đó n nằm trong khoảng từ 3 đến 18.
17. Oligodeoxynucleotit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 15, trong đó n nằm trong khoảng từ 4 đến 18.
18. Oligodeoxynucleotit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 15, trong đó n nằm trong khoảng từ 5 đến 18.
19. Oligodeoxynucleotit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11, trong đó n nằm trong khoảng từ 5 đến 18 và x nằm trong khoảng từ 4 đến 7 và z nằm trong khoảng từ 0 đến 3 và $r = 0$ hoặc N_7 là A hoặc T, và $s = 0$ hoặc N_8 là A hoặc T.
20. Oligodeoxynucleotit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 19, trong đó N_1 và N_2 có liên kết phosphothioat và các nucleotit khác có liên kết phosphodiester.
21. Oligodeoxynucleotit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 20, trong đó $N_7 = T$ và $N_8 = T$.
22. Oligodeoxynucleotit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 21, trong đó $\{N_3 [N_4]_p C G [N_5]_q N_6\}_n$ là polyme đồng nhất.
23. Oligodeoxynucleotit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 22, trong đó oligodeoxynucleotit này được bắt cặp với chất mang hoặc bán kháng nguyên.

24. Vectơ chứa oligodeoxynucleotit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 22.
25. Vacxin để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh truyền nhiễm, khác biệt ở chỗ, vacxin này chứa lượng kích thích miễn dịch của oligodeoxynucleotit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 23 và/hoặc vectơ theo điểm 24, lượng miễn dịch của thành phần kháng nguyên hoặc thông tin di truyền mã hóa thành phần kháng nguyên, và chất mang được dùng.
26. Vacxin theo điểm 25, khác biệt ở chỗ, thành phần kháng nguyên là hoặc thu được từ virus hoặc vi sinh vật mà dạng kiểu đại của nó gây bệnh ở gia cầm.
27. Vacxin theo điểm 26, khác biệt ở chỗ, virus hoặc vi sinh vật được chọn từ nhóm bao gồm virus gây bệnh viêm phế quản truyền nhiễm, virus gây bệnh Newcastle, bệnh Bursal truyền nhiễm (bệnh Gumboro), tác nhân gây thiếu máu ở gà, Reovirus ở gia cầm, *Mycoplasma gallisepticum*, virus viêm mũi-khí quản gà tây, *Haemophilus paragallinarum* (Coryza), virus đậu mùa ở gà, virus viêm não tùy ở gia cầm, virus gây hội chứng giảm đẻ, virus gây viêm thanh khí quản truyền nhiễm, virus herpes ở gà tây, loài *Eimeria*, *Ornithobacterium rhinotracheale*, *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma synoviae*, loài *Salmonella* và *E. coli*.

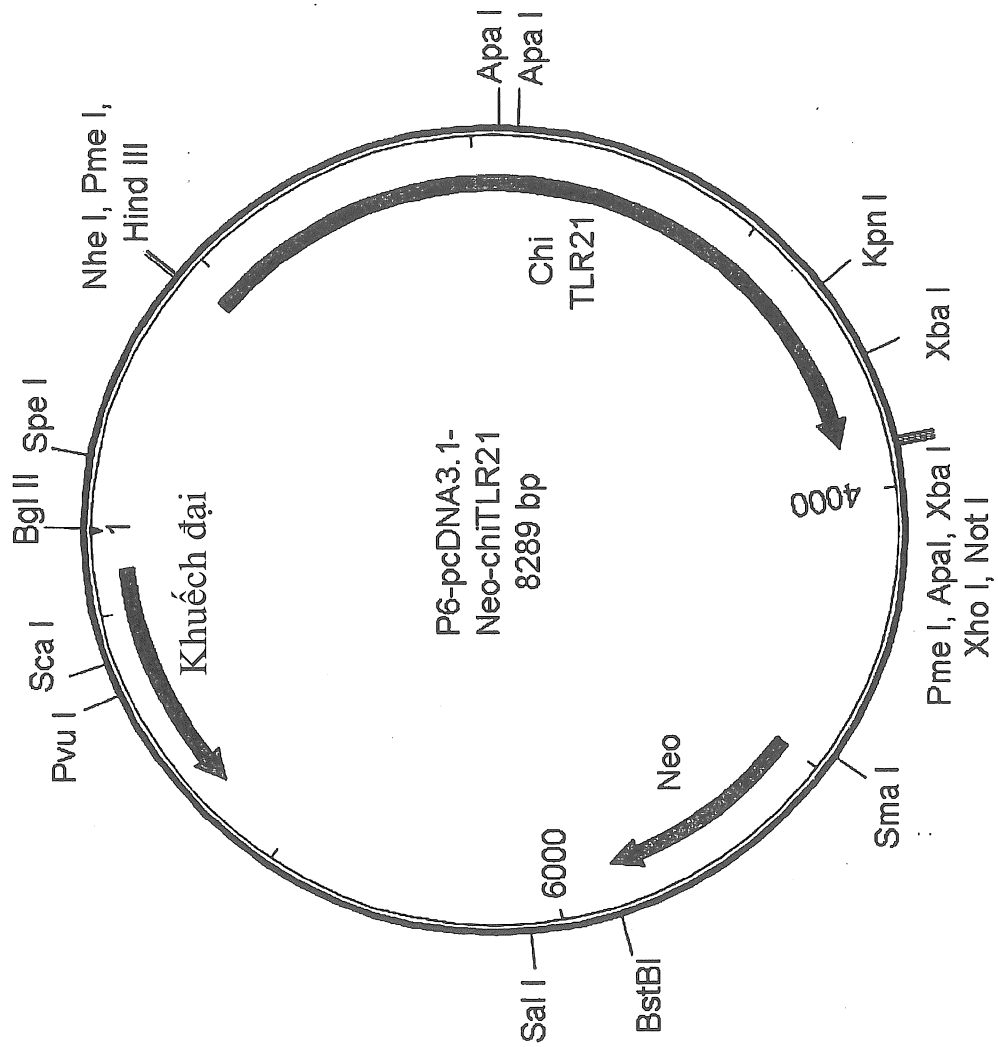


Fig.2

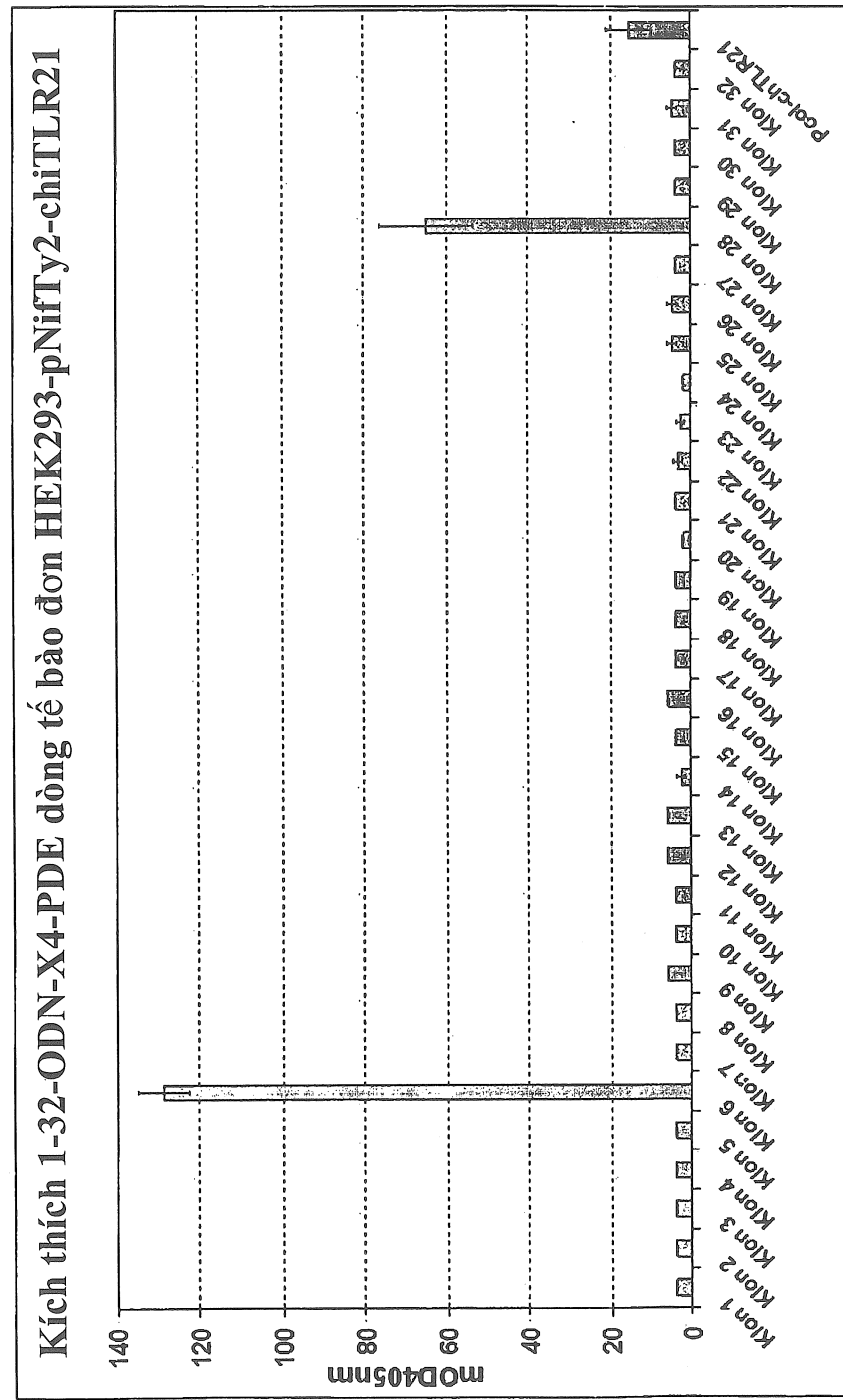


Fig.3

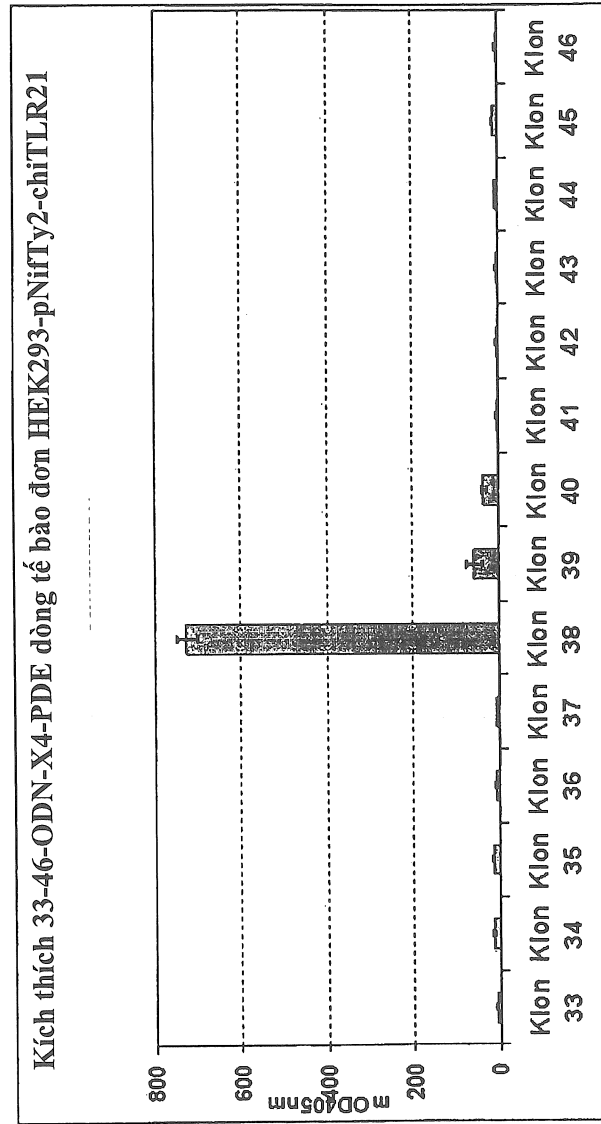
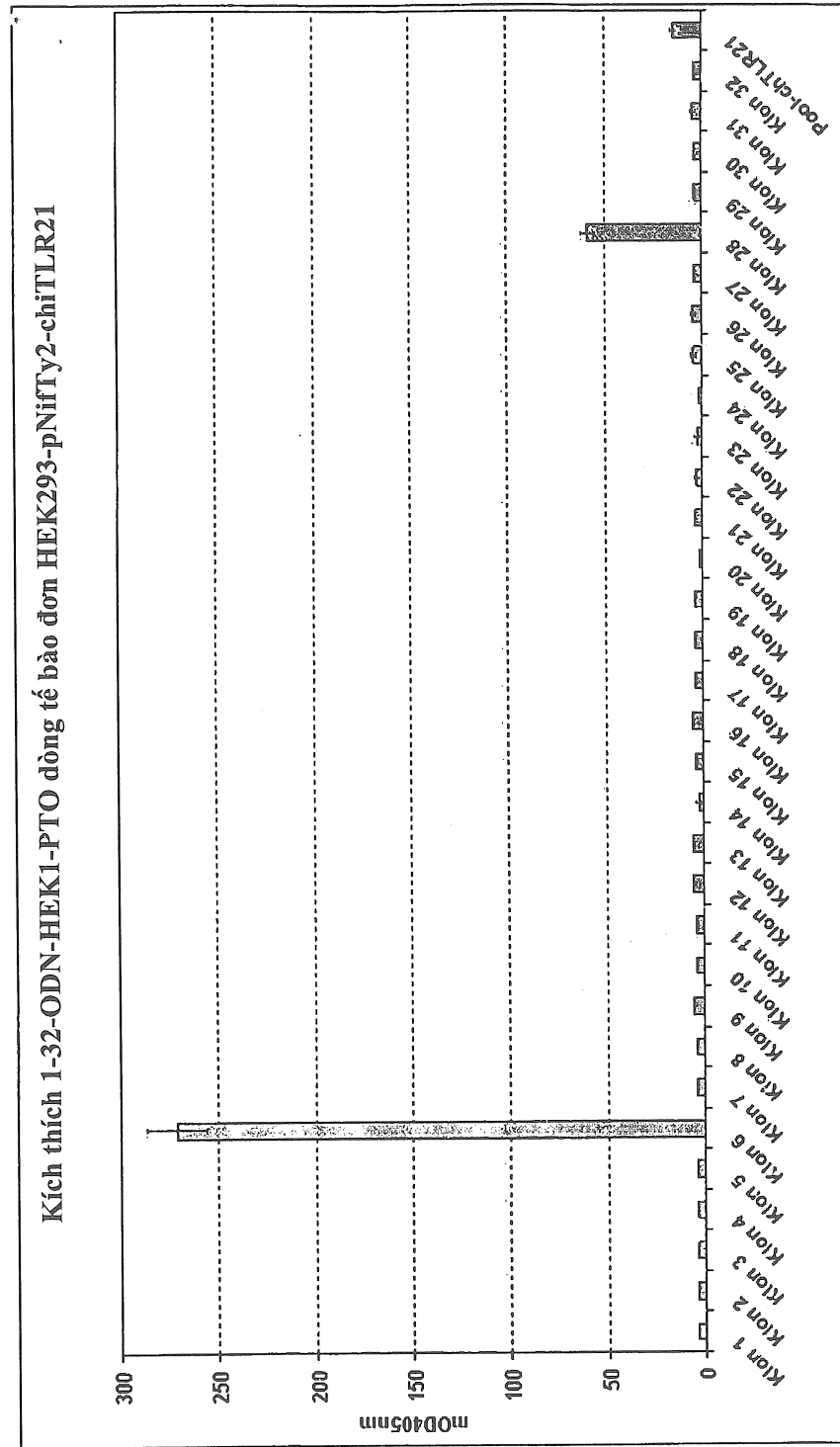


Fig.4



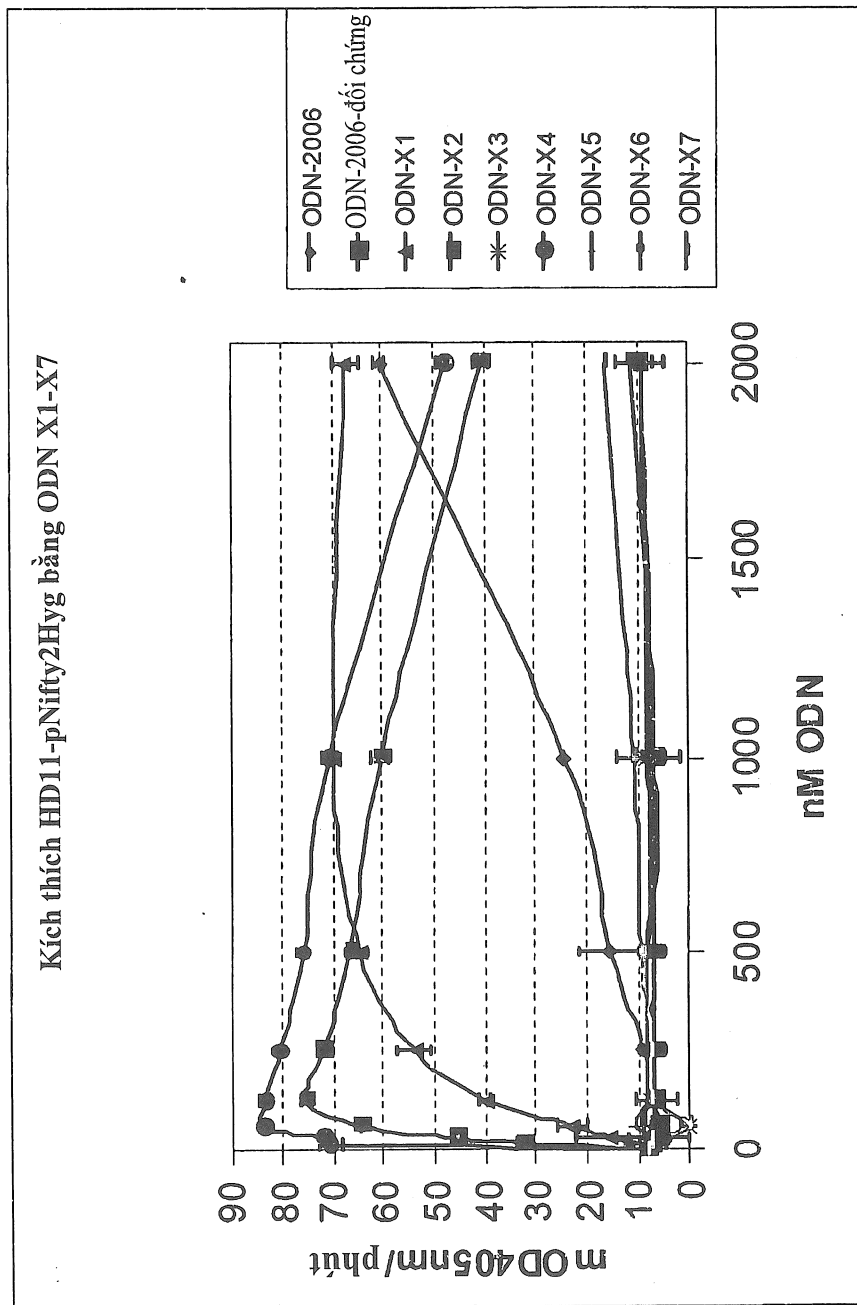


Fig.6

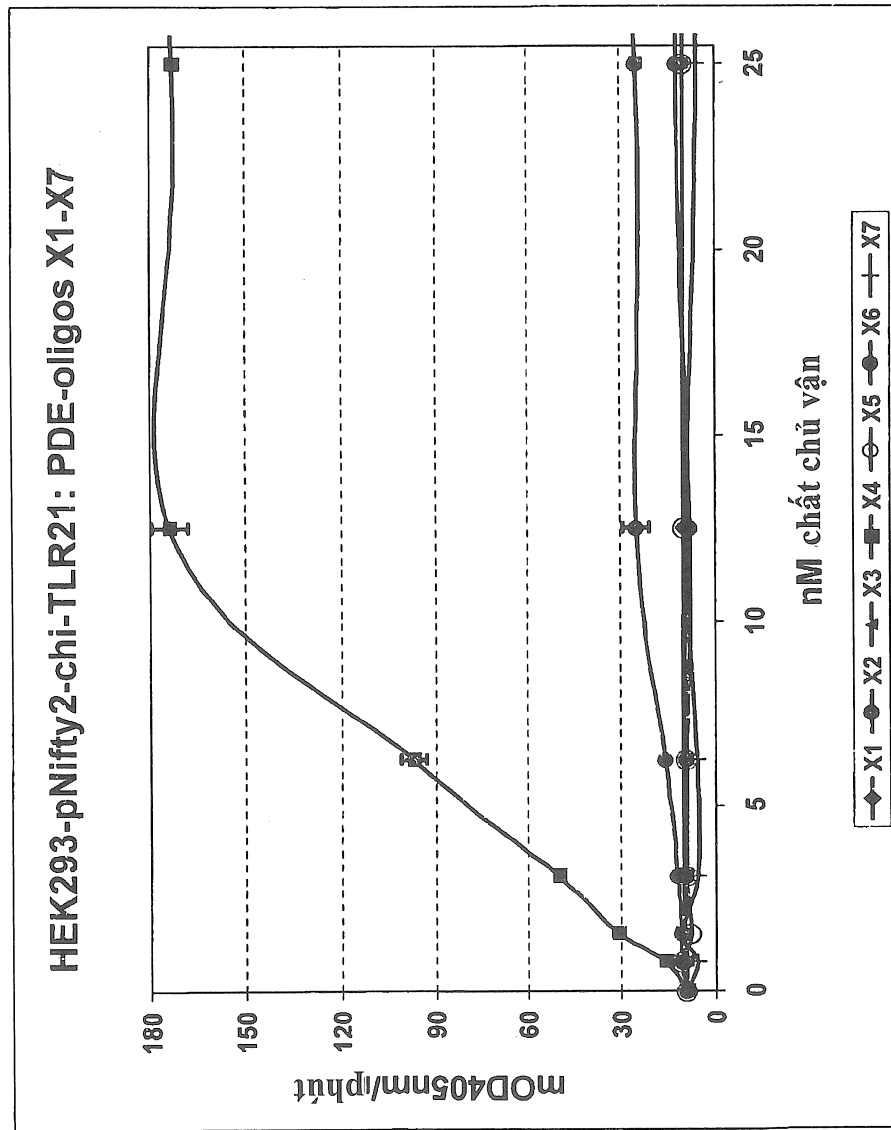


Fig.7

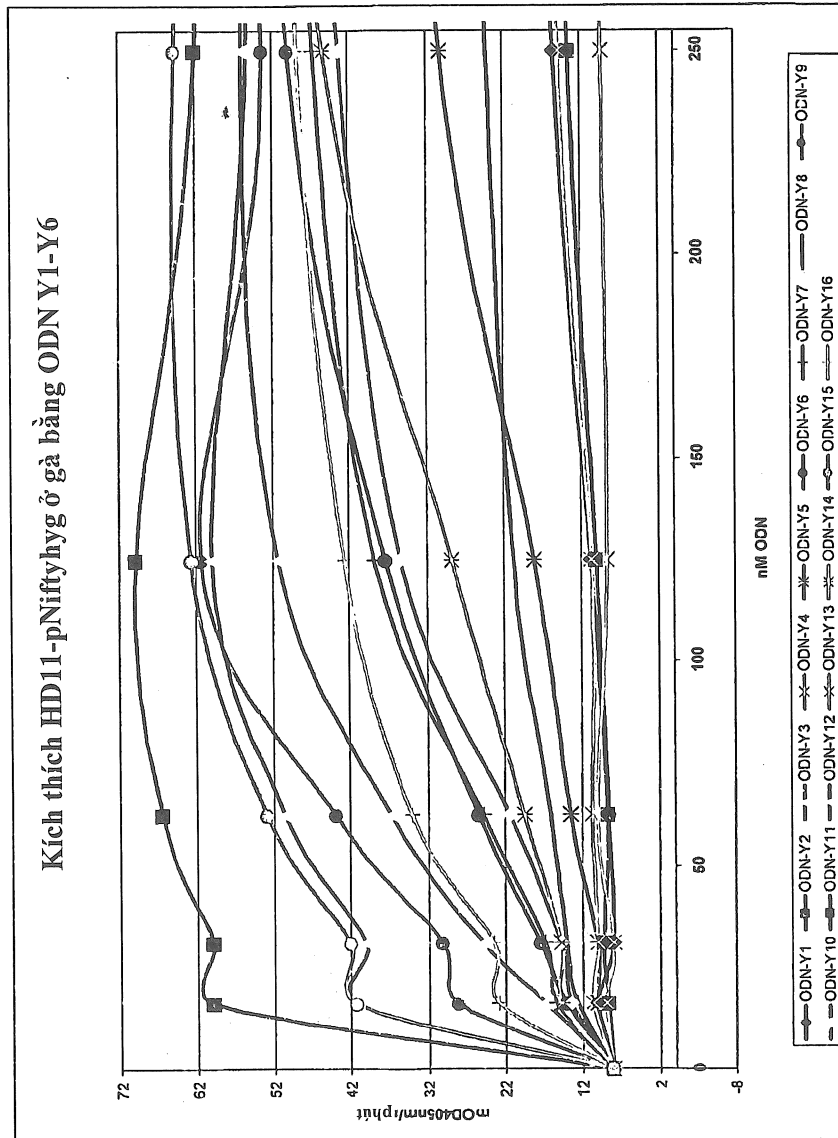


Fig.8

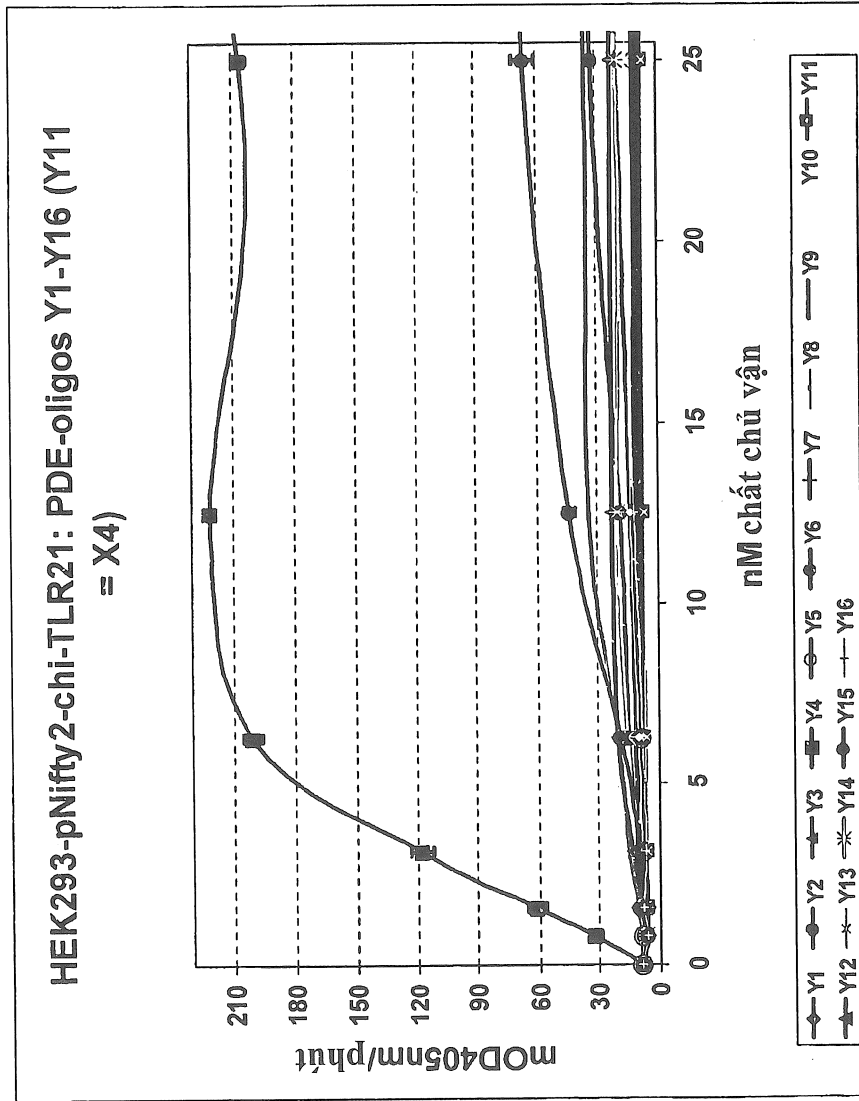


Fig.9

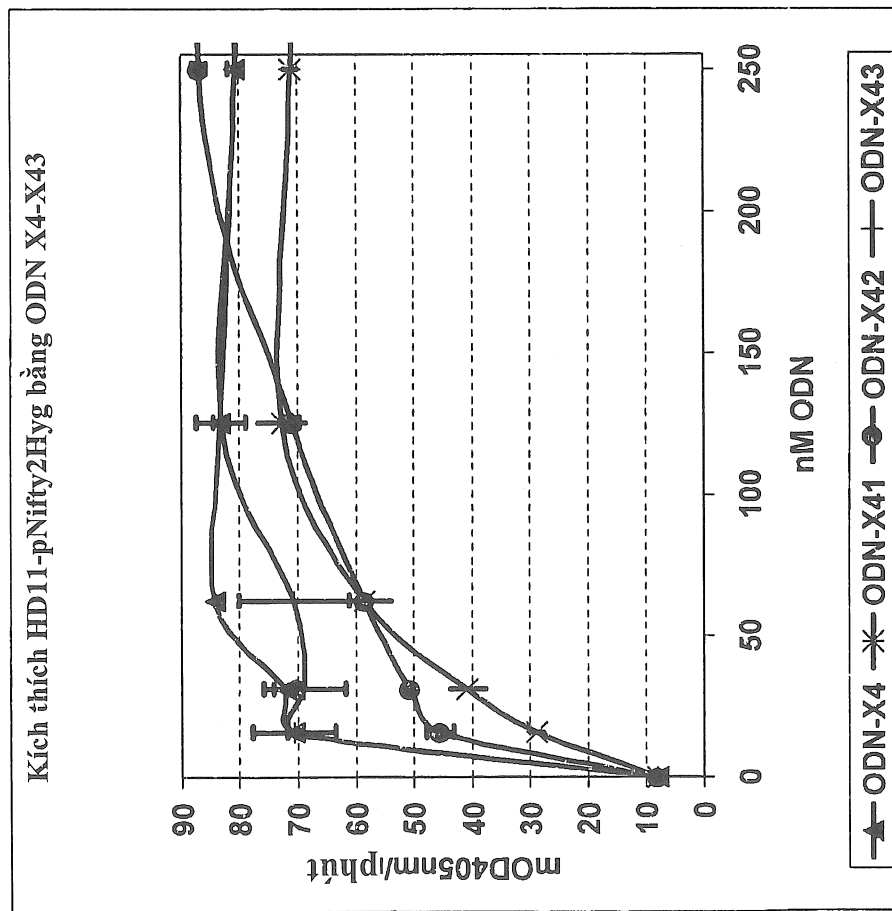


Fig.10

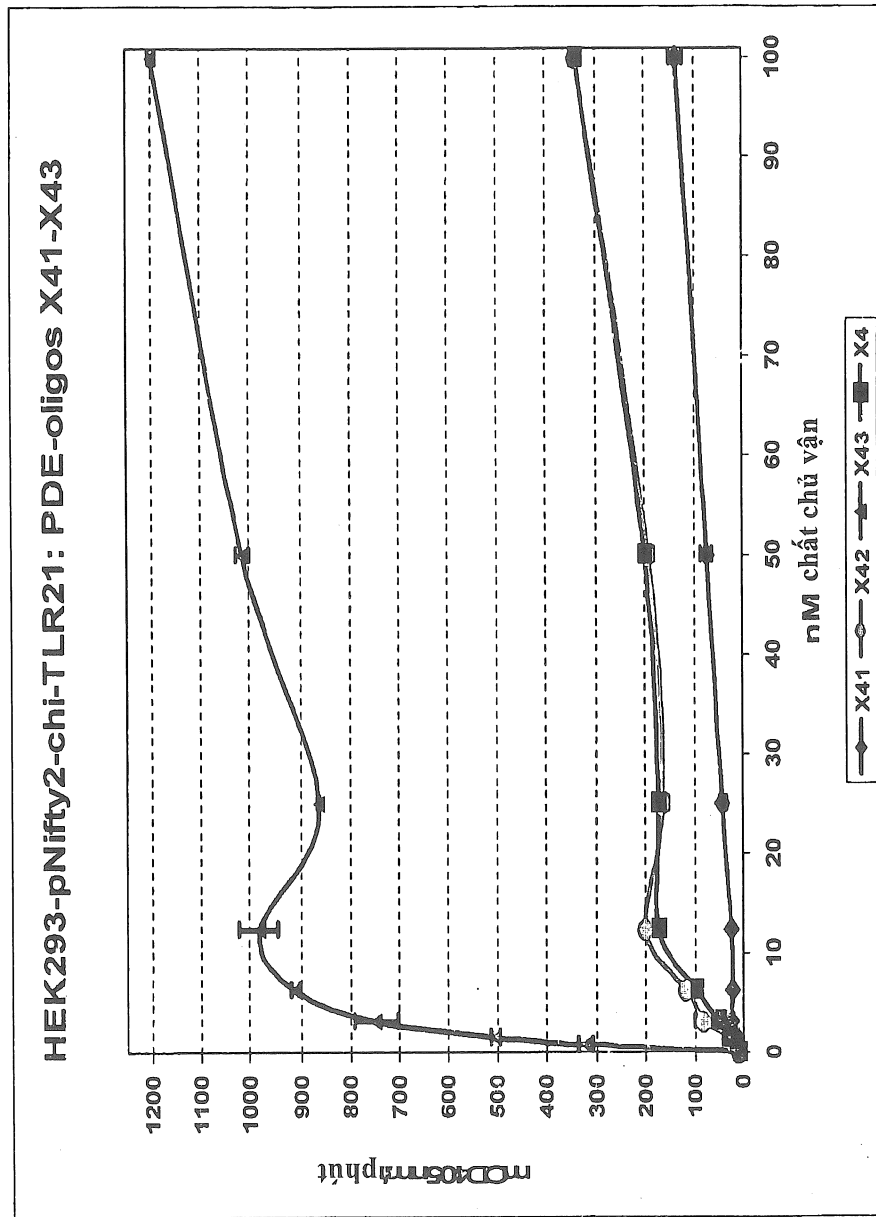


Fig.11

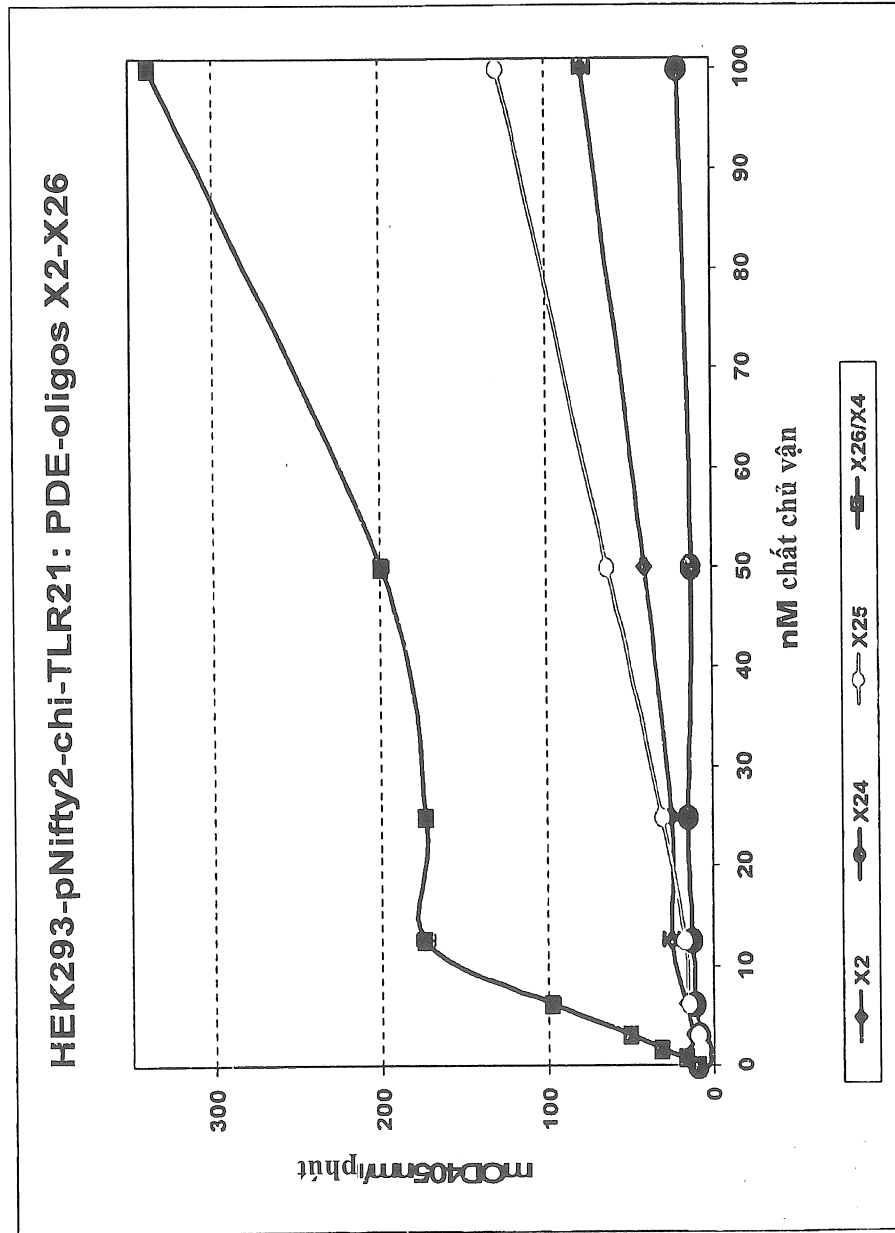


Fig.12

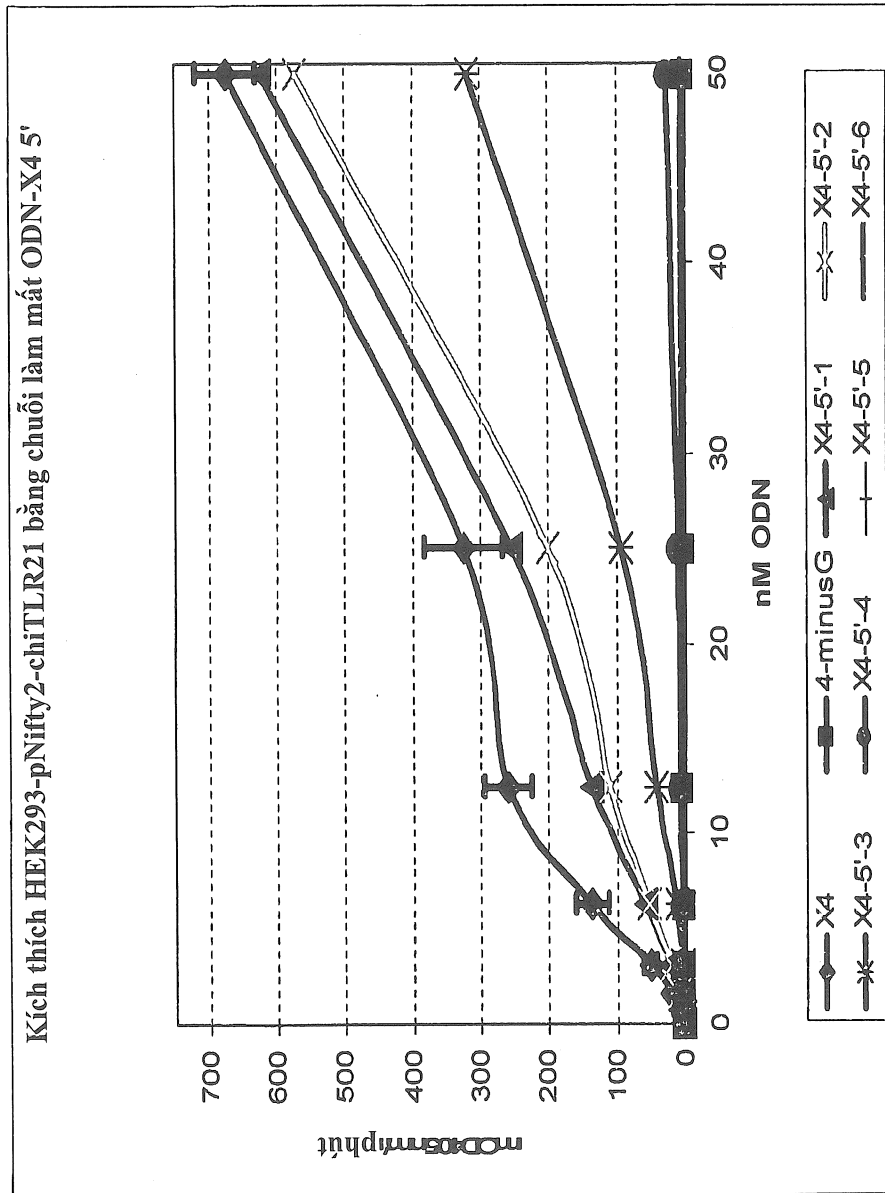


Fig.13

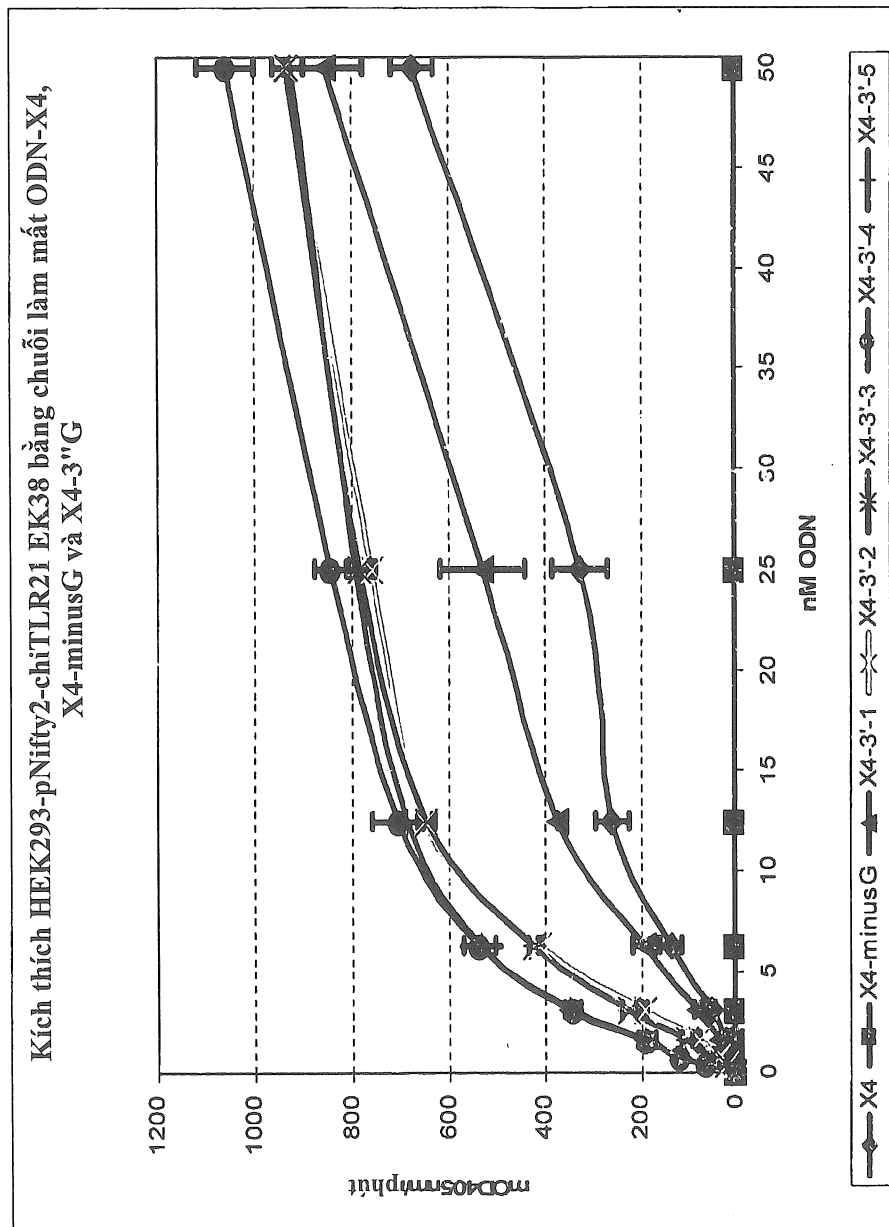


Fig.14

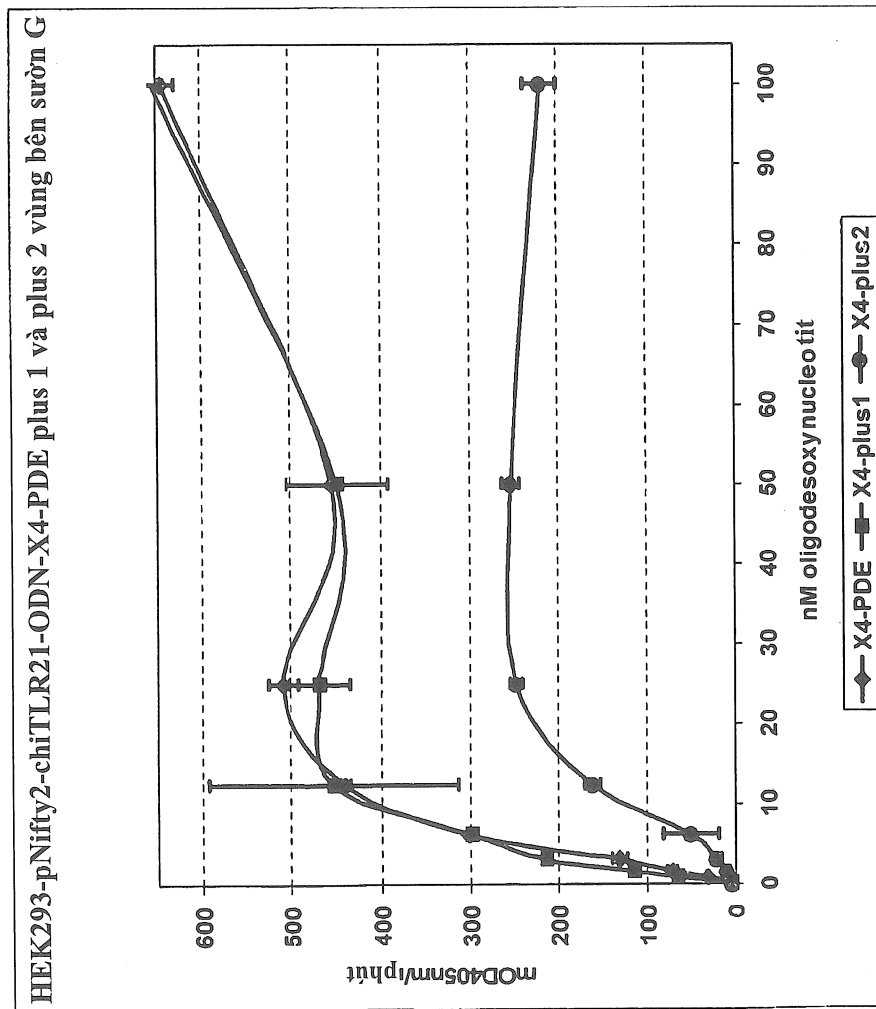


Fig.15

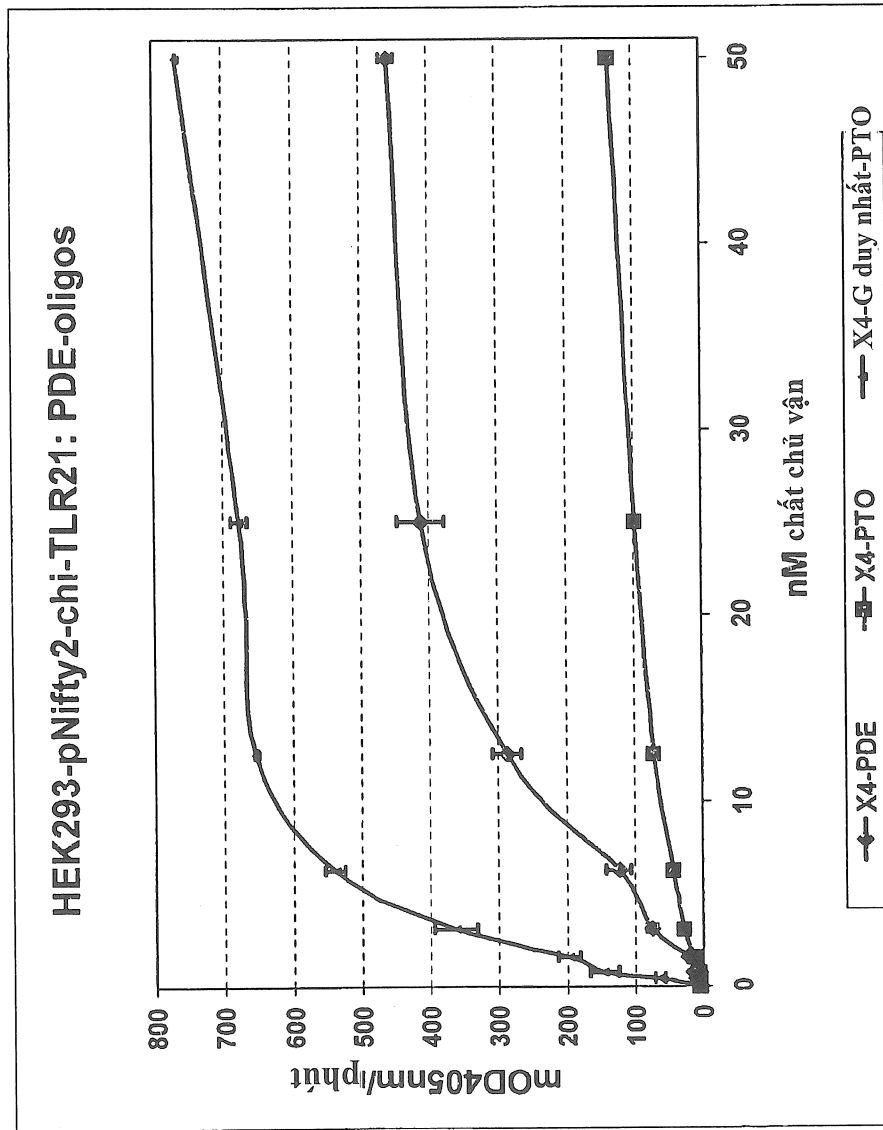


Fig.16

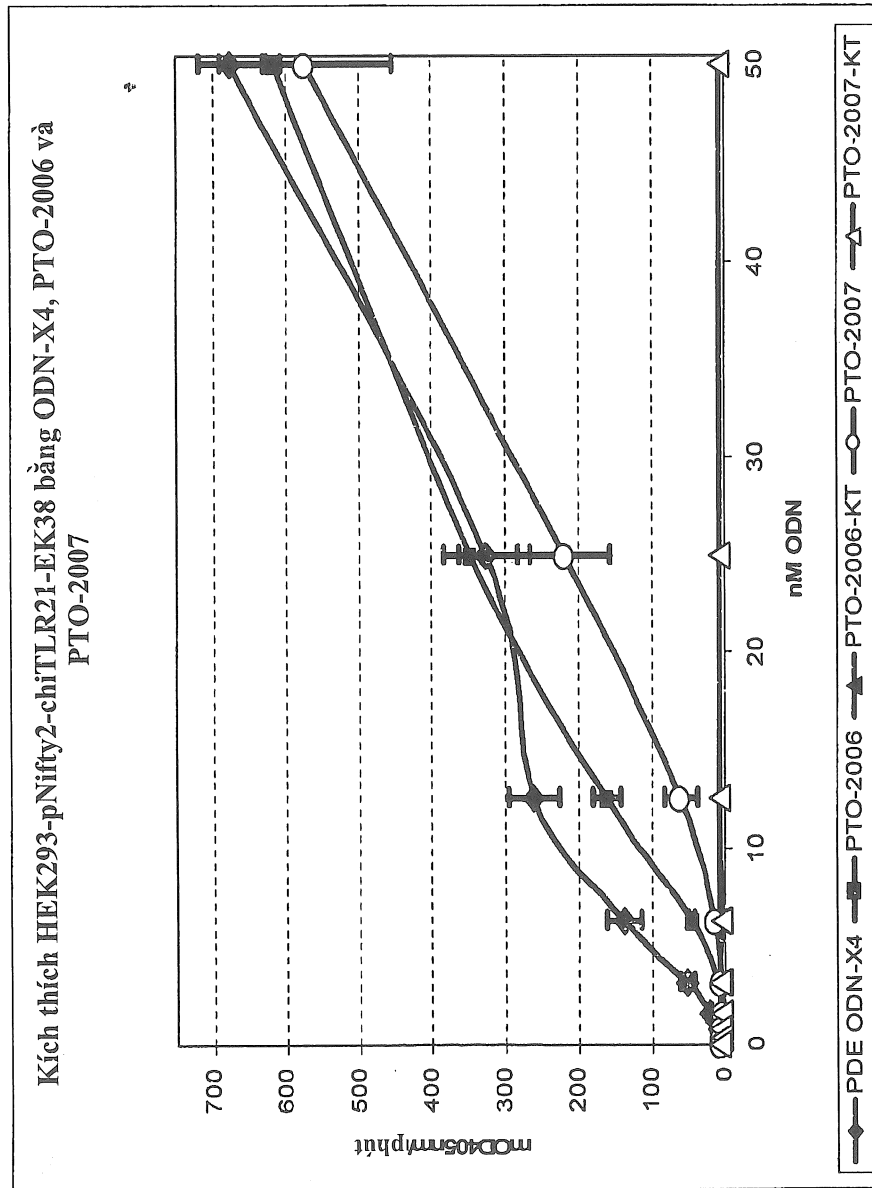


Fig.17

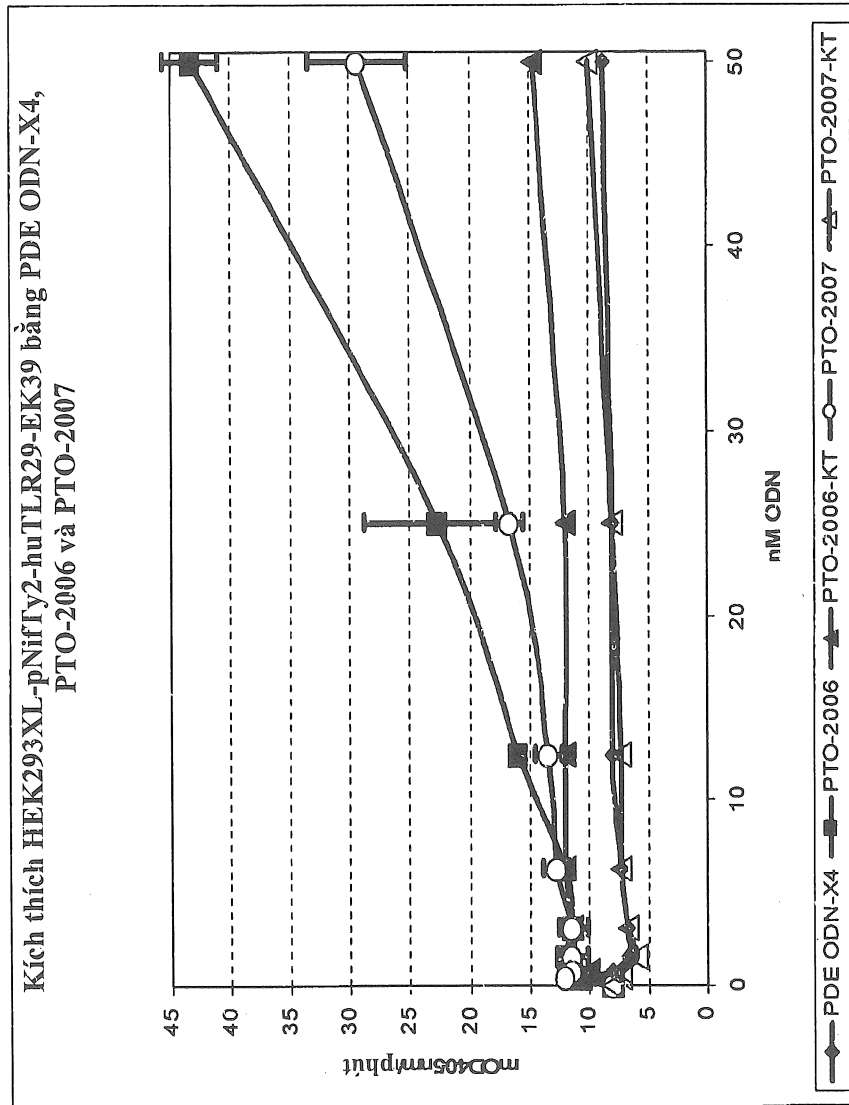


Fig.18

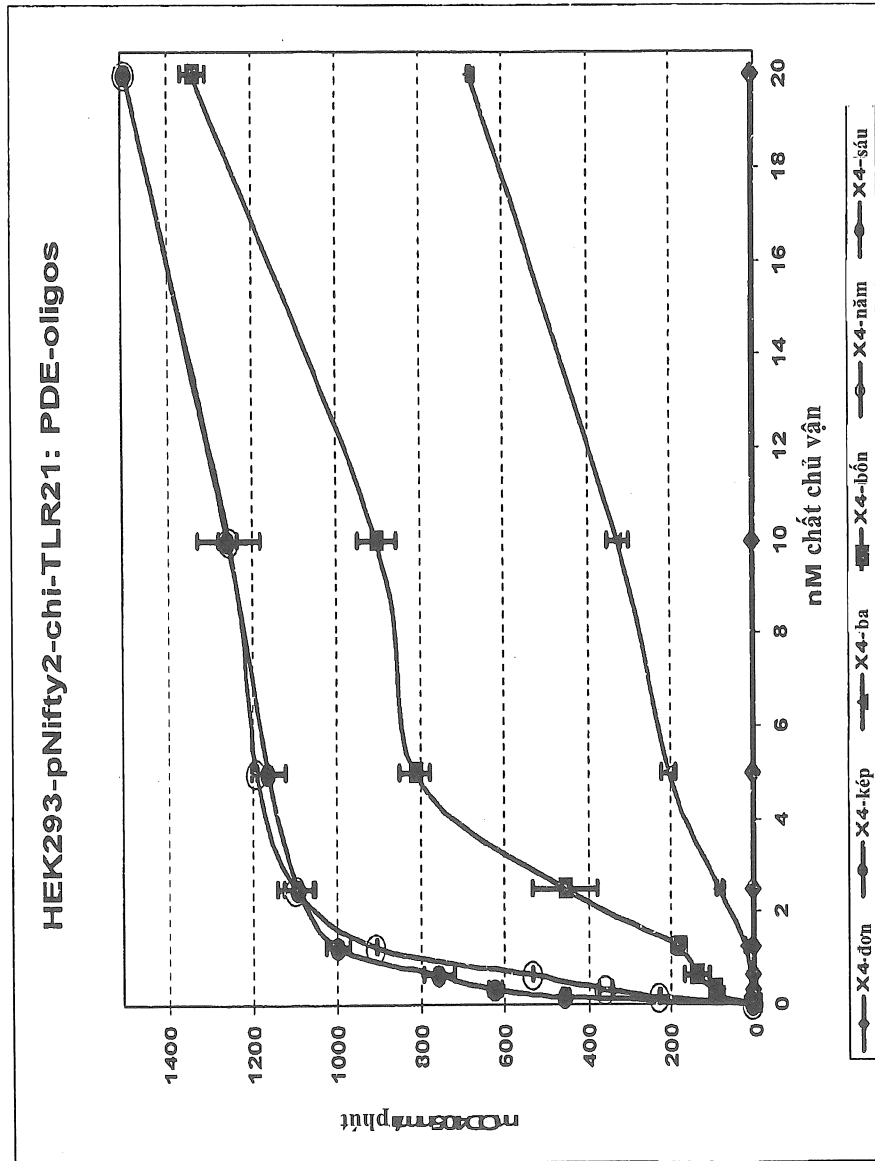


Fig.19

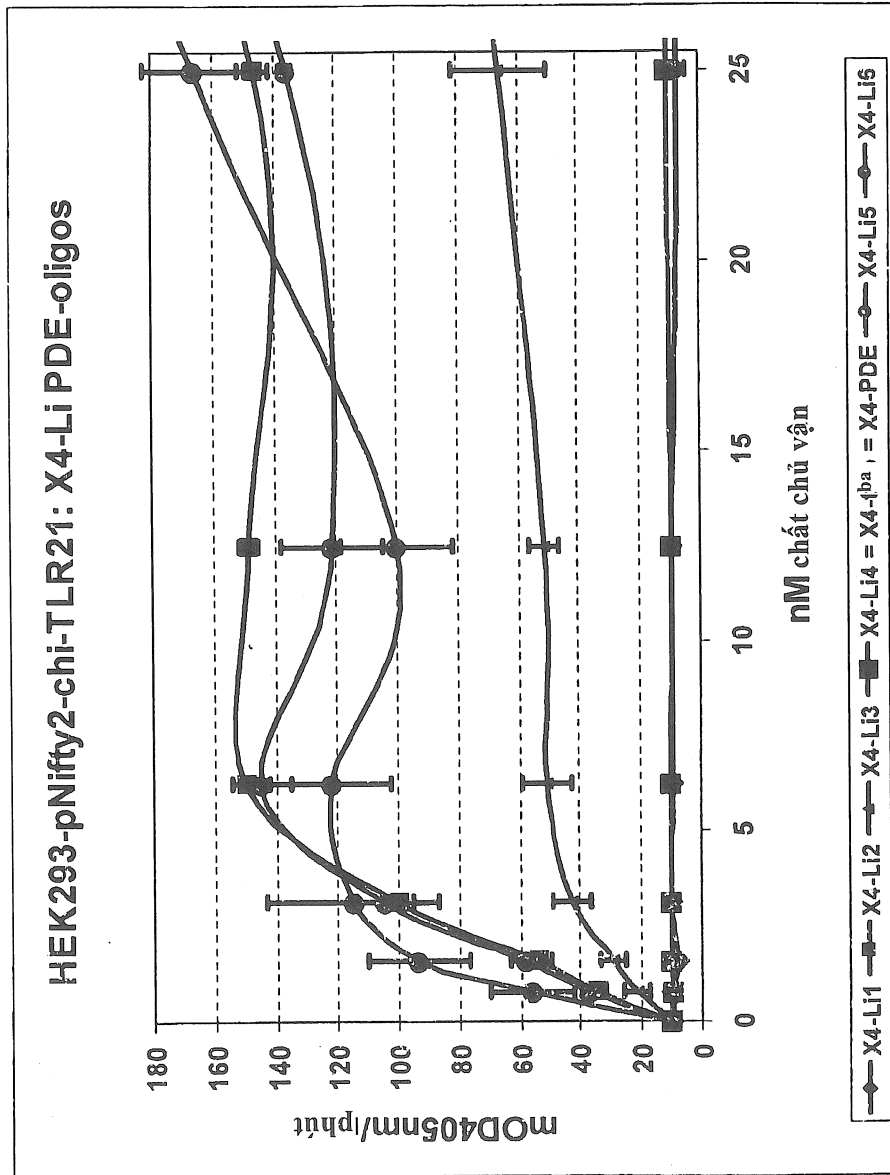


Fig.20

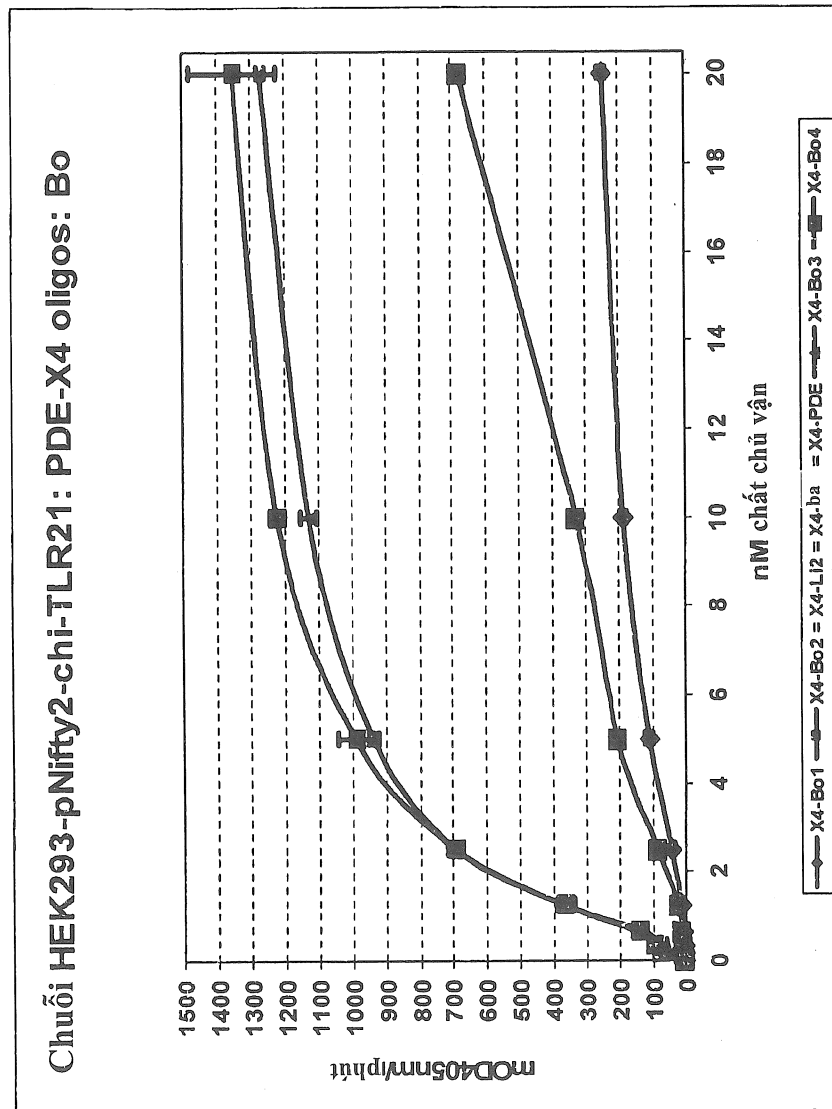


Fig.21

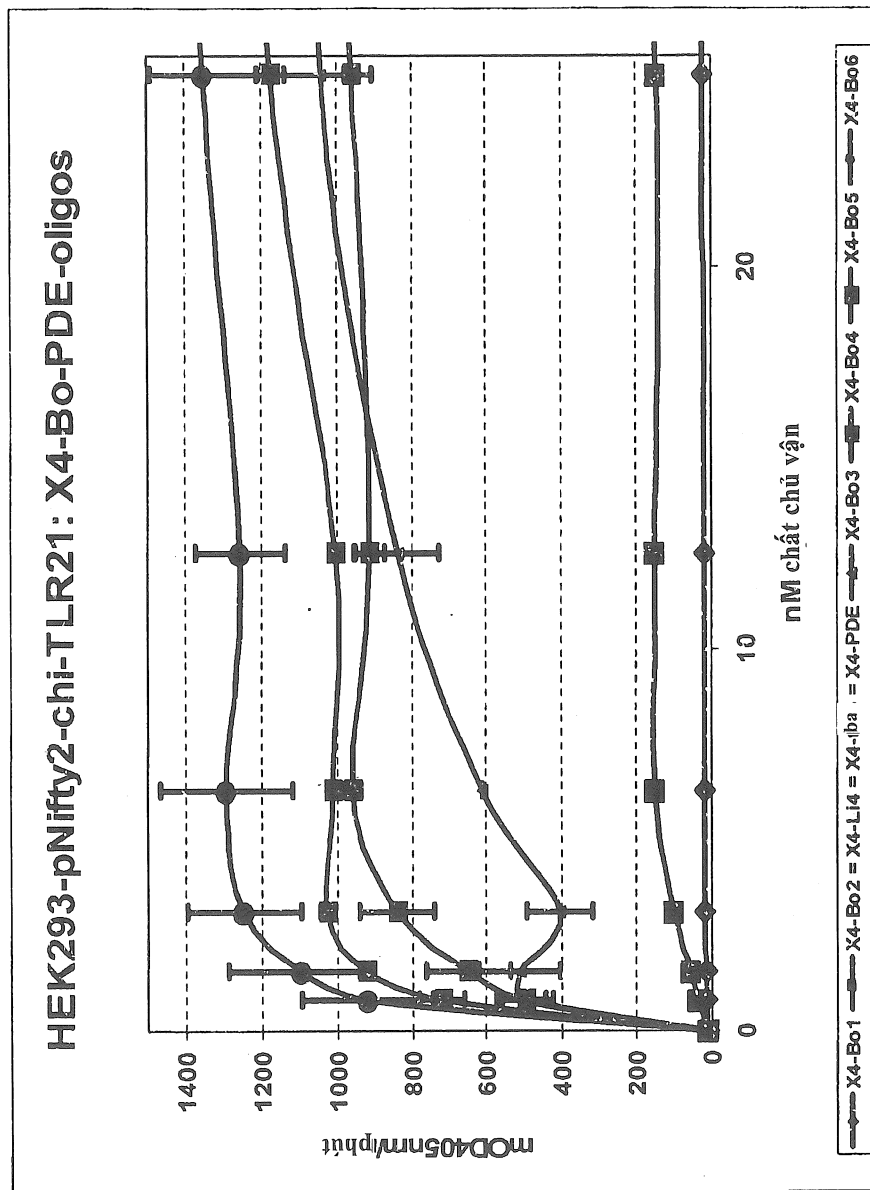


Fig.22

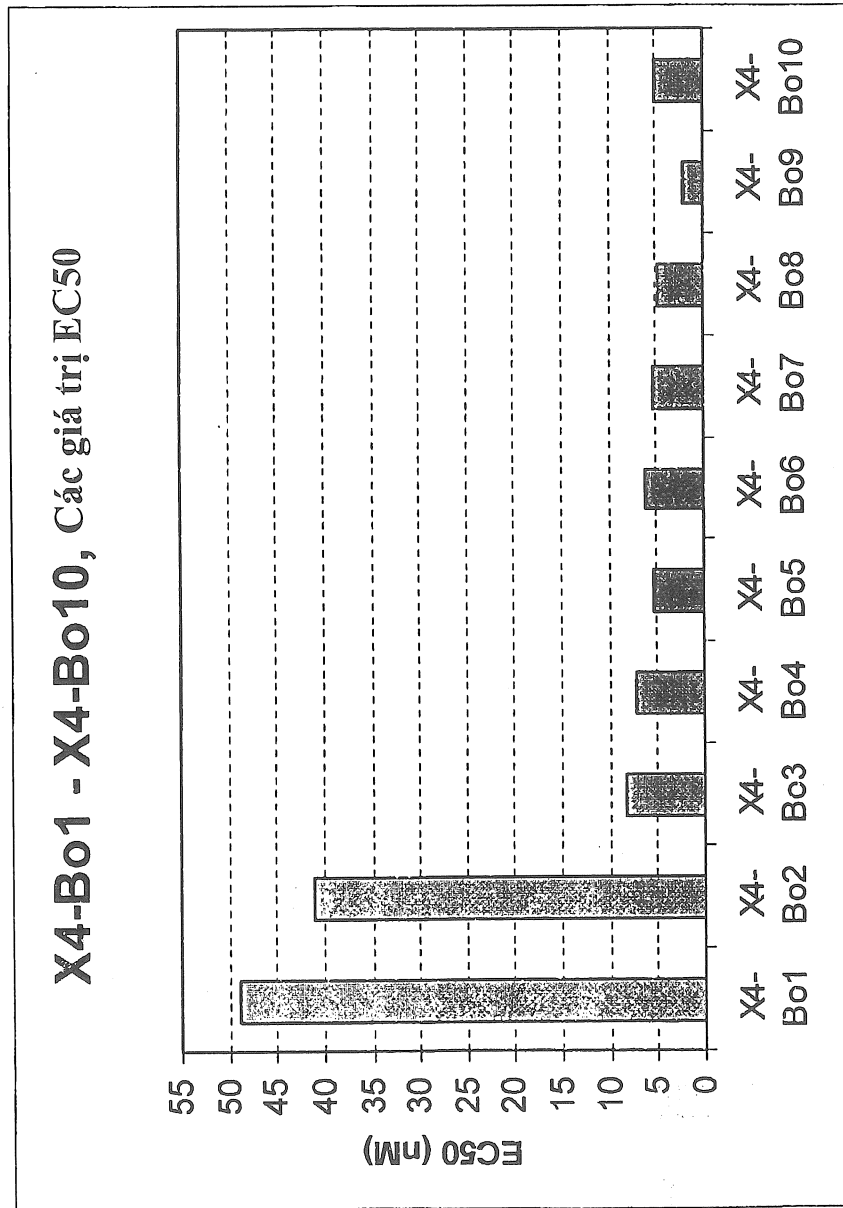


Fig.23

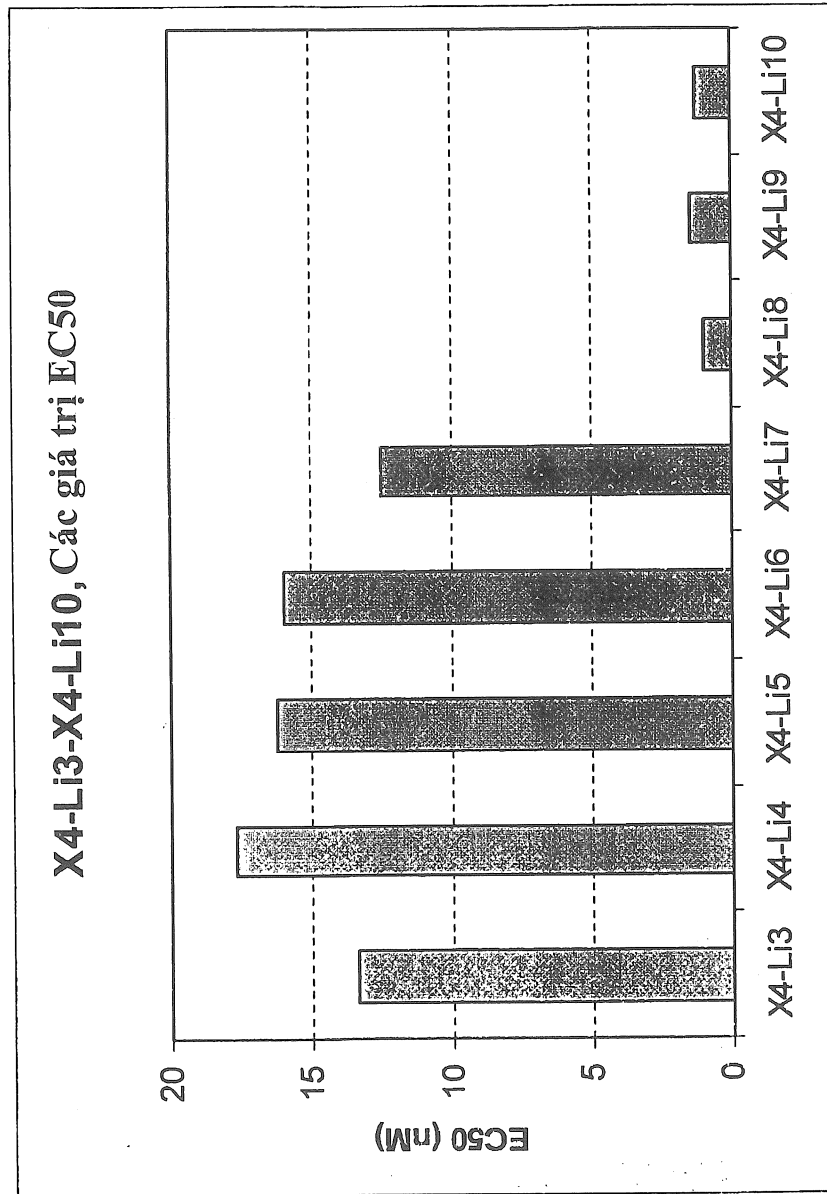


Fig.24

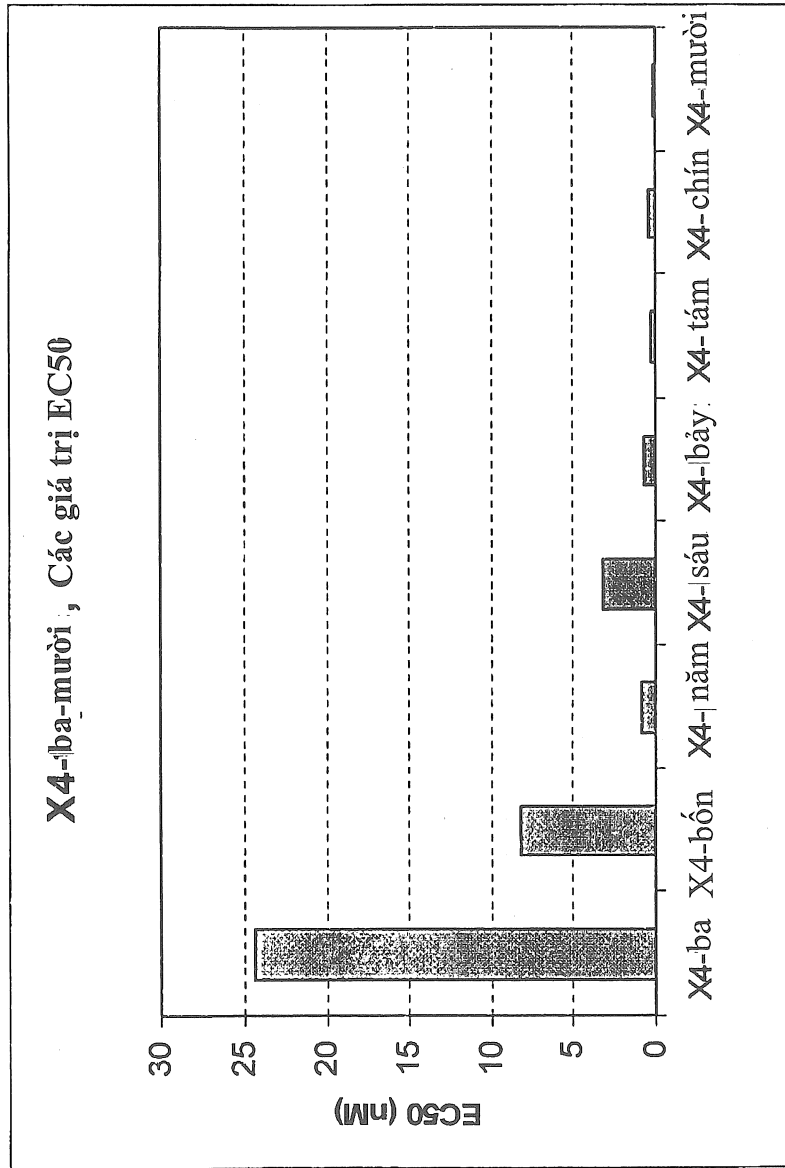


Fig.25

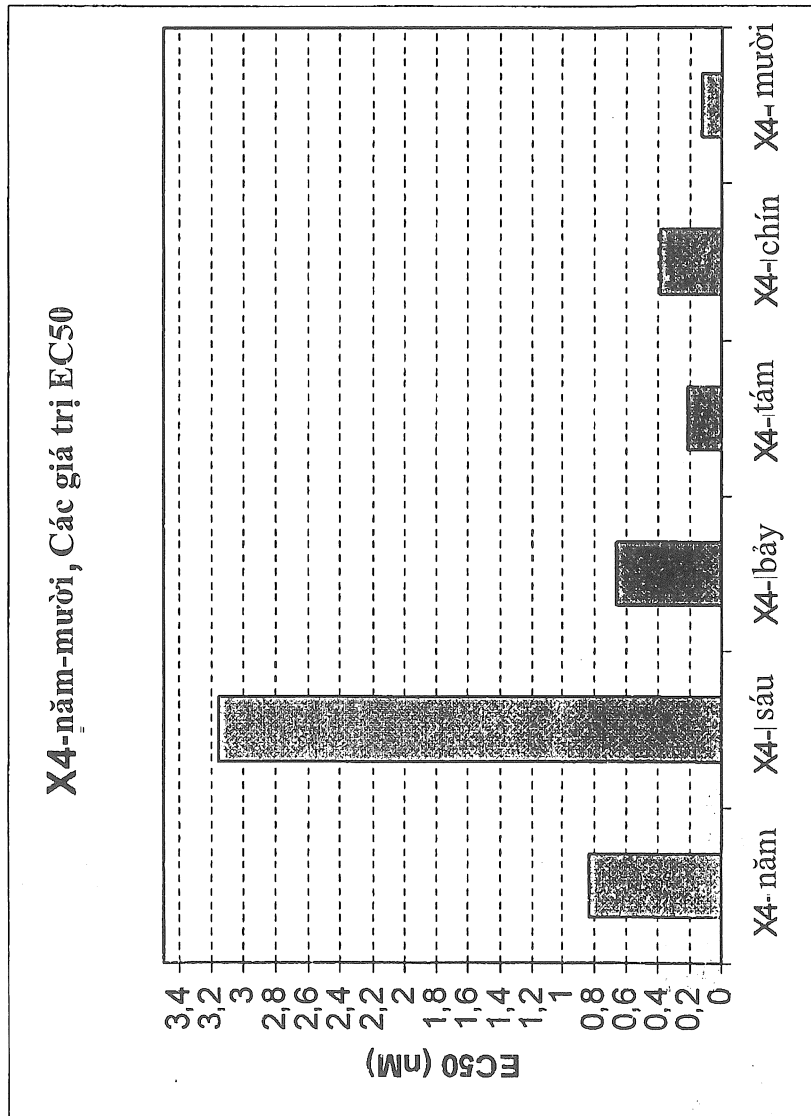


Fig.26

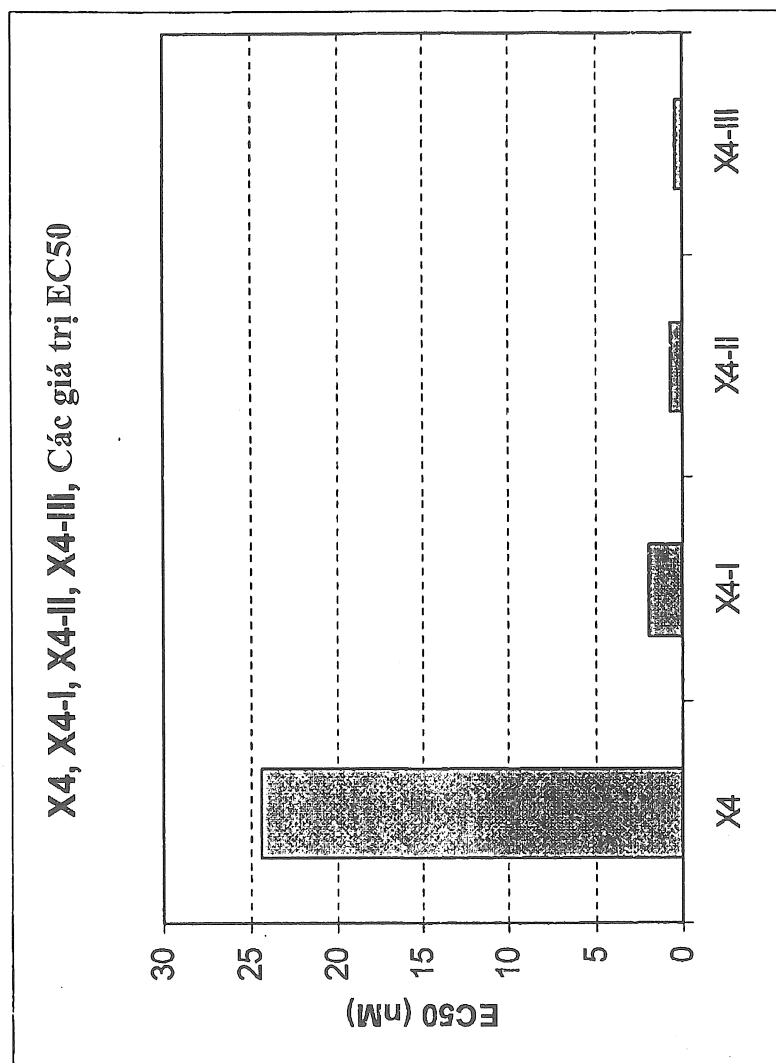


Fig.27

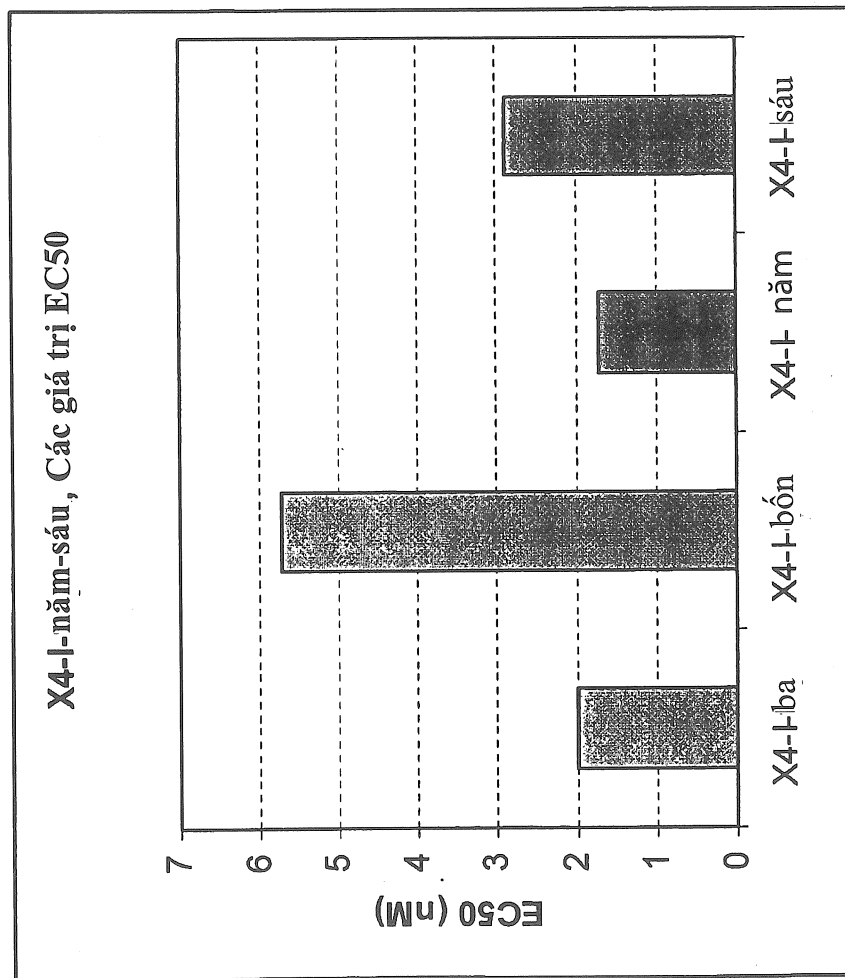


Fig.28

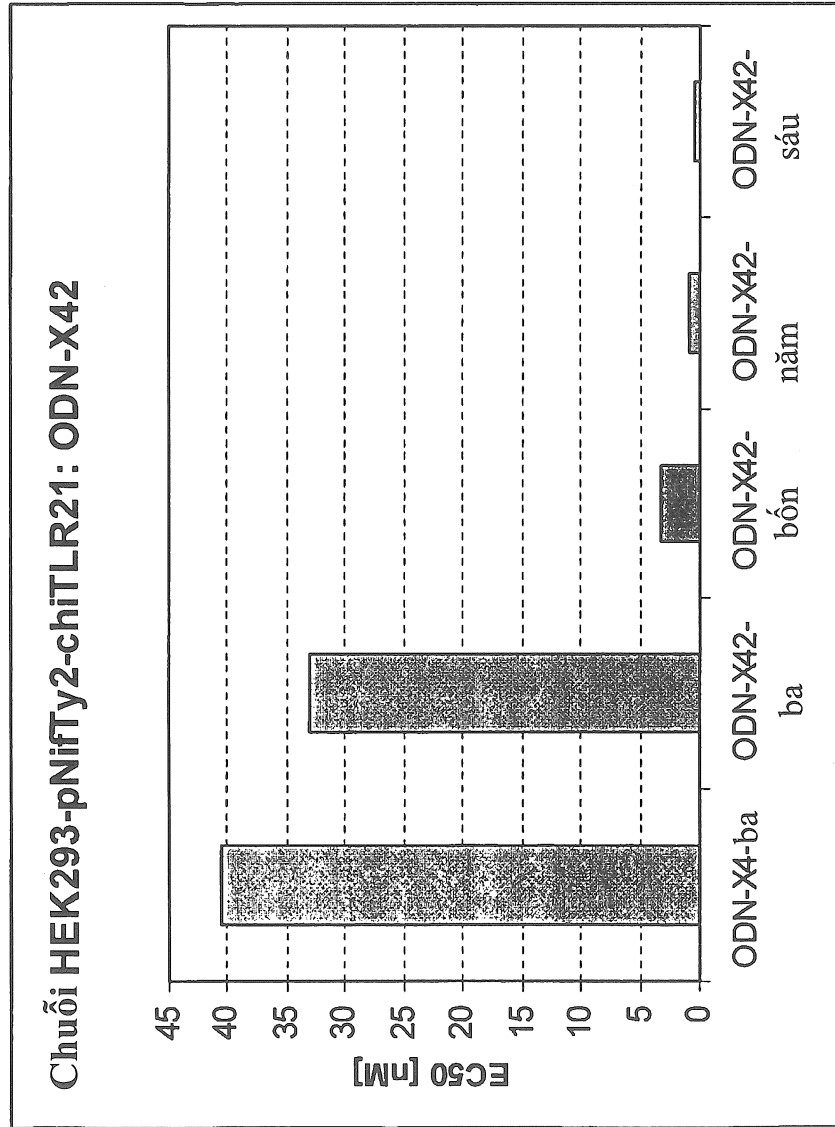


Fig.29

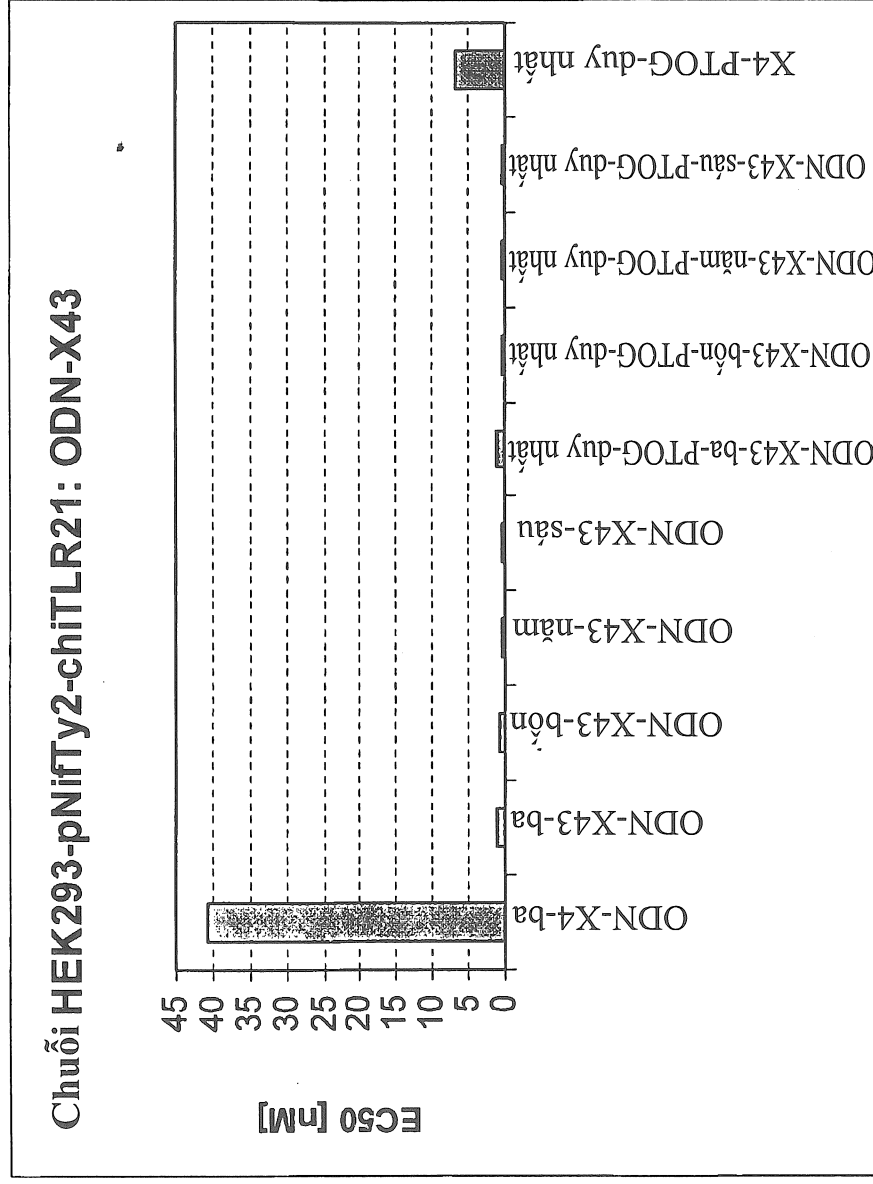


Fig.30

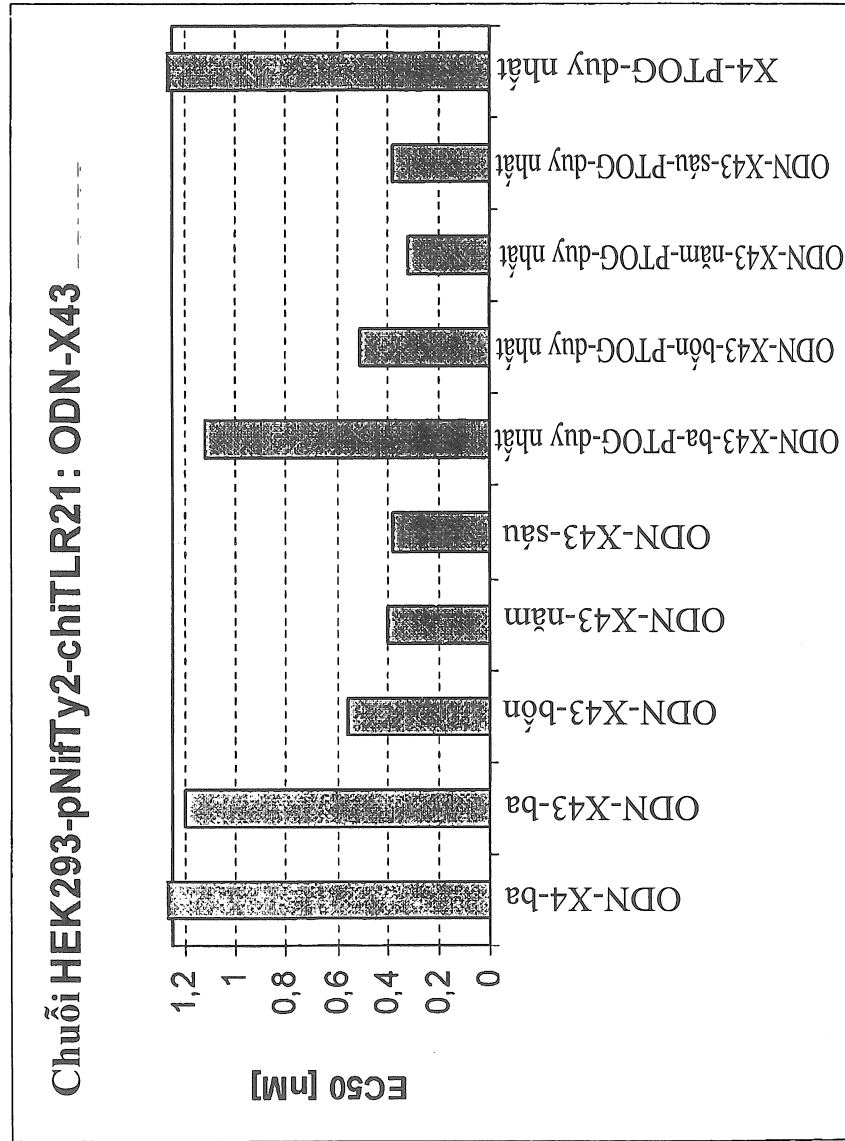


Fig.31

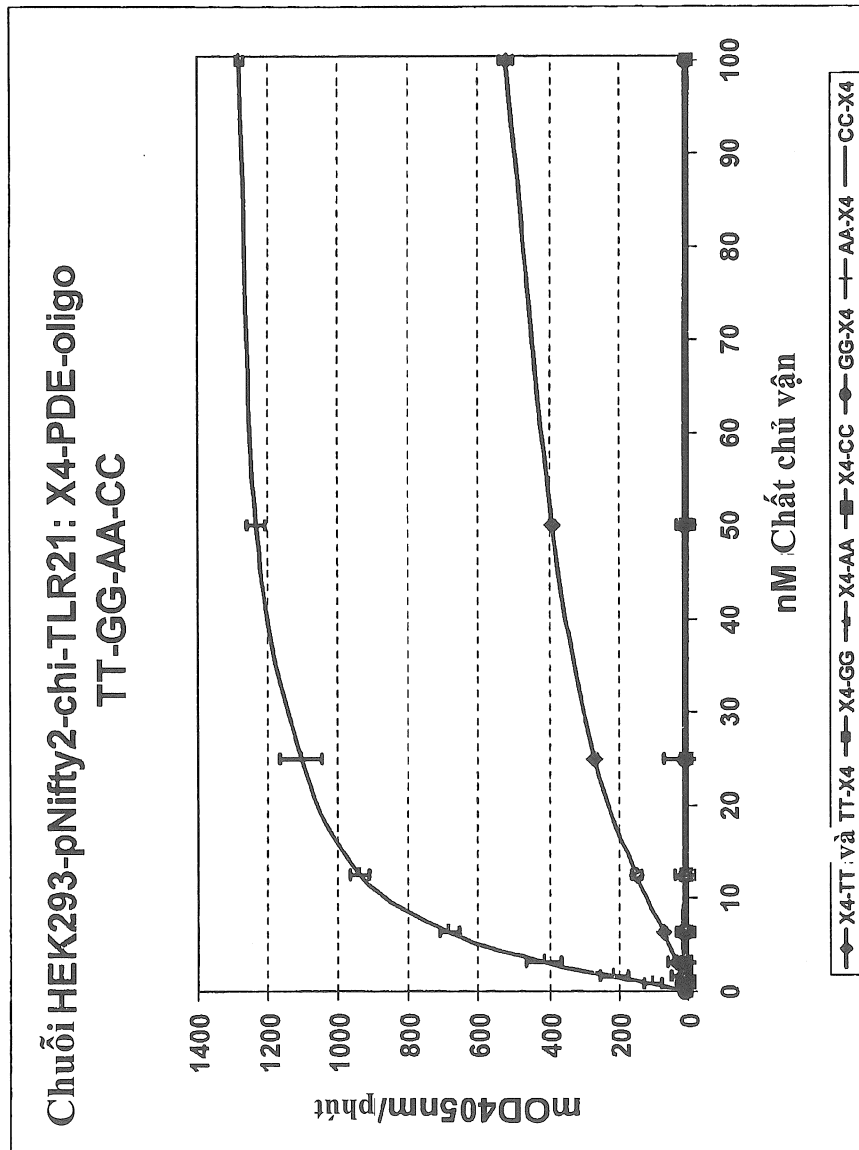


Fig.32

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110>	Intervet International BV	
<120>	Oligodeoxynucleotit kích thích miễn dịch, vectơ và vacxin chứa oligodeoxynucleotit này	
<130>	2010.031	
<160>	136	
<170>	PatentIn phiên bản 3.5	
<210>	1	
<211>	33	
<212>	ADN	
<213>	ADN tổng hợp	
<400>	1	
	gaagcttacc atgatggaga cagcggagaa ggc	33
<210>	2	
<211>	33	
<212>	ADN	
<213>	ADN tổng hợp	
<400>	2	
	ggcggccgct acatctgttt gtctccttcc ctg	33
<210>	3	
<211>	2935	
<212>	ADN	
<213>	ADN tổng hợp	
<400>	3	
	aagcttacca tgatggagac agcggagaag gcattggccca gcaccaggat gtgcccctcc	60
	cactgctgtc cactctggct gctgctgctg gtgacagtga cactgatgcc gatggtgcac	120
	ccgtatggct ttgcgaactg cattgaggat gtcaaggcac ctttgtactt ccgctgcatc	180
	cagcgttcc tgcagtcgcc ggccctggca gtgtctgacc tgccaccaca tgccatcgcg	240
	ctcaatctgt catacaaaa aatgcgctgc ctgcagccct ctgcctttgc ccacctgaca	300
	cagctgcata ccctggacct gacctacaac ctctctggaga ccctctcccc tgggtgcttc	360
	aatgggctgg gtgtgctggt ggtgctggac ctgtctcaca acaagctgac cacacttgct	420
	gaaggggtgt tcaacagctt gggcaacctg tcctcgctgc aggtacaaca taacccctc	480
	agcacggtgt caccaagtgc tctgctaccc ctggtcaacc tgcgccgctt gtctctacgg	540
	ggcgggctgc tgaatgggtt gggggcagtg gcagtggcag tgcagggtt ggcacagctg	600
	gagctgttg acctatgtga aaacaacctg acaacgctgg ggccaggccc accgctaccc	660
	gcctcgctgc tcaccctgca gctgtgcaac aactcgctga gggagttagc ggggggcagc	720
	ccggagatgc tatggcacgt gaagatactc gacctctcct acaacagtat ctacagggc	780
	gaggtcttca ccagctcca cctgcgcaac atcagcctgctccacctgat cggcaacccc	840
	ttgatgtct tccacctgtt ggacatctct gacatccaac ctgcgagcct ggatttctct	900
	gggttggtgc tgggggctca ggggctggat aaggtgtgcc tgaggctgca ggggtcccag	960

gccttgccgc ggctgcagct acaacgcaac gggctgaagg tgctgcattg taatgcactg 1020
 cagttgtgtc ctgtgctgag agagctggac ctgtcctgga accggctaca gcacgtgggc 1080
 tgtgccggcc ggctgctggg caagaagcag cgggagaagc tggaaagtgt gacagtggaa 1140
 cacaacctgc tgaagaaact gccgtcttgc ctggggggccc aggtgctgcc tcggctgtac 1200
 aacatttcct tccgctttaa ccgcatcctg actgttgggc cccaagcctt tgcctacgcc 1260
 ccggccctgc aggtgttgtg gctcaatatt aacagcctgg tgtggctgga caggcaggca 1320
 ctgtggaggc tgcacaacct gacagagctg cgcctggaca acaacctgct gaccgacctc 1380
 tatcacaact ccttcattga cctccacaga ctgcgcaccc tcaacctgcg caacaacctg 1440
 gtctccgtcc tcttctctgg tgtcttcag gggctggctg agctgcagac gctggattta 1500
 gggggcaaca acttgcgcca ctgactgca cagtactgc aggggctgcc caaactgcgc 1560
 aggtgttacc tggaccgcaa cagattgctg gaggtgagca gcaactgtgtt cgcctcagtg 1620
 caggctaccc tgggggtgct ggacctgcgg gccacaacct tgcagtacat ctacacgtgg 1680
 ctgcgcaagc cgcaccctt ccgcaacctg agcagcctgt acgacctgaa gctgcaggcg 1740
 cagcagccct atggactgaa gatgctgcct cactacttct tccagggtt ggtgaggctg 1800
 cagcagctgt cgctgtcaca gaacatgctg cgggtccatcc caccggatgt cttcgaggac 1860
 ttgggccagc tgcgtccct ggcatggct gacagcagca atgggctgca tgacctgcct 1920
 gacggcatct tcagaaacct gggcaacctg cgggtcctgg acctggagaa tgcagggtg 1980
 cactcgctca ctctggaagt cttcggcaat ctacgccggc tgcaggtgct gcaacttggc 2040
 agaaacgagc tgaagacctt caatgacagc gttgccagcc ggctgtctc cttgcgctac 2100
 ctggacctgc gcaagtgtcc gctcagctgc acctgtgaca acatgtggct gcagggtgg 2160
 ctgaacaaca gccgtgtgca ggttgtctac ccctacaact acacctgtgg ctacagcac 2220
 aatgcctaca tccacagctt tgacacacac gtctgttctc tggacctggg gctctatctc 2280
 tttgtgtgga ctgcaccggc agtgtgtgtg ctgctggtgg tgccggtgg gtaccaccgc 2340
 gcctactgga ggctgaagta ccactggtac cttctgcggt gctgggtcaa ccagcggtg 2400
 cggcgggagg aaaagtgcta cctctatgac agctttgtgt cctacaattc agctgatgaa 2460
 agttgggtgt tgcagaagct ggtgcctgag ctggagcacg tgcccttcg cctctgctt 2520
 caccaccgag acttcagcc gggccgcagc atcattgaca acattgtgga tgctgtctac 2580
 aacagccgga agacggtgtg cgtggtgagc cgcagctacc tgcgcagcga gtggtgctct 2640
 ctagaggtgc agttggccag ctaccggctg ttggatgagc ggcgtgacat cctggtactg 2700
 gtgtgtgtgg aggacgtggg tgatgtgag ctgtctgcct accaccgcat gcggcggtg 2760
 ctgtgcggc gcacctacct gcgtggcct cttgaccccg cagctcagcc gctcttttgg 2820
 gcacggctga agagggcact gaggtgggga gaggaggag agaggaggga agaagaaggt 2880
 ttgggtggag ggacgggaag gccagggaa ggagacaaac agatgtagcg gccgc 2935

<210> 4

<211> 29
 <212> ADN
 <213> ADN tổng hợp

 <400> 4
 gggggggacg tcgacgtcga cgtcggggg 29

 <210> 5
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> ADN tổng hợp

 <400> 5
 gggggggtcg ttgtcgttgt cgttggggg 29

 <210> 6
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> ADN tổng hợp

 <400> 6
 ggggggaacg ttaacgttaa cgttggggg 29

 <210> 7
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> ADN tổng hợp

 <400> 7
 ggggggttcg ttttcgtttt cgttggggg 29

 <210> 8
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> ADN tổng hợp

 <400> 8
 ggggggaacg aaaacgaaaa cgaaggggg 29

 <210> 9
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> ADN tổng hợp

 <400> 9
 ggggggcgcg cgcgcgcgcg cgcgggggg 29

 <210> 10
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> ADN tổng hợp

 <400> 10
 ggggggttcg aattcgaatt cgaaggggg 29

 <210> 11
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> ADN tổng hợp

 <400> 11

ggggggtgcg gttgcggttg cggtagggg 29

 <210> 12
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> ADN tổng hợp

 <400> 12
 ggggggtacg gttacggtta cggtagggg 29

 <210> 13
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> ADN tổng hợp

 <400> 13
 ggggggttcg gtttcggttt cggtagggg 29

 <210> 14
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> ADN tổng hợp

 <400> 14
 ggggggtccg gttccggttc cggtagggg 29

 <210> 15
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> ADN tổng hợp

 <400> 15
 ggggggtgcg attgcgattg cgatggggg 29

 <210> 16
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> ADN tổng hợp

 <400> 16
 ggggggtacg attacgatta cgatggggg 29

 <210> 17
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> ADN tổng hợp

 <400> 17
 ggggggttcg atttcgattt cgatggggg 29

 <210> 18
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> ADN tổng hợp

 <400> 18
 ggggggtccg attccgattc cgatggggg 29

 <210> 19
 <211> 29

<212>	ADN	
<213>	ADN tổng hợp	
<400>	19	
	ggggggtgcg ttgtcgtttg cgttggggg	29
<210>	20	
<211>	29	
<212>	ADN	
<213>	ADN tổng hợp	
<400>	20	
	ggggggtacg ttacgttta cgttggggg	29
<210>	21	
<211>	29	
<212>	ADN	
<213>	ADN tổng hợp	
<400>	21	
	ggggggttcg ttttcgtttt cgttggggg	29
<210>	22	
<211>	29	
<212>	ADN	
<213>	ADN tổng hợp	
<400>	22	
	ggggggtccg tttccgtttc cgttggggg	29
<210>	23	
<211>	29	
<212>	ADN	
<213>	ADN tổng hợp	
<400>	23	
	ggggggtgcg cttgcgcttg cgctggggg	29
<210>	24	
<211>	29	
<212>	ADN	
<213>	ADN tổng hợp	
<400>	24	
	ggggggtacg cttacgttta cgctggggg	29
<210>	25	
<211>	29	
<212>	ADN	
<213>	ADN tổng hợp	
<400>	25	
	ggggggttcg ctttcgcttt cgctggggg	29
<210>	26	
<211>	29	
<212>	ADN	
<213>	ADN tổng hợp	
<400>	26	
	ggggggtccg cttccgcttc cgctggggg	29

<210> 27	
<211> 29	
<212> ADN	
<213> ADN tổng hợp	
<400> 27	
ggggggttcg ttttcgtttt cgttggggg	29
<210> 28	
<211> 29	
<212> ADN	
<213> ADN tổng hợp	
<400> 28	
ggggggttcg tggtcgtgtt cgtgggggg	29
<210> 29	
<211> 29	
<212> ADN	
<213> ADN tổng hợp	
<400> 29	
ggggggttcg tattcgtatt cgtaggggg	29
<210> 30	
<211> 29	
<212> ADN	
<213> ADN tổng hợp	
<400> 30	
ggggggttcg tcttcgtctt cgtcggggg	29
<210> 31	
<211> 29	
<212> ADN	
<213> ADN tổng hợp	
<400> 31	
gggggggtcgtcgtgtgt cgttggggg	29
<210> 32	
<211> 29	
<212> ADN	
<213> ADN tổng hợp	
<400> 32	
ggggggatcg ttatcgttat cgttggggg	29
<210> 33	
<211> 29	
<212> ADN	
<213> ADN tổng hợp	
<400> 33	
gggggggtcgttctcgttct cgttggggg	29
<210> 34	
<211> 29	
<212> ADN	

<213>	ADN tổng hợp	
<400>	34	
ggggggttcg	ttttcgtttt	cgttggggg
		29
<210>	35	
<211>	29	
<212>	ADN	
<213>	ADN tổng hợp	
<400>	35	
ggggggttcg	ttttcgtttt	cgttggggg
		29
<210>	36	
<211>	28	
<212>	ADN	
<213>	ADN tổng hợp	
<400>	36	
gggggttcgt	tttcgttttc	gttggggg
		28
<210>	37	
<211>	27	
<212>	ADN	
<213>	ADN tổng hợp	
<400>	37	
gggggttcgtt	tttcgttttc	gttggggg
		27
<210>	38	
<211>	26	
<212>	ADN	
<213>	ADN tổng hợp	
<400>	38	
gggttcgttt	tcgttttcgt	tggggg
		26
<210>	39	
<211>	25	
<212>	ADN	
<213>	ADN tổng hợp	
<400>	39	
gggttcgtttt	cgtttttcgtt	ggggg
		25
<210>	40	
<211>	24	
<212>	ADN	
<213>	ADN tổng hợp	
<400>	40	
gttcgttttc	gttttcgttg	gggg
		24
<210>	41	
<211>	23	
<212>	ADN	
<213>	ADN tổng hợp	
<400>	41	
tttcgttttc	ttttcgtttg	ggg
		23

<210> 42	
<211> 29	
<212> ADN	
<213> ADN tổng hợp	
<400> 42	
ggggggttcg ttttcgtttt cgttggggg	29
<210> 43	
<211> 28	
<212> ADN	
<213> ADN tổng hợp	
<400> 43	
ggggggttcg ttttcgtttt cgttgggg	28
<210> 44	
<211> 27	
<212> ADN	
<213> ADN tổng hợp	
<400> 44	
ggggggttcg ttttcgtttt cgttggg	27
<210> 45	
<211> 26	
<212> ADN	
<213> ADN tổng hợp	
<400> 45	
ggggggttcg ttttcgtttt cgttgg	26
<210> 46	
<211> 25	
<212> ADN	
<213> ADN tổng hợp	
<400> 46	
ggggggttcg ttttcgtttt cgttg	25
<210> 47	
<211> 24	
<212> ADN	
<213> ADN tổng hợp	
<400> 47	
ggggggttcg ttttcgtttt cggt	24
<210> 48	
<211> 29	
<212> ADN	
<213> ADN tổng hợp	
<400> 48	
ggggggttcg ttttcgtttt cgttggggg	29
<210> 49	
<211> 31	
<212> ADN	
<213> ADN tổng hợp	

<400> 49 gggggggttc gttttcgttt tcgttggggg g	31
<210> 50 <211> 33 <212> ADN <213> ADN tổng hợp	
<400> 50 gggggggttc cgttttcgtt ttcgttgggg ggg	33
<210> 51 <211> 17 <212> ADN <213> ADN tổng hợp	
<400> 51 gggggggttcg ttggggg	17
<210> 52 <211> 23 <212> ADN <213> ADN tổng hợp	
<400> 52 gggggggttcg ttttcgttgg ggg	23
<210> 53 <211> 29 <212> ADN <213> ADN tổng hợp	
<400> 53 gggggggttcg ttttcgtttt cgttggggg	29
<210> 54 <211> 35 <212> ADN <213> ADN tổng hợp	
<400> 54 gggggggttcg ttttcgtttt cgttttcgtt ggggg	35
<210> 55 <211> 41 <212> ADN <213> ADN tổng hợp	
<400> 55 gggggggttcg ttttcgtttt cgttttcgtt ttcgttgggg g	41
<210> 56 <211> 47 <212> ADN <213> ADN tổng hợp	
<400> 56 gggggggttcg ttttcgtttt cgttttcgtt ttcgttttcg ttggggg	47

<210>	57	
<211>	23	
<212>	ADN	
<213>	ADN tổng hợp	
<400>	57	
ggggggttcg	tcgtcgttgg	ggg
		23
<210>	58	
<211>	25	
<212>	ADN	
<213>	ADN tổng hợp	
<400>	58	
ggggggttcg	ttcgttcgtt	ggggg
		25
<210>	59	
<211>	27	
<212>	ADN	
<213>	ADN tổng hợp	
<400>	59	
ggggggttcg	tttcgtttcg	ttggggg
		27
<210>	60	
<211>	29	
<212>	ADN	
<213>	ADN tổng hợp	
<400>	60	
ggggggttcg	ttttcgtttt	cgttggggg
		29
<210>	61	
<211>	31	
<212>	ADN	
<213>	ADN tổng hợp	
<400>	61	
ggggggttcg	tttttcgttt	ttcgttgggg g
		31
<210>	62	
<211>	33	
<212>	ADN	
<213>	ADN tổng hợp	
<400>	62	
ggggggttcg	ttttttcgtt	ttttcgttgg ggg
		33
<210>	63	
<211>	27	
<212>	ADN	
<213>	ADN tổng hợp	
<400>	63	
ggggggtcgt	tttcgttttc	gtggggg
		27
<210>	64	
<211>	29	
<212>	ADN	
<213>	ADN tổng hợp	

<400> 64 gggggggttcg ttttcgtttt cgttggggg	29
<210> 65 <211> 31 <212> ADN <213> ADN tổng hợp	
<400> 65 gggggggtttc gttttcgttt tcgtttgggg g	31
<210> 66 <211> 33 <212> ADN <213> ADN tổng hợp	
<400> 66 gggggggtttt cgttttcgtt ttcgttttgg ggg	33
<210> 67 <211> 27 <212> ADN <213> ADN tổng hợp	
<400> 67 gggggggtcgt tttcgttttc gtggggg	27
<210> 68 <211> 29 <212> ADN <213> ADN tổng hợp	
<400> 68 gggggggttcg ttttcgtttt cgttggggg	29
<210> 69 <211> 31 <212> ADN <213> ADN tổng hợp	
<400> 69 gggggggtttc gttttcgttt tcgtttgggg g	31
<210> 70 <211> 33 <212> ADN <213> ADN tổng hợp	
<400> 70 gggggggtttt cgttttcgtt ttcgttttgg ggg	33
<210> 71 <211> 35 <212> ADN <213> ADN tổng hợp	
<400> 71 gggggggtttt tcgttttcgt tttcgttttt ggggg	35
<210> 72	

<211> 37
 <212> ADN
 <213> ADN tổng hợp

 <400> 72
 ggggggtttt ttcgttttcg ttttcgtttt ttggggg 37

 <210> 73
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> ADN tổng hợp

 <400> 73
 ggggggtttt tttcgttttc gttttcgttt ttttggggg 39

 <210> 74
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> ADN tổng hợp

 <400> 74
 ggggggtttt ttttcgtttt cgttttcgtt tttttgggg g 41

 <210> 75
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> ADN tổng hợp

 <400> 75
 ggggggtttt tttttcgttt tcgttttcgt ttttttttg ggg 43

 <210> 76
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> ADN tổng hợp

 <400> 76
 ggggggtttt ttttttcgtt ttcgttttcg tttttttttt ggggg 45

 <210> 77
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> ADN tổng hợp

 <400> 77
 ggggggttcg tcgtcgttg ggg 23

 <210> 78
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> ADN tổng hợp

 <400> 78
 ggggggttcg ttcgttcgtt ggggg 25

 <210> 79
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> ADN tổng hợp

 <400> 79

gggggggttcg tttcgtttcg ttggggg	27
<210> 80	
<211> 29	
<212> ADN	
<213> ADN tổng hợp	
<400> 80	
gggggggttcg ttttcgtttt cgttggggg	29
<210> 81	
<211> 31	
<212> ADN	
<213> ADN tổng hợp	
<400> 81	
gggggggttcg tttttcgttt ttcgttgggg g	31
<210> 82	
<211> 33	
<212> ADN	
<213> ADN tổng hợp	
<400> 82	
gggggggttcg ttttttcggt ttttcgttgg ggg	33
<210> 83	
<211> 35	
<212> ADN	
<213> ADN tổng hợp	
<400> 83	
gggggggttcg tttttttcgt ttttttcggt ggggg	35
<210> 84	
<211> 37	
<212> ADN	
<213> ADN tổng hợp	
<400> 84	
gggggggttcg ttttttttcg ttttttttcg ttggggg	37
<210> 85	
<211> 39	
<212> ADN	
<213> ADN tổng hợp	
<400> 85	
gggggggttcg tttttttttc gttttttttt cgttggggg	39
<210> 86	
<211> 41	
<212> ADN	
<213> ADN tổng hợp	
<400> 86	
gggggggttcg tttttttttt cgtttttttt ttcgttgggg g	41
<210> 87	
<211> 17	

<212>	ADN	
<213>	ADN tổng hợp	
<400>	87	
gggggggttcg	ttggggg	17
<210>	88	
<211>	23	
<212>	ADN	
<213>	ADN tổng hợp	
<400>	88	
gggggggttcg	ttttcgttgg ggg	23
<210>	89	
<211>	29	
<212>	ADN	
<213>	ADN tổng hợp	
<400>	89	
gggggggttcg	ttttcgtttt cgttggggg	29
<210>	90	
<211>	35	
<212>	ADN	
<213>	ADN tổng hợp	
<400>	90	
gggggggttcg	ttttcgtttt cgttttcgtt ggggg	35
<210>	91	
<211>	41	
<212>	ADN	
<213>	ADN tổng hợp	
<400>	91	
gggggggttcg	ttttcgtttt cgttttcgtt ttcgttgggg g	41
<210>	92	
<211>	47	
<212>	ADN	
<213>	ADN tổng hợp	
<400>	92	
gggggggttcg	ttttcgtttt cgttttcgtt ttcgttttcg ttggggg	47
<210>	93	
<211>	53	
<212>	ADN	
<213>	ADN tổng hợp	
<400>	93	
gggggggttcg	ttttcgtttt cgttttcgtt ttcgttttcg ttttcgttgg ggg	53
<210>	94	
<211>	59	
<212>	ADN	
<213>	ADN tổng hợp	
<400>	94	
gggggggttcg	ttttcgtttt cgttttcgtt ttcgttttcg ttttcgtttt cgttggggg	59

<210> 95
 <211> 65
 <212> ADN
 <213> ADN tổng hợp

<400> 95
 ggggggttcg ttttcgtttt cgttttcgtt ttcgttttcg ttttcgtttt cgttttcgtt 60
 gggggg 65

<210> 96
 <211> 71
 <212> ADN
 <213> ADN tổng hợp

<400> 96
 ggggggttcg ttttcgtttt cgttttcgtt ttcgttttcg ttttcgtttt cgttttcgtt 60
 ttcgttgggg g 71

<210> 97
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> ADN tổng hợp

<400> 97
 ggggggttcg ttttcgtttt cgttggggg 29

<210> 98
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> ADN tổng hợp

<400> 98
 ggggggtttc gtttttttcgt ttttttcgtt ggggg 35

<210> 99
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> ADN tổng hợp

<400> 99
 ggggggtttt cgtttttttt cgtttttttt cgttttgggg g 41

<210> 100
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> ADN tổng hợp

<400> 100
 ggggggtttt tcgttttttt ttttcgtttt tttttcgttt ttggggg 47

<210> 101
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> ADN tổng hợp

<400> 101
 ggggggtttc gtttggggg 19

<210> 102
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> ADN tổng hợp

 <400> 102
 ggggggtttc gttttttcgt ttggggg 27

 <210> 103
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> ADN tổng hợp

 <400> 103
 ggggggtttc gttttttcgt tttttcgttt ggggg 35

 <210> 104
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> ADN tổng hợp

 <400> 104
 ggggggtttc gttttttcgt tttttcgttt tttcgtttgg ggg 43

 <210> 105
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> ADN tổng hợp

 <400> 105
 ggggggtttc gttttttcgt tttttcgttt tttcgttttt tcgtttgggg g 51

 <210> 106
 <211> 59
 <212> ADN
 <213> ADN tổng hợp

 <400> 106
 ggggggtttc gttttttcgt tttttcgttt tttcgttttt tcgttttttc gtttggggg 59

 <210> 107
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> ADN tổng hợp

 <400> 107
 ggggggttcg ttttgctttt gcttggggg 29

 <210> 108
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> ADN tổng hợp

 <400> 108
 ggggggttcg tgttgctgtt gctgggggg 29

 <210> 109
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> ADN tổng hợp

<400> 109 gggggggttcg tattgctatt gctaggggg	29
<210> 110 <211> 29 <212> ADN <213> ADN tổng hợp	
<400> 110 gggggggttcg tcttgctctt gctcggggg	29
<210> 111 <211> 29 <212> ADN <213> ADN tổng hợp	
<400> 111 gggggggtcgtc ttgtcgttgt cgttggggg	29
<210> 112 <211> 29 <212> ADN <213> ADN tổng hợp	
<400> 112 gggggggtcgtc tggtcgtggt cgtgggggg	29
<210> 113 <211> 29 <212> ADN <213> ADN tổng hợp	
<400> 113 gggggggtcgtc tagtcgtagt cgtaggggg	29
<210> 114 <211> 29 <212> ADN <213> ADN tổng hợp	
<400> 114 gggggggtcgtc tcgtcgtcgt cgtcggggg	29
<210> 115 <211> 29 <212> ADN <213> ADN tổng hợp	
<400> 115 gggggggatcgt ttatcgttat cgttggggg	29
<210> 116 <211> 29 <212> ADN <213> ADN tổng hợp	
<400> 116 gggggggtcgtc ttctcgttct cgttggggg	29

<210> 117	
<211> 29	
<212> ADN	
<213> ADN tổng hợp	
<400> 117	
ggggggttcg ttttcgtttt cgttggggg	29
<210> 118	
<211> 17	
<212> ADN	
<213> ADN tổng hợp	
<400> 118	
ggggggttcg taggggg	17
<210> 119	
<211> 23	
<212> ADN	
<213> ADN tổng hợp	
<400> 119	
ggggggttcg tattcgtagg ggg	23
<210> 120	
<211> 29	
<212> ADN	
<213> ADN tổng hợp	
<400> 120	
ggggggttcg tattcgtatt cgtaggggg	29
<210> 121	
<211> 35	
<212> ADN	
<213> ADN tổng hợp	
<400> 121	
ggggggttcg tattcgtatt cgtattcgta ggggg	35
<210> 122	
<211> 41	
<212> ADN	
<213> ADN tổng hợp	
<400> 122	
ggggggttcg tattcgtatt cgtattcgta ttcgtagggg g	41
<210> 123	
<211> 47	
<212> ADN	
<213> ADN tổng hợp	
<400> 123	
ggggggttcg tattcgtatt cgtattcgta ttcgtattcg taggggg	47
<210> 124	
<211> 17	
<212> ADN	
<213> ADN tổng hợp	

<400> 124 gggggggttcg tcggggg	17
<210> 125 <211> 23 <212> ADN <213> ADN tổng hợp	
<400> 125 gggggggttcg tcttcgtcgg ggg	23
<210> 126 <211> 29 <212> ADN <213> ADN tổng hợp	
<400> 126 gggggggttcg tcttcgtcctt cgtcggggg	29
<210> 127 <211> 35 <212> ADN <213> ADN tổng hợp	
<400> 127 gggggggttcg tcttcgtcctt cgtcttcgtc ggggg	35
<210> 128 <211> 41 <212> ADN <213> ADN tổng hợp	
<400> 128 gggggggttcg tcttcgtcctt cgtcttcgtc ttcgtcgggg g	41
<210> 129 <211> 47 <212> ADN <213> ADN tổng hợp	
<400> 129 gggggggttcg tcttcgtcctt cgtcttcgtc ttcgtccttcg tcggggg	47
<210> 130 <211> 29 <212> ADN <213> ADN tổng hợp	
<400> 130 gggggggttcg ttttcgtttt cgttggggg	29
<210> 131 <211> 29 <212> ADN <213> ADN tổng hợp	
<400> 131 ggggggggcg ttggcgttg cgttggggg	29
<210> 132	

<211> 29
 <212> ADN
 <213> ADN tổng hợp

 <400> 132
 ggggggaacg ttaacgttaa cgttggggg 29

 <210> 133
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> ADN tổng hợp

 <400> 133
 ggggggcccg ttcccgttcc cgttggggg 29

 <210> 134
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> ADN tổng hợp

 <400> 134
 ggggggttcg gggtcgggtt cgggggggg 29

 <210> 135
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> ADN tổng hợp

 <400> 135
 ggggggttcg aattcgaatt cgaaggggg 29

 <210> 136
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> ADN tổng hợp

 <400> 136
 ggggggttcg ccttcgcctt cgccggggg

