



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

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



1-0028019

(51)⁷ C07K 16/10; A61P 31/16; G01N 33/577; (13) B
C12N 7/00; G01N 33/53; A61K 39/145

(21) 1-2013-04075

(22) 12/09/2008

(62) 1-2010-00814

(86) PCT/SG2008/000347 12/09/2008

(87) WO2009/035420 19/03/2009

(30) 60/972,059 13/09/2007 US

(45) 25/04/2021 397

(43) 25/08/2010 269A

(73) TEMASEK LIFE SCIENCES LABORATORY LIMITED (SG)

1 Research Link, National University of Singapore, Singapore 117604, Singapore

(72) QIAN Hong Liang (CN); HE Fang (CN); KWANG Hwei-Sing (US).

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

(54) PROTEIN GẮN KẾT ĐẶC HIỆU VỚI EPITOP DẠNG CẤU HÌNH CỦA
GLYCOPROTEIN VỎ VIRUT CÚM H5, PHƯƠNG PHÁP VÀ KIT PHÁT HIỆN
VIRUT CÚM GIA CẦM CÁC KIỂU PHỤ H5 VÀ H5N1

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng và protein gắn kết liên quan gắn kết đặc hiệu với glycoprotein vỏ của các kiểu phụ H5 của virus cúm gia cầm (AIV). Kháng thể đơn dòng và protein gắn kết liên quan này là hữu ích để phát hiện kiểu phụ AIV H5, kể cả kiểu phụ H5N1. Ngoài ra sáng chế cũng đề cập đến các công cụ để chẩn đoán, theo dõi và điều trị bệnh nhiễm virus nguy hiểm này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể và protein gắn kết liên quan để phát hiện và điều trị virus cúm gia cầm (Avian Influenza Virus-AIV). Cụ thể, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng và protein gắn kết liên quan hữu ích để phát hiện và điều trị AIV kiểu phụ H5 và N1 độc lực cao và đề cập đến sản phẩm để chẩn đoán, theo dõi và điều trị nhiễm khuẩn AIV ở động vật và người.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Virus cúm gia cầm H5N1 có thể trở thành nguyên nhân gây ra bệnh dịch cúm kế tiếp. Sự bùng nổ hàng năm của bệnh nhiễm khuẩn cúm A đang trở thành mối đe dọa cho sức khỏe cộng đồng và chủng cúm mới có thể xuất hiện định kỳ với những người có khả năng miễn dịch kém, dẫn đến gây ra bệnh dịch. Dịch bệnh cúm A Tây Ban Nha vào năm 1918, do virus cúm H1N1 gây ra, đã làm chết hơn 40 triệu người trên toàn thế giới. Căn nguyên của H1N1 có thể đã được truyền trực tiếp từ chim sang người, hoặc có thể có liên quan đến sự ủ bệnh ở một vật chủ trung gian như lợn hoặc vật chủ động vật khác chưa được xác định (danh sách các tài liệu tham khảo được liệt kê phần cuối bản mô tả). Cả bệnh dịch năm 1957 lẫn năm 1968 lần lượt do virus cúm H2N2 và H3N2 gây ra dường như bắt nguồn từ sự sắp xếp lại trong đó một hoặc cả protein bề mặt virus phù hợp với người được thay thế bằng các protein từ chủng cúm gia cầm (2).

Virut H5N1 có khả năng lây nhiễm cho nhiều dạng vật chủ không thể ngờ tới, kể cả động vật ăn thịt. Trường hợp người nhiễm AIV H5N1 đầu tiên được xác nhận xảy ra năm 1997. Sự lây nhiễm H5N1 có độc lực cao xảy ra ở cả gia cầm lẫn người. Đây là lần đầu tiên phát hiện được việc truyền trực tiếp virut cúm gia cầm từ chim sang người. Sau đó, theo thống kê của Tổ chức y tế thế giới (WHO-World Health Organization), tổng số trường hợp người bị nhiễm H5N1, kể từ thời điểm bùng nổ ban đầu ở Đông Nam Á xảy ra năm 2003, đã lên đến 281, với 169 người chết. Indonesia đã có báo cáo về trường hợp người bị nhiễm cúm gia cầm đầu tiên do virut H5N1 gây ra vào tháng 6 năm 2005. Đến nay, đây là quốc gia duy nhất có báo cáo về các trường hợp vào năm 2007, với 81 trường hợp người đã được xác nhận, trong số đó 63 trường hợp bị chết, vào tháng 3 năm 2007.

Virut cúm được phân loại theo tính đặc hiệu kháng nguyên nucleoprotein và protein lưới của chúng. Các virut này chủ yếu được phân loại thành ba kiểu huyết thanh A, B và C, trong đó typ A có 8 đoạn ARN ghi mã 10 protein virut. Tất cả các loại virut cúm typ A đã biết đều có nguồn gốc từ chim. Loại virut này có thể lây nhiễm cho các loài khác như ngựa, lợn, cú và hải cẩu và cũng có nguy cơ lây nhiễm cả với người (23). Virut cúm A còn được chia thành các kiểu phụ theo bản chất kháng nguyên của glycoprotein vỏ, ngưng kết hồng cầu (HA), từ H1 đến H16, và neuraminidaza (NA), từ N1 đến N9 (24, 25, 26). Người ta tin rằng việc phân cắt bằng cách phân giải protein của protein HA ở điểm nối HA1-HA2 liên quan đến khả năng gây bệnh ở chủng chim và sự có mặt của axit amin kỵ nước xung quanh vị trí phân cắt này là đặc trưng của kiểu phụ H5. Ngoài ra, cũng tin rằng protein HA là trung gian cho quá trình bắt gán với thụ thể sialosit của tế bào vật chủ và sau đó xâm nhập bằng cách dung hợp

màng (27), và protein HA được cho là đích chính để trung hòa kháng thể (26).

Xét nghiệm trong thời gian bùng nổ bệnh hô hấp cấp tính có thể xác định được liệu bệnh cúm có là nguyên nhân. Trong mùa cúm, việc xét nghiệm bệnh nhân được chọn đang mắc bệnh về hô hấp tương thích với bệnh cúm có thể giúp xác định được liệu bệnh cúm có trong nhóm người bệnh này hay không và giúp cho nhân viên y tế xác định cách đánh giá lâm sàng để chẩn đoán và điều trị bệnh về hô hấp. Xét nghiệm cúm nhanh giúp xác định việc có phải dùng thuốc kháng virus hay không. Một số xét nghiệm như nuôi cấy virus, phản ứng chuỗi polymeaza phiên mã ngược (transcriptase polymerase chain reaction- RT-PCR) và xét nghiệm huyết thanh học là các phương pháp thông thường, nhưng vẫn chưa có được kết quả một cách nhanh chóng để trợ giúp kịp thời cho bác sỹ lâm sàng (3). Hầu hết các xét nghiệm chẩn đoán nhanh hiện đang sử dụng là các thử nghiệm miễn dịch dựa vào kháng thể đơn dòng (3, 4, 5). Phương pháp huỳnh quang miễn dịch (nhuộm kháng thể huỳnh quang) cũng là một lựa chọn khác để xét nghiệm chẩn đoán bệnh cúm nhanh ở một số phòng thí nghiệm của bệnh viện và thường có thể thu được kết quả xét nghiệm trong khoảng thời gian từ 2 đến 4 giờ. Tất cả các thể hệ kháng thể đơn dòng đặc hiệu nêu trên là cơ sở cho các phương pháp chẩn đoán nhanh, nhạy và hiệu quả về giá thành được sử dụng gần đây nhất.

Việc phát hiện các phân dòng khác nhau ở nhiều vùng đã cho thấy rằng virus H5N1 có phân bố rộng về mặt địa lý với tính đa dạng về di truyền và kháng nguyên cao. Phân tích phả hệ cho thấy tất cả các virus từ Indonesia tạo thành các phân dòng virus Z genotyp H5N1 riêng biệt dẫn tới giả thiết là sự bùng nổ này dường như bắt nguồn từ một vùng duy nhất rồi lan truyền ra khắp cả nước (14, 15). Do vậy, sẽ rất hữu ích nếu có được

kháng thể đơn dòng có thể nhận diện đặc hiệu thể phân lập bệnh cúm Indonesia. Cũng sẽ hữu ích nếu có được các MAb bao gồm cả thể phân lập bệnh cúm Việt Nam và Singapore.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất kháng thể đơn dòng (mAb-monoclonal antibody) và protein gắn kết liên quan gắn kết đặc hiệu với kiểu phụ AIV H5 và N1, cụ thể là với thể phân lập AIV H5 và N1 Indônêxia. Tính đặc hiệu của các đáp ứng kháng thể đơn dòng này là cơ sở để tạo ra các chất chẩn đoán hiệu quả. MAb và protein gắn kết có nguồn gốc từ chúng cũng có thể được dùng làm tác nhân điều trị.

Sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng và protein gắn kết liên quan đặc hiệu với epitop dạng thẳng và epitop dạng cấu hình của ngưng kết hồng cầu glycoprotein kiểu phụ H5 hoặc epitop dạng thẳng và dạng cấu hình của neuraminidaza glycoprotein kiểu phụ N1. MAb với epitop H5 dạng thẳng có khả năng phát hiện chủng virus kiểu phụ H5N1 và H5 khác trong mẫu biến tính như mẫu mô được cố định formalin, với tính đặc hiệu và độ nhạy cao, trong khi các MAb hướng đích H5 hoặc N1 epitop dạng cấu hình có thể dùng để phát hiện kiểu phụ virus H5N1 và N1 khác trong mô chưa được xử lý sơ bộ như mẫu mô đông lạnh và các mô sinh học và dịch thể khác. MAb với epitop H5 và MAb với epitop N1 có thể được sử dụng kết hợp với chẩn đoán đặc hiệu thể phân lập virus H5N1.

Cụ thể, mAb có ký hiệu 5A5 hướng đích epitop dạng thẳng của ngưng kết hồng cầu kiểu phụ H5. Các mAb khác, có ký hiệu 5C5, 2D9, 4F8, 1C1, 3B6, 2F11, 9C1 và 3H11, hướng đích epitop dạng cấu hình của ngưng kết hồng cầu kiểu phụ H5. mAb có ký hiệu 8H12 hướng đích epitop dạng thẳng của kiểu phụ N1 neuraminidaza, và hai kháng thể khác, có ký hiệu

6C6 và 3D4, hướng đích epitop dạng cấu hình của kiểu phụ N1 neuraminidaza.

Do đó, sáng chế đề xuất protein gắn kết về cơ bản có đặc tính gắn kết miễn dịch đối với epitop ngưng kết hồng cầu kiểu phụ H5 dạng thẳng như protein gắn kết của mAb 5A5 và protein gắn kết về cơ bản có đặc tính gắn kết miễn dịch đối với epitop neuraminidaza kiểu phụ N1 dạng thẳng như protein gắn kết của mAb 8H12. Sáng chế cũng đề xuất protein gắn kết về cơ bản có đặc tính gắn kết miễn dịch đối với epitop ngưng kết hồng cầu kiểu phụ H5 dạng cấu hình như protein gắn kết của mAb 5C5, 2D9, 4F8, 1C1, 3B6, 2F11, 9C1 và 3H11. Sáng chế cũng đề xuất protein gắn kết về cơ bản có đặc tính gắn kết miễn dịch đối với epitop neuraminidaza kiểu phụ N1 dạng cấu hình như protein gắn kết của mAb 6C6 hoặc 3D4.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp phát hiện AIV kiểu phụ H5 trong mẫu bao gồm việc phát hiện gắn kết của AIV với mAb hoặc protein gắn kết về cơ bản có đặc tính gắn kết miễn dịch của mAb 5A5, 5C5, 2D9, 4F8, 1C1, 3B6, 2F11, 9C1 hoặc 3H11. Sáng chế cũng đề xuất phương pháp phát hiện AIV kiểu phụ N1 trong mẫu bao gồm việc phát hiện gắn kết của AIV với mAb hoặc protein gắn kết về cơ bản có đặc tính gắn kết miễn dịch của mAb 6C6, 3D4 hoặc 8H12. Đặc biệt, sáng chế đề cập đến thử nghiệm huỳnh quang miễn dịch, thử nghiệm hóa mô miễn dịch và phương pháp ELISA bằng cách sử dụng các protein gắn kết này. Kháng thể nhận diện AIV kiểu phụ H5 có thể được sử dụng kết hợp với kháng thể nhận diện AIV kiểu phụ N1 để phát hiện virus H5N1.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kit phát hiện AIV bao gồm protein gắn kết về cơ bản có đặc tính gắn kết miễn dịch của mAb 5A5, 5C5, 2D9, 4F8, 1C1, 3B6, 2F11, 9C1, 3H11, 8H12, 3D4 và/hoặc 6C6.

Sáng chế cũng mô tả việc điều trị cho đối tượng bị nhiễm chủng AIV H5, như chủng AIV H5N1 bằng cách dùng một hoặc nhiều kháng thể đơn dòng hoặc protein gắn kết về cơ bản có đặc tính gắn kết miễn dịch của mAb 5C5, 2D9, 4F8, 2F11, 9C1, 3H11, 3D4 hoặc 6C6.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1A-1D là các ảnh thu được bằng phương pháp IFA (thử nghiệm huỳnh quang miễn dịch) so với tế bào MDCK (tế bào thận chó Madin-Darby) bị nhiễm AIV H5N1 với các tế bào MDCK không bị nhiễm virus. Fig.1A là ảnh H5N1 được phát hiện trong các tế bào MDCK. Fig.1B là ảnh hợp nhất ánh sáng tia cực tím và ánh sáng chuẩn cho thấy các tế bào riêng rẽ bị nhiễm virus so với các tế bào không bị nhiễm. Việc không có tín hiệu huỳnh quang trên các tế bào MDCK trên Fig.1C cho thấy chúng không bị nhiễm virus. Fig.1D thể hiện sự hợp nhất ánh sáng tia cực tím và ánh sáng chuẩn trên cùng các tế bào như trong Fig.1C.

Fig. 2A và 2B thể hiện hoạt tính kháng thể đơn dòng trung hòa của virus cúm trên các tế bào MDCK. Trong Fig. 2A, các tế bào MDCK được nhuộm bằng phương pháp huỳnh quang FITC (fluorescein isothiocyanate-floresxein isothioxyanat) sau khi kháng thể đơn dòng trung hoà nhiễm virus H5N1. Trong Fig. 2B, các tế bào MDCK được nhuộm bằng phương pháp huỳnh quang FITC trong đó nhiễm virus H5N1 không được kháng thể đơn dòng trung hòa.

Fig. 3A và 3B thể hiện phương pháp điện di protein SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide) và thẩm tách Western để nhận diện gắn kết giữa MAb và HA1 tái tổ hợp dạng thẳng. Trong Fig. 3A, HA1 bằng khoảng 37 kD và HA1 hướng đích GST bằng khoảng 61 kD ở gel SDS-PAGE. Riêng GST bằng 26 kD. Trong Fig. 3B, thẩm tách Western cho thấy rằng HA1 tái tổ hợp phản ứng với mAB 5A5. Ngoại trừ vạch đậm

ở 61 kD, tồn tại các vạch nhỏ hơn cho biết quá trình thoái hóa khi GST-HA1 được biểu hiện trong *E. coli*. Đường 1, mẫu *E. coli* không có biểu hiện gây cảm ứng IPTG; các đường 2 & 3, GST-HA1 gây cảm ứng IPTG được biểu hiện trong *E. coli*; đường 4, mẫu GST tinh khiết.

Fig. 4A và 4B minh họa bản đồ epitop dạng thẳng của mAb 5A5.

Fig. 4A là biểu đồ protein ngưng kết hồng cầu HA1, thể hiện cấu trúc dòng vô tính cho sự biểu hiện của các mảnh HA1 có chiều dài khác nhau và tính phản ứng của chúng với mAb5A5. Fig. 4B là biểu đồ các mảnh ngưng kết hồng cầu HA1 đột biến, thể hiện cấu trúc dòng vô tính cho sự biểu hiện của các đột biến khác nhau trên mảnh HA1 và tính phản ứng của chúng với mAb 5A5.

Fig. 5A và 5B thể hiện phản ứng điển hình giữa mAb 6C6 hoặc 3D4 và N1 tái tổ hợp được biểu hiện. Fig. 5A thể hiện N1 tái tổ hợp biểu hiện được phát hiện ở các tế bào Sf9. Fig. 5B thể hiện sự hợp nhất ánh sáng tia cực tím và ánh sáng chuẩn cho biết các tế bào riêng rẽ.

Fig. 6A và 6B thể hiện phương pháp SDS-PAGE và thẩm tách Western để kiểm tra NA được biểu hiện.

Fig. 7A, 7B và 7C thể hiện hoạt tính kháng thể đơn dòng trung hòa của virus cúm trên các tế bào MDCK. Fig. 7A thể hiện hình ảnh của các tế bào MDCK quan sát được bằng kính hiển vi sau khi nhiễm virus H5N1 được trung hòa bằng kháng thể đơn dòng. Fig. 7B thể hiện hình ảnh các tế bào MDCK được quan sát bằng kính hiển vi mà nhiễm virus H5N1 không được trung hòa bằng kháng thể đơn dòng làm mẫu kiểm chứng dương tính CPE. Fig. 7C thể hiện các tế bào MDCK khi không có mặt cả virus lẫn mAb làm mẫu kiểm chứng âm tính CPE.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất MAb và protein gắn kết kháng nguyên liên quan gắn kết đặc hiệu với ngưng kết hồng cầu glycoprotein AIV kiểu phụ H5 hoặc neuraminidaza glycoprotein AIV kiểu phụ N1. Cụ thể, mAb hoặc protein gắn kết kháng nguyên liên quan có đặc tính gắn kết miễn dịch của mAb 5A5 được tạo ra bởi tế bào lai 5A5, được nộp lưu tại Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Mỹ (American Type Culture Collection) (ATCC) ngày 10/07/2007 với số truy cập là PTA-8528, mAb 5C5 được tạo ra bởi tế bào lai 5C5, được nộp lưu tại ATCC ngày 10/07/2007 với số truy cập là PTA-8529, mAb 6C6 được tạo ra bởi tế bào lai 6C6, được nộp lưu tại ATCC ngày 10/07/2007, với số truy cập là PTA-8526, mAb 2D9 được tạo ra bởi tế bào lai 2D9, được nộp lưu tại ATCC ngày 29/07/2008, với số truy cập là PTA-9396, mAb 4F8 được tạo ra bởi tế bào lai 4F8, được nộp lưu tại ATCC ngày 29/07/2008 với số truy cập là PTA-9397, mAb 1C1 được tạo ra bởi tế bào lai 1C1, được nộp lưu tại ATCC ngày 29/07/2008, với số truy cập là PTA-9398, mAb 3B6 được tạo ra bởi tế bào lai 3B6, được nộp lưu tại ATCC ngày 29/07/2008 với số truy cập là PTA-9399, mAb 3D4 được tạo ra bởi tế bào lai 3D4, được nộp lưu tại ATCC ngày 29/07/2008 với số truy cập là PTA-9395, mAb 8H12 được tạo ra bởi tế bào lai 8H12, được nộp lưu tại ATCC ngày 29/07/2008, với số truy cập là PTA-9394, mAb 2F11 được tạo ra bởi tế bào lai 2F11, được nộp lưu tại ATCC ngày 16/07/2008, với số truy cập là PTA-9373, mAb 9C1 được tạo ra bởi tế bào lai 9C1, được nộp lưu tại ATCC ngày 16/07/2008, với số truy cập là PTA-9372, hoặc mAb 3H11 được tạo ra bởi tế bào lai 3H11, được nộp lưu tại ATCC ngày 16/07/2008, với số truy cập là PTA-9374. Tất cả việc nộp lưu được tiến hành tuân theo các điều khoản của Hiệp ước Budapest. Sáng chế

cũng liên quan các tế bào lai này và đề xuất nguồn MAb liên tục và protein gắn kết theo sáng chế.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp phát hiện và chẩn đoán nhiễm khuẩn AIV kiểu phụ H5 và đề xuất kit xét nghiệm bao gồm MAb hoặc protein gắn kết theo sáng chế. Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị cho đối tượng bị nhiễm chủng AIV H5 hoặc N1 bằng cách dùng lượng hữu hiệu của một hoặc nhiều kháng thể hoặc protein gắn kết liên quan theo sáng chế. Cụ thể, theo phương án này đối tượng bị nhiễm AIV thể phân lập Indonesia của kiểu phụ H5N1. Kháng thể theo sáng chế cũng có thể được dùng cho đối tượng như một biện pháp phòng ngừa khi xuất hiện bệnh dịch cúm. Trong trường hợp này, lượng hữu hiệu của kháng thể được dùng bằng khoảng một nửa lượng được sử dụng để điều trị các ca nhiễm khuẩn AIV H5 hoặc N1.

Các thuật ngữ khác nhau được sử dụng theo sáng chế được định nghĩa như sau:

Thuật ngữ "đặc tính gắn kết miễn dịch" của mAb hoặc protein gắn kết liên quan, ở tất cả các dạng ngữ pháp của nó, chỉ tính đặc hiệu, ái lực và phản ứng chéo của mAb hoặc protein gắn kết đối với kháng nguyên của nó.

Thuật ngữ "epitop dạng thẳng" chỉ trình tự liên tiếp có khoảng từ 4 đến 12 axit amin tạo thành vị trí gắn kết kháng thể. Epitop dạng thẳng của MAb theo sáng chế tốt hơn là nằm ở vùng từ axit amin 260 đến axit amin 269 của protein ngưng kết hồng cầu được ghi mã bởi gen virus HA1. Epitop dạng thẳng, ở dạng gắn kết với mAb hoặc protein gắn kết, có thể là protein biến tính về cơ bản không có cấu trúc ba chiều.

Thuật ngữ "epitop dạng cấu hình" chỉ mAb hoặc protein gắn kết liên quan gắn kết vị trí tồn tại trên ngưng kết hồng cầu glycoprotein kiểu phụ

H5 hoặc neuraminidaza glycoprotein kiểu phụ N1 ở dạng ba chiều tự nhiên của nó.

Thuật ngữ “protein gắn kết” chỉ protein, kể cả các protein được mô tả dưới đây, bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên của mAb theo sáng chế hoặc mAb có đặc tính gắn kết miễn dịch của mAb theo sáng chế.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể đơn dòng có đặc tính gắn kết của mAb 5A5 bằng cách gây miễn dịch động vật bằng AIV kiểu phụ H5N2 (A/chicken/Singapore/98), sản xuất kháng thể đơn dòng có đặc tính gắn kết của mAb 5C5 bằng cách gây miễn dịch động vật bằng AIV kiểu phụ H5N2 (A/chicken/Singapore/98) hoặc sản xuất kháng thể đơn dòng có đặc tính gắn kết của mAb 6C6 bằng cách gây miễn dịch động vật bằng AIV kiểu phụ H7N1 (A/chicken/Singapore/94). Sáng chế cũng còn đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể đơn dòng có đặc tính gắn kết của mAb 2D9 và của mAb 3B6 bằng cách gây miễn dịch động vật bằng AIV kiểu phụ H5N2 (A/chicken/ Singapore/98). Sáng chế cũng đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể đơn dòng có đặc tính gắn kết của mAb 2F11 hoặc 9C1 bằng cách gây miễn dịch động vật bằng thể đột biến lần tránh khỏi virut cúm gia cầm ban đầu A/Vietnam/1203/2004/H5N1 với đột biến ở axit amin 205 từ lysin thành metionin, hoặc sản xuất kháng thể đơn dòng có đặc tính gắn kết của mAb 3H11 bằng cách gây miễn dịch động vật bằng AIV kiểu phụ A/Indonesia/CDC669/2206/H5N1. Sáng chế cũng đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể đơn dòng có đặc tính gắn kết của mAb 3D4 và của mAb 8H12 bằng cách gây miễn dịch động vật bằng AIV kiểu phụ H7N1 (A/chicken/Singapore/94), và phương pháp sản xuất MAb 4F8 và 1C1 bằng cách gây miễn dịch động vật bằng AIV kiểu phụ H5N2 (A/chicken/ Singapore/98. Kháng nguyên bất kỳ như vậy có thể được sử dụng làm chất sinh miễn dịch để sản xuất kháng thể có đặc tính

gắn kết miễn dịch mong muốn. Kháng thể này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, kháng thể đơn dòng, kháng thể khảm, kháng thể chuỗi đơn, các mảnh Fab và các protein chứa trình tự gắn kết kháng nguyên của mAb 5A5, 5C5, 2D9, 4F8, 1C1, 3B6, 2F11, 9C1, 3H11, 8H12, 6C6 hoặc 3D4.

MAb theo sáng chế có thể được sản xuất bằng kỹ thuật bất kỳ để sản xuất phân tử kháng thể bằng các dòng tế bào liên tục trong môi trường nuôi cấy. Các phương pháp này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, kỹ thuật lai được Kohler và Milstein (*Nature* 256:495-497) phát triển đầu tiên vào năm 1975, cũng như kỹ thuật trioma, kỹ thuật lai tế bào B của người (Kozbor et al., 1983, *Immunology Today* 4:72) và kỹ thuật EBV-tế bào lai để sản xuất kháng thể đơn dòng của người (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy* Alan R. Liss, Inc., pp 77-96 (1985)). Kháng thể người có thể được sử dụng và có thể thu được bằng cách sử dụng tế bào lai của người (Cote et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80:2026-2030) hoặc bằng cách chuyển nhiễm các tế bào B của người với virus EBV *in vitro* (Cole et al., 1985, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, pp. 77-96). Ngoài ra, kỹ thuật được phát triển để tạo ra "kháng thể khảm" hoặc "kháng thể được làm tương thích với người" (Morrison et al., 1984, *J. Bacteriol.* 159:870; Neuberger et al., 1984, *Nature* 312:604-608; Takeda et al., 1985, *Nature* 314:452-454) bằng cách đưa vào các trình tự từ phân tử kháng thể theo sáng chế, ví dụ, mAb 5C5, 5A5, 6C6, 2D9, 4F8, 1C1, 3B6, 3D4, 8H12, 2F11, 9C1 hoặc 3H11, cùng với gen từ phân tử kháng thể của người có hoạt tính sinh học thích hợp có thể được sử dụng. Kháng thể khảm là kháng thể chứa phần Fc của người và phần Fv của chuột (hoặc không phải là người khác). Kháng thể được làm tương thích với người là kháng thể, trong đó vùng xác định tính bổ trợ (complementarity determining regions - CDR) của chuột (hoặc

dạng khác không phải là của người) được đưa vào trong kháng thể của người. Cả kháng thể khảm lẫn kháng thể được làm tương thích với người đều là đơn dòng. Kháng thể khảm của người hoặc được làm tương thích với người này được ưu tiên để áp dụng trong chẩn đoán hoặc điều trị *in vivo* cho các bệnh hoặc rối loạn của người.

Theo sáng chế, các kỹ thuật đã biết để sản xuất kháng thể chuỗi đơn (US 4,946,778) có thể được làm phù hợp để sản xuất kháng thể chuỗi đơn theo sáng chế. Theo một phương án khác của sáng chế, có thể sử dụng các kỹ thuật đã biết để thành lập thư viện biểu hiện Fab (Huse et al., 1989, Science 246: 1275-1281) cho phép nhận diện nhanh chóng và dễ dàng các mảnh Fab đơn dòng có tính đặc hiệu mong muốn của kháng thể theo sáng chế, hoặc dẫn xuất của chúng, hoặc các dạng tương tự.

Mảnh kháng thể chứa idiotyp của phân tử kháng thể có thể được tạo ra bằng các kỹ thuật đã biết. Ví dụ, các mảnh này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: mảnh $F(ab=)2$ có thể thu được bằng cách phân cắt pepsin của phân tử kháng thể; Fab= các mảnh có thể được tạo ra bằng cách khử cầu nối disulfua của mảnh $F(ab=)2$, và các mảnh Fab có thể được tạo ra bằng cách xử lý phân tử kháng thể bằng papain và chất khử. Mảnh kháng thể này có thể thu được từ kháng thể bất kỳ trong số kháng thể đơn dòng hoặc kháng thể đa dòng theo sáng chế.

Trong quá trình sản xuất kháng thể, việc sàng lọc kháng thể mong muốn có thể được thực hiện bằng kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ, thử nghiệm phóng xạ miễn dịch, ELISA (thử nghiệm hấp thụ miễn dịch gắn kết enzym), thử nghiệm miễn dịch “bánh kẹp” (sandwich), thử nghiệm bức xạ miễn dịch, phản ứng kết tủa khuếch tán gel, thử nghiệm khuếch tán miễn dịch, thử nghiệm miễn dịch tại chỗ (bằng cách sử dụng vàng keo, enzym hoặc đánh dấu đồng vị phóng xạ chẳng hạn), thâm tách Western,

phản ứng kết tủa, thử nghiệm ngưng kết (ví dụ, thử nghiệm ngưng kết gel, thử nghiệm ngưng kết hồng cầu), thử nghiệm huỳnh quang miễn dịch và thử nghiệm điện di miễn dịch, v. v... Theo một phương án thực hiện, gắn kết kháng thể được phát hiện bằng cách phát hiện nhãn trên kháng thể nguyên phát. Theo phương án thực hiện khác, kháng thể nguyên phát được phát hiện bằng cách phát hiện gắn kết kháng thể thứ phát hoặc chất phản ứng khác với kháng thể nguyên phát. Theo phương án thực hiện khác, kháng thể thứ phát được đánh dấu. Các phương tiện để phát hiện gắn kết trong thử nghiệm miễn dịch là đã biết trong lĩnh vực này và nằm trong phạm vi của sáng chế.

Kháng thể nêu trên có thể được sử dụng trong các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này để phát hiện hoặc xác định AIV kiểu phụ H5 hoặc N1, ví dụ, phương pháp thâm tách Western, ELISA, thử nghiệm phóng xạ miễn dịch, thử nghiệm huỳnh quang miễn dịch, thử nghiệm hóa mô miễn dịch, và các phương pháp tương tự. Kỹ thuật được mô tả trong bản mô tả này có thể được áp dụng để xác định định tính và định lượng với kiểu phụ H5 của AIV và để chẩn đoán và theo dõi các động vật hoặc người bị nhiễm virus.

Sáng chế cũng đề xuất thử nghiệm và kit thử nghiệm để xác định định tính và/hoặc định lượng kiểu phụ H5 của AIV. Hệ thống thử nghiệm và kit thử nghiệm có thể bao gồm thành phần được đánh dấu, ví dụ, được tạo ra bằng cách đánh dấu bằng nguyên tử phóng xạ, nhóm huỳnh quang hoặc enzym, ghép nối phân tử đánh dấu với mAb hoặc protein gắn kết liên quan theo sáng chế, hoặc với phần gắn kết của nó. Thử nghiệm hoặc kit thử nghiệm còn có thể bao gồm các chất phản ứng, các chất pha loãng và hướng dẫn sử dụng, là đã biết với chuyên gia trong kỹ thuật thử nghiệm miễn dịch.

Theo một số phương án thực hiện theo sáng chế, kit này còn chứa ít nhất mAb hoặc protein gắn kết liên quan theo sáng chế, phương tiện để phát hiện gắn kết đặc hiệu miễn dịch của mAb hoặc protein gắn kết liên quan nêu trên với AIV trong mẫu sinh học, và hướng dẫn sử dụng, tùy thuộc vào phương pháp được chọn, ví dụ, "cạnh tranh", "bánh kẹp", "DASP" và các phương pháp tương tự. Kit có thể còn chứa mẫu kiểm chứng dương tính và âm tính. Chúng có thể được thiết kế để có thể sử dụng bằng máy phân tích tự động hoặc thiết bị nhuộm bản mỏng hóa mô miễn dịch tự động.

Kit thử nghiệm theo sáng chế có thể còn bao gồm kháng thể nguyên phát hoặc protein gắn kết có thể được đánh dấu hoặc có thể được tạo ra để gắn với nền rắn (hoặc được gắn vào nền rắn). Kháng thể hoặc protein gắn kết này có thể là, ví dụ, kháng thể hoặc protein gắn kết với AIV. Kháng thể nguyên phát hoặc protein gắn kết này có thể là kháng thể đơn dòng hoặc kháng thể đa dòng.

Kháng thể đơn dòng với ngưng kết hồng cầu kiểu phụ H5 hoặc kiểu phụ N1 neuraminidaza protein có thể được sản xuất bằng cách gây miễn dịch các động vật bằng AIV hoặc protein H5 hoặc N1 hoặc các mảnh của chúng. Phương pháp được ưu tiên cho kháng thể với ngưng kết hồng cầu protein kiểu phụ H5 bao gồm việc khuếch đại gen HA1 kiểu phụ H5, sau đó cho biểu hiện gen, thu hồi và tinh chế protein tái tổ hợp kiểu phụ H5 và sử dụng các protein đã tinh chế làm các chất sinh miễn dịch. Ví dụ, AIV H5N1 được tạo ra bằng cách cấy phôi gà với chủng virus có độc lực, tiếp đến là phân lập ARN virus. Gen HA1 được khuếch đại bằng phản ứng chuỗi polymeaza phiên mã ngược (RT-PCR) và sau đó có thể được tách dòng vô tính vào vật truyền virus hình que được sử dụng để biểu hiện protein H5 ở các tế bào côn trùng. Các protein được tạo ra như vậy sau đó

có thể được sử dụng để gây miễn dịch chuột hoặc các loài thích hợp khác để sản xuất tế bào lai. Các phương pháp tương tự có thể được sử dụng để thu được các protein N1 để dùng trong sản xuất tế bào lai.

Tế bào lai được sàng lọc theo khả năng tạo ra MAb ái lực cao của chúng có khả năng gắn kết đặc hiệu với các protein H5 hoặc N1 và phân biệt chúng với các kiểu phụ AIV khác. Theo sáng chế, đã phát hiện ra rằng kháng thể có khả năng trung hòa virus có khả năng nhận diện epitop dạng cấu hình trong ngưng kết hồng cầu protein kiểu phụ H5. Phát hiện này dựa trên việc sản sinh ra thể đột biến lần tránh virus khi có mặt mAb trung hòa sau từ 1 đến 2 vòng chọn lọc các tế bào thận chó Madin-Darby (MDCK) hoặc phôi gà. Gen HA1 được tách dòng vô tính từ các thể đột biến lần tránh sự trung hòa này bằng RT-PCR và được giải trình tự để xác định các đột biến điểm. Trong nhóm kháng thể này, epitop trung hòa được phát hiện trong MAb 5C5, 2F11, 9C1 và 3H11. Khả năng lần tránh sự trung hòa được xác nhận bằng thử nghiệm ức chế ngưng kết hồng cầu.

HA1 chứa 338 axit amin, bao gồm peptit tín hiệu chứa 16 axit amin. Để nghiên cứu sự phân bố của epitop dạng thẳng trên protein, tốt hơn là các mảnh được làm cùn và được gây đột biến được thử nghiệm về gắn kết với MAb, ví dụ, bằng kỹ thuật thẩm tách Western hoặc các kỹ thuật tương tự. Epitop dạng thẳng có thể được nhận diện là đích gắn kết cho MAb là một phương thức tốt để phát hiện protein kiểu phụ H5 biến tính, như xảy ra trong mô được cố định formalin bằng cách sử dụng phương pháp nhuộm hóa mô miễn dịch. Việc lập bản đồ MAb kiểu phụ H5 theo cách này tạo nền tảng cho việc nghiên cứu tiếp và chẩn đoán lâm sàng hiệu quả hơn với các trường hợp nhiễm AIV H5N1.

Sáng chế cũng cho phép hiểu rõ hơn về cấu trúc kháng nguyên của phân tử ngưng kết hồng cầu H5 và neuraminidaza N1 của AIV. MAb và

protein gắn kết liên quan theo sáng chế là phương tiện để phát hiện virus có độc lực cao trong các mẫu đông lạnh và mẫu sinh học.

Khả năng phát hiện virus trong mẫu trong parafin là vô cùng quan trọng. Trong hầu hết trường hợp, kháng nguyên HIV trong mẫu mô bị nhiễm đều bị phá hủy trong quá trình cố định. Formalin và etanol có khả năng làm mất lớp vỏ lipid và glycoprotein vỏ, kể cả ngưng kết hồng cầu, do đó làm tăng thêm khó khăn trong việc phát hiện kháng nguyên virus. Vì vậy, cách chẩn đoán này có thể là cách chẩn đoán an toàn hơn và chính xác hơn đối với mô động vật và người bị nhiễm HIV.

Như được minh họa trong các ví dụ sau, mAb 5A5 có hiệu quả cao và nhạy với kháng nguyên virus trong mô được cố định formalin. Kháng thể này cho phép vùng bị lây nhiễm được quan sát một cách dễ dàng dưới kính hiển vi quang học. Kháng thể 5A5 không có hoạt tính ức chế ngưng kết hồng cầu hoặc trung hòa virus; tuy nhiên, nó cho kết quả dương tính trong thử nghiệm huỳnh quang miễn dịch và trong phân tích thẩm tách Western, quan sát thấy vạch đậm tương ứng với HA protein H5N1 tái tổ hợp (MW 36kDa).

MAb 8H12 cũng có hiệu quả cao và nhạy với kháng nguyên virus trong mô được cố định formalin. Kháng thể này cũng cho phép vùng bị lây nhiễm được quan sát một cách dễ dàng dưới kính hiển vi quang học.

Trái lại, MAb 5C5, 2D9, 4F8, 1C1, 3B6, 6C6, 3D4, 2F11, 9C1 và 3H11 lại có hiệu quả cao với mẫu mô đông lạnh nhưng lại không phát hiện được kháng nguyên trong mô được cố định formalin. Các kết quả này cho thấy rằng hai nhóm MAb phản ứng với các epitop virus khác nhau. Thông qua việc lập bản đồ epitop, xác định được MAb 5A5 và 8H12 hướng đích epitop dạng thẳng. Chúng chỉ có thể phát hiện được kháng nguyên virus khi mô đó đã được xử lý ở nhiệt độ cao. Trong phương pháp hồi phục

kháng nguyên thô này, protein bề mặt của virus bị phá hủy và để nucleoprotein của virus bị phơi nhiễm. Vì vậy, MAb hướng đích epitop dạng thẳng cũng không hoạt động như trên mẫu mô đông lạnh.

Xác định được kháng thể đơn dòng 5C5, 2D9, 4F8, 1C1, 3B6, 6C6, 3D4, 2F11, 9C1 và 3H11 hướng đích epitop dạng cấu trúc của virus H5N1. Việc lập bản đồ epitop được sử dụng để xác định đối với mAb 5C5, 2D9, 4F8, 2F11, 9C1 và 3H11; việc xác định mAb 6C6 và 3D4 được tiến hành dựa trên cơ sở việc kháng thể không thể nhận diện neuraminidaza biến tính từ SDS-PAGE. Kháng thể này có thể gắn kết và nhận diện kháng nguyên virus mà không cần xử lý sơ bộ các mẫu mô.

Sáng chế liên quan đến phương pháp thuận tiện, đặc hiệu và nhạy cao để phát hiện kiểu phụ AIV H5 và N1. Một phương pháp như vậy đó là ELISA. Theo một phương án thực hiện được ưu tiên, mAb 5A5, 5C5, 2D9, 4F8, 1C1, 3B6, 2F11, 9C1 và 3H11, riêng rẽ hoặc kết hợp, được sử dụng làm kháng thể bắt giữ. Đã phát hiện ra rằng sự kết hợp này của MAb 5A5 và 5C5 tạo ra chỉ số mật độ quang cao trong việc phát hiện AIV kiểu phụ H5 so với kháng thể riêng rẽ hoặc dạng kết hợp khác được mô tả trong bản mô tả này. Không bị giới hạn bởi lý thuyết bất kỳ, sự giải thích hợp lý về các kết quả này là hai kháng thể phản ứng với epitop khác nhau trên protein HA1 và chúng thuộc các phân lớp kháng thể khác nhau, vì vậy tạo ra nhiều vị trí gắn kết.

Nếu kháng thể được sử dụng một mình, kháng thể được chọn có thể được sử dụng, ví dụ, làm kháng thể bắt giữ và kháng thể này được ghép với peroxidaza cây cải ngựa (HRP-horseradish peroxidase) có thể được sử dụng làm kháng thể phát hiện. Kháng thể 6C6, 3D4 và 8H12 có thể được sử dụng tương tự, làm kháng thể bắt giữ để phát hiện chủng AIV kiểu phụ N1.

Kháng thể đơn dòng tương ứng với epitop dạng cấu hình vẫn duy trì chức năng sinh học quan trọng, như hoạt tính trung hòa và ức chế ngưng kết hồng cầu, trong khi đó MAb tương ứng với epitop dạng thẳng cũng có lợi cho mục đích chẩn đoán. Vì vậy, việc ứng dụng mAb 5A5 và của MAb 5C5, 2D9, 4F8, 1C1, 3B6, 2F11, 9C1 và 3H11, tương ứng với lần lượt epitop dạng thẳng và dạng cấu hình có thể đóng góp lớn cho độ nhạy cao của phương pháp ELISA. Tương tự, việc ứng dụng mAb 8H12 và mAb 6C6 và 3D4, tương ứng với lần lượt epitop dạng thẳng và dạng cấu hình, của N-1 neuraminidaza có thể góp phần rất lớn vào độ nhạy cao của phương pháp ELISA. Phương pháp sử dụng hai MAb này cũng có thể được dùng để phát triển phương pháp miễn dịch khác để phát hiện virus H5 và N1 như, ví dụ, bằng phương pháp lai điểm-vết và tại chỗ.

Thử nghiệm ELISA được ưu tiên theo sáng chế có thể phát hiện kháng nguyên HA từ gia cầm và người bị nhiễm AIV H5N1 ở Indonesia, chứng tỏ được khả năng ứng dụng phương pháp theo sáng chế để phát hiện nhiễm khuẩn H5N1 ở cả người và gia cầm.

mAb kiểu phụ H5 và kiểu phụ N1 theo sáng chế có ưu điểm hơn so với các phương pháp hiện có khác khi làm công cụ chẩn đoán. Trước tiên, đã thấy rằng MAb 5A5, 5C5, 2D9, 4F8, 1C1, 3B6, 2F11, 9C1 và 3H11 đặc hiệu cao đối với AIV kiểu phụ H5 độc lực cao, và hầu như mAb 9C1 nhận diện toàn bộ, hoặc gần như toàn bộ, chủng H5N1 Indonesia đã biết. Ngoài ra, MAb 6C6, 3D4 và 8H12 đặc hiệu cao đối với kiểu phụ N1 AIV và có thể được sử dụng để chẩn đoán nhiễm virus kiểu phụ N1, bao gồm toàn bộ, hoặc gần như toàn bộ, chủng H5N1 Indonesia đã biết. Kháng thể đơn dòng đặc hiệu cao này là bước đột phá trong lĩnh vực chẩn đoán bệnh cúm gia cầm. Trước sáng chế này, vẫn chưa hề có báo cáo về loại kháng thể đơn dòng có thể phát hiện toàn bộ, hoặc gần như toàn bộ, virus H5N1

Indonesia. Hầu như các kháng thể đơn dòng theo sáng chế này có thể nhận diện toàn bộ, hoặc hầu như toàn bộ, virus H5N1 thu gom được ở Indonesia trong hai năm cuối. MAb 6C6, 3D4 hoặc 8H12 có thể được sử dụng kết hợp (cùng nhau hoặc lần lượt) với mAb 5A5, 5C5, 2D9, 4F8, 1C1, 3B6, 2F11 hoặc 3H11 để xác định một thể phân lập cụ thể là thể phân lập H5N1. Ngoài ra, khả năng phát hiện và khoanh vùng một cách chính xác kháng nguyên virus H5 trong mô bị lây nhiễm được cố định formalin cũng như trong các xét nghiệm huyết thanh học, như HI và IFA, của MAb là có ưu điểm rõ rệt. Hơn nữa, MAb này cũng là cơ sở cho phương pháp chẩn đoán an toàn và tiện lợi để phát hiện nhiễm khuẩn AIV H5 và N1. Phiến kính chứa mẫu đông lạnh có thể được bảo quản đông lạnh trong khoảng thời gian dài và tạo thuận lợi cho việc chẩn đoán và theo dõi tiếp nhiễm khuẩn. Do đó, kháng thể theo sáng chế là hữu ích để chẩn đoán nhiễm khuẩn H5N1. Như nêu dưới đây, MAb theo sáng chế cũng hữu ích để điều trị nhiễm khuẩn H5N1. Do đó, MAb theo sáng chế sẽ là công cụ rất hữu ích hạn chế khả năng xảy ra bệnh dịch cúm.

Phương án thực hiện khác theo sáng chế đề xuất thể đột biến lần tránh sự trung hòa của cúm gia cầm H5. Thuật ngữ “thể đột biến lần tránh sự trung hòa” chỉ virus mang đột biến do các đột biến điểm tạo ra trong các gen mã hóa hemagglutinin, tạo ra sự dịch chuyển kháng nguyên trong virus H5 hoặc N1 và gây ảnh hưởng đến epitop trung hòa. Thể đột biến lần tránh sự trung hòa có thể tránh được sự trung hòa bởi một số kháng thể đơn dòng có hiệu quả trong việc trung hòa virus ban đầu của nó. Để sàng lọc thủ công thể đột biến lần tránh, virus ban đầu được ủ với một số kháng thể trung hòa và được cấy vào vật chủ như tế bào MDCK hoặc phôi gà. Sau từ 2 đến 3 vòng sàng lọc, thể đột biến lần tránh mAb trung hòa được tách dòng vô tính và đưa vào xác định trình tự gen HA1. Axit amin đột biến

được xác định bằng cách sắp thẳng hàng với trình tự virut ban đầu, và vị trí đột biến chỉ ra một cách chính xác một trong số các axit amin gồm cả epitop trung hòa được nhận diện bởi mAb trung hòa.

Theo sáng chế, thể đột biến lần tránh 5C5 sinh ra từ A/Indonesia/CDC669/AIV H5N1 bởi kháng thể đơn dòng trung hòa 5C5. Vị trí đột biến được liệt kê trong Ví dụ 3, Bảng 4, dưới đây. Thể đột biến lần tránh 2F11 sinh ra từ A/Vietnam/1203/2004/H5N1 bởi kháng thể đơn dòng trung hòa 2F11. Thể đột biến lần tránh 9C1 sinh ra từ thể đột biến K189M của A/Vietnam/1203/2004/H5N1 bởi kháng thể đơn dòng trung hòa 9C1. Ngoài 3H11, thể đột biến lần tránh 2F9 và 9C1 sinh ra từ A/Indonesia/CDC669/2006/H5N1. Vị trí đột biến được liệt kê trong Ví dụ 3, Bảng 4, dưới đây.

Virut mang các thể đột biến lần tránh sự trung hòa khác với virut ban đầu của chúng ở chỗ chúng không còn bị nhận diện bởi một số kháng thể trung hòa gắn kết đặc hiệu với virut ban đầu. Vì vậy, các thể đột biến này có thể được sử dụng để gây miễn dịch chuột để sản xuất kháng thể đơn dòng mới phù hợp với hướng dẫn nêu trên. Trong số các MAb mới, kháng thể đơn dòng nhận diện một cách chính xác epitop đột biến có thể được sàng lọc ra và sau đó có thể được dùng để kiểm soát bổ sung các virut cúm gia cầm khác so với dạng virut ban đầu. Bằng cách lặp lại quy trình này qua vài thế hệ, các thể đột biến lần tránh có thể được phát hiện và thu được kháng thể trung hòa khác. Các kháng thể này có thể được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế.

Theo phương án khác của sáng chế, kháng thể và protein gắn kết liên quan theo sáng chế có thể được áp dụng để điều trị cho đối tượng bị nhiễm khuẩn AIV H5, cụ thể là bị nhiễm khuẩn kiểu phụ H5N1 của AIV. Kháng thể và protein gắn kết liên quan theo sáng chế cũng có thể được áp dụng

cho đối tượng như một biện pháp phòng ngừa bệnh dịch cúm hoặc cảnh báo bệnh dịch. Kháng thể và protein gắn kết liên quan có thể được dùng ở dạng đơn liều hoặc dùng lặp lại, tùy ý ở dạng giải phóng chậm. Việc dùng có thể được thực hiện theo cách bất kỳ sao cho có thể làm cho kháng thể đến được các vị trí tác động của nó trong cơ thể của đối tượng được điều trị, ví dụ, trong tĩnh mạch, trong cơ, trong da, qua đường miệng hoặc qua đường mũi. Thông thường, kháng thể được dùng trong chất pha loãng và chất mang được dùng, như dung dịch nước vô trùng, và chế phẩm có thể còn bao gồm một hoặc nhiều chất cho ổn định, tá dược, chất hòa tan, dung dịch đệm, v. v... Phương pháp dùng chính xác, chế phẩm và liều lượng cụ thể sẽ được xác định và được điều chỉnh vào thời điểm điều trị, tùy thuộc vào nhu cầu cá nhân của đối tượng, có tính đến các yếu tố như độ tuổi, thể trọng, tình trạng sức khỏe chung, và bản chất và mức độ các triệu chứng bệnh của đối tượng cũng như tần suất điều trị được đưa ra. Nói chung, liều lượng của kháng thể được dùng nằm trong khoảng từ 0,1mg/kg đến 1mg/kg thể trọng khi kháng thể được dùng để điều trị bệnh nhân bị nhiễm khuẩn AIV H5. Thông thường, liều lượng được giảm một nửa, tức là nằm trong khoảng từ 0,05mg/kg đến 0,5mg/kg thể trọng, khi được dùng làm biện pháp phòng ngừa.

Một kháng thể trung hòa hoặc protein gắn kết theo sáng chế có thể được dùng để điều trị hoặc có thể dùng dạng kết hợp của hai hoặc nhiều loại. Nếu kháng thể được sản xuất từ một hoặc nhiều thể hệ của đột biến lẫn tránh sự trung hòa, thì kháng thể này và kháng thể theo sáng chế được mô tả trên đây có thể được dùng làm kháng thể điều trị “kết hợp” (cocktail). Kháng thể được ưu tiên để sử dụng làm tác nhân điều trị bao gồm 5C5, 2D9, 2F11, 9C1, 3H11 và 4F8 MAb.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau được đưa ra nhằm minh họa việc ứng dụng thực tế sáng chế. Sáng chế không giới hạn ở phần mô tả chi tiết ví dụ, mà phạm vi được yêu cầu bảo hộ tương ứng được nêu trong yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Ví dụ 1. Sản xuất tế bào lai

Tất cả virus H5N1 cúm còn sống, kiểu đại, trừ H5N1/PR8, thu được từ Indonesia. H5N1/PR8 thu được từ Trung tâm kiểm soát bệnh (The center for Disease Control - USA). Nó là virus tái tổ hợp không gây bệnh chứa gen HA và NA của virus AIV H5N1 lây nhiễm cho người ở Việt Nam (A/Vietnam/1203/2004). H5N2 (A/chicken/Singapore/98) và H7N1 (A/chicken/Singapore/94) thu được từ Cơ quan Nông sản và Thú y (Agri-Food & Veterinary Authority - AVA) của Singapore. Nguồn virus này được sử dụng để gây nhiễm trứng gà có phôi từ 9 và 11 ngày tuổi (Trại chăn nuôi gia cầm Chew, Singapore) và cho sinh sản trong hai thế hệ. Sau đó, dịch niệu được rút ra và độ chuẩn virus được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm ngưng kết hồng cầu (HA). H5N1 bất hoạt (A/goose/guangdong/97) được sử dụng để chiết ARN để khuếch đại gen HA1 bằng RT-PCR. Các tế bào thận chó Madin Darby (MDCK, ATCC CCL34) được cho sinh trưởng trong môi trường DMEM với 10% FBS ở 37°C với 5% CO₂.

Việc tinh chế virus được thực hiện bằng cách ly tâm dịch niệu chứa virus ở tốc độ 10.000 vòng/phút trong 30 phút để loại bỏ các mảnh vụn, tiếp đến là ly tâm siêu tốc dịch nổi bề mặt ở tốc độ 40,000 vòng/phút trong 3 giờ. Cụm virus được tạo huyền phù trong PBS.

Kháng thể đơn dòng được tinh chế từ các chất lỏng đã gạn bằng cách sử dụng cột ái lực protein A (Sigma Aldrich; St. Louis, MO, USA) và kit tinh chế Immunopure® IgM (Pierce Biotechnology; Rockford, IL, USA)

theo quy định của nhà sản xuất. Đo nồng độ kháng thể bằng cách sử dụng quang phổ kế ND-1000 (NanoDrop Technologies; Wilmington, DE, USA).

BALB/c chuột được gây miễn dịch bằng virus cúm gia cầm H5N2(A/chicken/Singapore/98) hoặc H7N1 (A/chicken/Singapore/94) bất hoạt với tá dược dầu Montanide ISA563 (Seppic, France) trong thể tích 0,2 ml. Tiến hành tiêm màng bụng (IP) vào các ngày 0, 14, 28 và 42. Tế bào lách của các con chuột đã được gây miễn dịch và các tế bào u tuỷ (SP2/0) được thu gom và được ngưng tụ như được De St. Groth và Scheidigger mô tả để thu được tế bào lai (16). Sau khi chọn môi trường hypoxanthin-aminopterin-thymidin (HAT), môi trường nuôi cấy từ tế bào lai cho thấy sự sinh trưởng đáng kể sau 14 ngày được thử nghiệm về sự có mặt của kháng thể đặc hiệu đối với các tế bào MDCK được gây nhiễm H5N1/PR8 bằng thử nghiệm huỳnh quang miễn dịch (immunofluorescence assay - IFA). Tế bào lai đã chọn được tách dòng vô tính bằng cách giới hạn mức pha loãng, nhận diện lại, tách dòng vô tính lần thứ hai, và xét nghiệm lại bằng IFA. Khi đã thiết lập, dòng tế bào lai được nhân giống trong môi trường nuôi cấy mô và được làm đông lạnh trong N₂ lỏng để sử dụng sau này.

Tế bào lai từ mỗi kháng thể đơn dòng đặc hiệu theo sáng chế thu được được tạo ra theo các phương pháp chung này.

Ví dụ 2. Sàng lọc MAb bằng IFA

Sử dụng thử nghiệm huỳnh quang miễn dịch để kiểm tra sự tương tác giữa kháng thể và đích kháng nguyên. Các tế bào MDCK đã được gây nhiễm virus cúm (H5N2 (A/chicken/Singapore/98) hoặc H7N1 (A/chicken/Singapore/94) qua đêm được rửa bằng PBS-T (0,05% Tween-20 trong PBS, độ pH=7,4) trong các đĩa 96 giếng. Các tế bào này được cố định bằng cách ủ chúng trong 100% etanol đã được làm lạnh sơ bộ trong

10 phút. Các tế bào được rửa trong PBS-T 3 lần, sau đó được ủ trong 1% BSA, PBS-T trong 30 phút để phong bế gắn không đặc hiệu của kháng thể. Sau đó, chúng được ủ với 10 μ L dịch nuôi cấy tế bào lai trong các giếng của đĩa 96 giếng trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng hoặc qua đêm ở 4°C. Các tế bào này được rửa bằng PBS-T và được ủ với kháng thể thứ phát, kháng thể kháng chuột dê/thỏ được đánh dấu huỳnh quang (DakoCytomation, USA), ở mức pha loãng bằng 1:100 trong 1% BSA, PBS-T, trong 60 phút ở nhiệt độ trong phòng. Các giếng được rửa bằng PBS-T. PBS-T được loại bỏ và cho vào đó 50% glyxerol trong PBS. Kiểm tra tín hiệu huỳnh quang bằng kính hiển vi với ánh sáng tia cực tím.

Các tế bào MDCK không được gây nhiễm được sử dụng làm mẫu kiểm chứng âm tính. Huyết thanh của chuột được gây miễn dịch bằng virut H5N1 bất hoạt được sử dụng làm mẫu kháng thể kiểm chứng dương tính. Bằng cách so sánh các tế bào MDCK được ủ với dịch nổi bề mặt của tế bào lai tương ứng với mẫu kiểm chứng, dịch nổi bề mặt của tế bào lai cho kết quả nhuộm dương tính được chọn để tách dòng vô tính bằng cách hạn chế mức pha loãng. Thu được các tế bào lai tạo ra mAb ổn định bằng phương pháp này.

Đã thấy rằng các kháng thể có ký hiệu mAb 5A5, 5C5, 2D9, 4F8, 1C1, 2F11 và 3B6 gắn kết với H5N1 hemagglutinin từ toàn bộ 25 thể phân lập Indonesia cũng như với H5N1/PR8 và H5N2. MAb 3H11 gắn kết với hemagglutinin từ gần như toàn bộ 25 thể phân lập Indonesia, nhưng không phải là H5N1/PR8 và H5N2. Đã thấy rằng mAb 6C6, 3D4 và 8H12 gắn kết với neuraminidaza từ toàn bộ thể phân lập H5N1 Indonesia cũng như H5N1/PR8 và H7N1. Đã thấy rằng MAb 9C1 gắn kết với chủng H5N1 Indonesia đặc hiệu; vì kháng thể này được tạo ra từ thể đột biến lẫn tránh của chủng cụ thể, nó gắn kết đặc hiệu với chủng AIV dạng 1 không phải là

lysine ở axit amin thứ 205 của H5. Đặc tính duy nhất này của mAb 9C1 có thể làm cho nó kết hợp được với mAb đặc hiệu 205-lysine khác trong các ứng dụng điều trị mà không phải quan tâm đến sự lẫn tránh của virus.

Chúng AIV phản ứng với mAb theo sáng chế được nêu trong Bảng 1 dưới đây.

Các ảnh IFA tiêu biểu được thể hiện trong Fig.1.

Bảng 1

MAb (đích)	5A5 (H5)	5C5 (H5)	6C6 (N1), 3D4 (N1)	1C1 (H5), 3B6 (H5)	2D9 (H5) 4F8 (H5)	8H12 (N1)	2F11 (H5)	3H11 (H5)	9C1 (H5)
A/IndonesiaA/chicken/60/2006 (H5N1)	+	+	+	+	+	+	+	+	N.T.
A/Indonesia/CDC7/2005 (H5N1)	+	+	+	+	+	+	+	+	N.T.
A/Indonesia/CDC326/2006(H5N1)	+	+	+	+	+	+	+	+	N.T.
A/Indonesia/CDC329/2006(H5N1)	+	+	+	+	+	+	+	+	N.T.
A/Indonesia/CDC370/2006(H5N1)	+	+	+	+	+	+	+	+	N.T.
A/Indonesia/CDC390/2006(H5N1)	+	+	+	+	+	+	+	+	N.T.
A/Indonesia/CDC523/2006(H5N1)	+	+	+	+	+	+	+	-	N.T.
A/Indonesia/CDC594/2006(H5N1)	+	+	+	+	+	+	+	-	-
A/Indonesia/CDC623/2006(H5N1)	+	+	+	+	+	+	+	+	N.T.
A/Indonesia/CDC644/2006(H5N1)	+	+	+	+	+	+	+	+	N.T.

A/Indonesia/CDC669/2006(H 5N1)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A/Indonesia/TLL001/2006(H 5N1)	+	+	+	+	+	+	+	+	N.T.
A/Indonesia/TLL002/2006(H 5N1)	+	+	+	+	+	+	+	+	N.T.
A/Indonesia/TLL003/2006 (H5N1)	+	+	+	+	+	+	+	+	N.T.
A/Indonesia/TLL004/2006(H 5N1)	+	+	+	+	+	+	+	+	N.T.
A/Indonesia/TLL005/2006(H 5N1)	+	+	+	+	+	+	+	+	N.T.
A/Indonesia/TLL006/2006(H 5N1)	+	+	+	+	+	+	+	+	N.T.
A/Indonesia/TLL007/2006(H 5N1)	+	+	+	+	+	+	+	+	N.T.
A/Indonesia/TLL008/2006(H 5N1)	+	+	+	+	+	+	+	+	N.T.
A/Indonesia/TLL009/2006(H 5N1)	+	+	+	+	+	+	+	+	N.T.
A/Indonesia/TLL010/2006(H 5N1)	+	+	+	+	+	+	+	+	N.T.
A/Indonesia/TLL011/2006(H 5N1)	+	+	+	+	+	+	+	+	N.T.
A/Indonesia/TLL012/2006(H 5N1)	+	+	+	+	+	+	+	+	N.T.
A/Indonesia/TLL013/2006(H 5N1)	+	+	+	+	+	+	+	+	N.T.
H5N1/PR8	+	+	+	+	+	+	+	-	-
A/chicken/Singapore/98 (H5N2)	+	+	-	+	+	-	+	-	-
(H7N1)	-	-	+	-	-	+	-	-	-
(H3N2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(H9N2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(H10N5)	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Lưu ý:

"+" là dương tính,

"-" là âm tính,

“N.T.” là chưa thực hiện xét nghiệm.

Ví dụ 3. Xác định đặc điểm của mAb kiểu phụ H5 và N1

Lập isotyp MAb. Việc lập isotyp được thực hiện bằng cách sử dụng kit isotyp mAb chuột (Amersham Bioscience, England) theo hướng dẫn được cung cấp kèm theo kit (dữ liệu không thể hiện). Tất cả mAb 5A5, 6C6, 2D9, 4F8, 1C1, 3B6, 3D4, 8H12, 9C1 và 3H11 được xác định là IgG1. MAb 5C5 được xác định là IgG2a, và mAb 2F11 được xác định là IgM.

Thử nghiệm ức chế ngưng kết hồng cầu (HI). Lượng kháng nguyên ngưng kết hồng cầu (HA) ổn định được cho vào mỗi giếng trong đĩa vi chuẩn độ (NUNC). Sau đó, kháng thể thử nghiệm được đưa vào đĩa thử nhất và được pha loãng chuỗi. Các đĩa này được ủ trong 1 giờ và sau đó tế bào hồng cầu của gà (red blood cell - RBC) được cho vào mỗi giếng. Nếu kháng thể có mặt trong huyết thanh thử nghiệm thì RBC sẽ không ngưng kết với kháng nguyên HA. Các giếng âm tính HI sẽ có tám khuếch tán RBC đã ngưng kết phủ lên đáy giếng. Các giếng HI dương tính sẽ có chấm giới hạn rõ về các RBC không ngưng kết.

MAb 5C5, 2D9, 2F11 và 4F8 trong dịch nuôi cấy có hoạt tính HI nằm trong khoảng từ 16 đến 64 với tất cả các thể phân lập H5N1 Indonesia và với H5N1/PR8. MAb 9C1 và 3H11 có hoạt tính HI với một trong số các thể phân lập H5N1 Indonesia này. Dựa trên cơ sở epitop kháng nguyên hướng đích bởi mAb 3H11, kháng thể đó có thể nhận diện đặc hiệu và

nhạy các chủng H trong nhóm 2,1,3. MAb 5A5, 1C1 và 3B6 không có hoạt tính HI.

Thử nghiệm vi trung hòa virus. Sử dụng các tế bào MDCK để xác định liều lượng gây nhiễm 50% môi trường nuôi cấy mô (TCID₅₀). Kháng thể với mức pha loãng chuỗi hai lần được cho vào các đĩa nuôi cấy tế bào 96 giếng. Kháng thể đã được pha loãng được trộn với thể tích như nhau của chất pha loãng chứa virus cúm ở liều lượng 100 TCIS₅₀/giếng. Sau thời gian ủ 2 giờ ở 37°C trong không khí ẩm CO₂ 5%, cho 10µl tế bào MDCK ở $1,5 \times 10^5$ /ml vào mỗi giếng. Các đĩa này được ủ trong 18 giờ ở 37°C và 5% CO₂. Các lớp đơn được rửa bằng PBS và được cố định trong 100% etanol trong 10 phút. Phát hiện sự có mặt của virus protein bằng ELISA với huyết thanh chuột tương ứng với bệnh cúm H5N1.

ELISA được thực hiện ở nhiệt độ trong phòng. Các đĩa đã cố định được rửa 3 lần bằng PBS-T (PBS chứa 0,05% Tween 20). Bổ sung kháng thể của huyết thanh chuột được pha loãng với tỷ lệ 1/500 trong PBS-T chứa 1% albumin huyết thanh bò vào mỗi giếng và được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Các đĩa này được rửa bốn lần trong dung dịch đệm rửa và cho 10µl globulin miễn dịch kháng chuột được đánh dấu peroxidaza cây cải ngựa (DakoCytomation, USA) được pha loãng với tỷ lệ 1/2000 vào mỗi giếng. Các đĩa này được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng và sau đó được rửa sáu lần bằng dung dịch đệm rửa. Một trăm microlit chất mới được điều chế (10mg o-phenylendiamin dihydroclorua cho mỗi 20ml dung dịch đệm phosphat xitrat 0,05M, độ pH = 5,0, chứa 0,03% natri perborat) được cho vào mỗi giếng và các đĩa này được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong khoảng 5 phút. Phản ứng được dừng lại bằng 5µL axit sulfuric 2N. Đo độ hấp phụ ở bước sóng 490nm (A₄₉₀) bằng quang phổ kế đĩa tự động (Mitenyi Biotec).

Bảng 2

MAb5C5	MAb+Virut		Virut	
	#1	#2	#3	#4
A/Indonesia/chicken/60(H5N1)	0,637	0,664	1,187	1,213
A/Indonesia/CDC7/2005(H5N1)	0,4	0,404	1,613	1,468
A/Indonesia/CDC370/2006(H5N1)	0,379	0,376	1,738	1,727
A/Indonesia/CDC594/2006(H5N1)	0,417	0,361	1,032	0,968
A/Indonesia/CDC623/2006(H5N1)	0,311	0,306	1,416	1,491
A/Indonesia/TLL006/2006(H5N1)	0,261	0,259	1,775	1,626
A/Indonesia/TLL007/2006(H5N1)	0,637	0,598	1,266	1,224
A/Indonesia/TLL008/2006(H5N1)	0,592	0,574	1,557	1,575
A/Indonesia/TLL013/2006(H5N1)	0,548	0,539	0,974	1,034
H5N1/PR8	0,224	0,208	0,532	0,588
Môi trường DMEM	0,089	0,09	0,079	0,074

Như được thể hiện trong Bảng 2, mAb 5C5 trung hoà thể phân lập H5N1 trên các tế bào MDCK được gây nhiễm. Với sự có mặt của kháng thể đơn dòng, giá trị đọc ELISA giảm xuống khoảng một nửa so với kết quả thu được từ các tế bào khi không có mặt của kháng thể, điều đó cho thấy rằng các hạt virut đã được trung hoà.

Do giá trị đọc ELISA có số liệu cơ bản cao trong khi đó IFA lại rõ ràng, các xét nghiệm về sự trung hòa được thực hiện bằng phương pháp phát hiện IFA trên các tế bào MDCK để khẳng định khả năng trung hòa của kháng thể đơn dòng. MAb 5C5 có thể trung hòa nhiễm khuẩn của tất cả các thể phân lập H5N1. Các kết quả này phù hợp với kết quả thử nghiệm IFA.

Fig. 2A và 2B minh họa hoạt tính trung hòa mAb trên các tế bào MDCK bị nhiễm AIV. Fig. 2A và 2B thể hiện các tế bào MDCK được

nhuộm bằng phương pháp huỳnh quang FITC tiếp theo là lần lượt trung hòa nhiễm virus khi có mAb và trung hòa khi không có mAb.

Chuẩn độ trung hòa virus trên các tế bào MDCK và ở phôi gà. Các tế bào MDCK và phôi gà 10 ngày tuổi được sử dụng để xác định lần lượt 50% liều gây nhiễm môi trường nuôi cấy mô (TCID₅₀) và 50% liều gây nhiễm phôi gà (EID₅₀). Các tế bào MDCK (2×10^4 /ml) được cho sinh trưởng đến mức chiếm từ 70% đến 90% bề mặt đĩa nuôi.

Phôi gà bị nhiễm virus tương ứng, sử dụng pha loãng theo loạt từ 10^{-1} đến 10^{-8} , và dịch niệu tiếp theo được xét nghiệm về TCID₅₀ và EID₅₀. Virus sau đó được sử dụng để lây nhiễm cả tế bào MDCK ở pha tăng trưởng của chúng (tính nhạy cao nhất với nhiễm virus) và phôi gà 10 ngày tuổi. Các tế bào và dịch niệu không bị nhiễm MDCK được sử dụng làm mẫu kiểm chứng âm tính. Các tế bào được ủ ở 35°C và quan sát CPE. Sử dụng thuật toán Reed và Muench (17), hiệu giá lây nhiễm được thể hiện bằng TCID₅₀/10μl và 1000EID₅₀/20μl và các virus tương ứng được pha loãng để có lần lượt 100 TCID₅₀ và 500 EID₅₀ trong 5μl và 10μl.

mAb 5C5 được pha loãng chuỗi có thể trung hòa nồng độ cuối cùng 100 TCID₅₀ và 500 EID₅₀ của virus (ví dụ A/Indonesia/DCD669/H5N1) trong các tế bào MDCK và phôi gà bị lây nhiễm. Xem Bảng 3. Các số liệu trong Bảng 3 phản ánh tỷ lệ pha loãng cao nhất của virus H5N1 mà tại đó mAb vẫn có thể phát hiện và trung hòa virus ở nồng độ cuối cùng 100 TCID₅₀ và 500 EID₅₀ của virus ở các tế bào MDCK và phôi gà bị lây nhiễm.

Bảng 3

	5C5
MDCK	160
Phôi	40

MAB 2D9, 3H11, 9C1, 2F11 và 4F8 tương tự với mAb 5C5, nhận diện epitop dạng cấu hình của H5 và có khả năng trung hòa nhiễm virus cúm trên các tế bào MDCK. Việc trung hòa virus và xác định liều gây nhiễm 50% môi trường nuôi cấy mô (TCID₅₀) được thực hiện như được mô tả trên đây đối với mAb 5C5. Các tế bào MDCK (2 x 10⁴/ml) được cho sinh trưởng đến mức chiếm từ 70% đến 90% bề mặt đĩa nuôi. Virus A/Indonesia/CDC669/H5N1 sau đó được sử dụng để gây nhiễm các tế bào MDCK ở pha tăng trưởng của chúng (tính nhạy cao nhất với nhiễm virus). Các tế bào không bị nhiễm MDCK được sử dụng làm mẫu kiểm chứng âm tính có tác dụng gây độc tế bào (CPE) và các tế bào bị lây nhiễm làm mẫu kiểm chứng dương tính CPE. Các tế bào được ủ ở 35⁰C và CPE được kiểm tra hàng ngày. Các kết quả được thể hiện trong Fig. 7A, 7B và 7C. Với sự có mặt của kháng thể đơn dòng, các tế bào MDCK đã không thể hiện CPE, do đó cho thấy rằng mAb có khả năng trung hòa.

MAB 1C1 và 3B6, cũng nhận diện epitop dạng cấu hình của H5, được thể hiện thông qua các phép phân tích tương tự để làm thiếu hụt khả năng trung hòa nhiễm virus cúm trên các tế bào MDCK.

Đặc điểm đặc trưng và lập bản đồ epitop.

1a. Lập bản đồ epitop dạng thẳng của mAb 5A5. Điện di gel natri dodecyl sulfat-polyacrylamit (SDS-PAGE) và thẩm tách Western được sử dụng để xác định và định vị epitop dạng thẳng của kháng thể đơn dòng 5A5, như được thể hiện trong Fig. 4A và 4B. Phương pháp SDS-PAGE và

thẩm tách Western được thực hiện như được Ausubel et al. (18) mô tả. HA1 hướng đích GST tái tổ hợp từ H5N1 được biểu hiện và xử lý với 10% SDS-PAGE. HA1 tái tổ hợp bằng khoảng 32 kD, và HA1 hướng đích GST được biểu hiện bằng khoảng 57kD. Các mẫu protein được điều chế bằng cách trộn protein mẫu với mẫu đệm và đun nóng ở 100⁰C trong 5 phút. Sau khi quay sơ bộ, thể sinh tan tế bào nguyên được đưa vào. Protein được tách bằng SDS-PAGE được quan sát bằng cách nhuộm với Coomassie Blue (0,25% Coomassie Brilliant Blue R-250, 40% metanol và 10% axit axetic băng) trong 30 phút và sau đó khử nhuộm qua đêm trong dung dịch khử nhuộm (40% metanol và 10% axit axetic băng). Để thẩm tách Western, các protein được chuyển từ gel đến màng nitroxenluloza bằng cách sử dụng Transblot Cell (Bio-Rad). Sau khi truyền điện tử, màng được phong bế bằng 5% sữa không béo (Bio-Rad) trong PBS-T và được thực hiện giống như chấm điểm nêu trên. Màng được phong bế bằng 5% sữa không béo (Bio-Rad, Canada) trong PBS với 0,05% Tween-20 (PBS-t) trong 60 phút. Sau khi phong bế, dịch nuôi cấy tế bào lai không được pha loãng chứa MAb được ủ với màng trong 60 phút, được rửa bằng PBS-T và sau đó được ủ với kháng thể tiếp hợp peroxidaza cây cải ngựa kháng chuột dê (tỷ lệ pha loãng 1:2000) (DakoCytomation) trong 60 phút. Màng được rửa và sau đó được phát triển với chất phản ứng phát hiện thẩm tách Western ECL (Amersham Biosciences) và được tiếp xúc với màng phim hình ảnh KODAK Scientific (KODAK BioMAX MS, USA).

MAb 5A5 được phản ứng với HA1 tái tổ hợp biến tính, cho biết epitop của MAb 5A5 là dạng thẳng. MAb 5C5 không thể phản ứng với HA1 tái tổ hợp biến tính, điều đó cho thấy rằng epitop của mAb này là dạng cấu hình.

Để lập bản đồ epitop dạng thẳng của mAb 5A5, HA1 của kiểu phụ H5 của được phân tích thành 3 mảnh lắp bằng PCR và được biểu hiện như protein dung hợp đuôi 6-histidin. Bằng cách thẩm tách Western với mAb5A5, phát hiện thấy epitop chủ yếu là ở vùng lắp của mảnh B và C (aa 201-271). Năm mảnh được làm cùn được thiết kế để lập bản đồ tiếp (Fig. 4A) bằng cách thẩm tách Western, và epitop được thu hẹp giữa axit amin 258 và 271. Để tìm ra trình tự axit amin chính xác của epitop dạng thẳng, chín thể đột biến với các đột biến điểm axit amin được xây dựng. Mỗi axit amin 259-264 và 268-271 trên HA1, với ngoại trừ là axit amin 269, được biến đổi thành alanin riêng biệt bằng một số đoạn môi; axit amin 269 được thay đổi từ alanin thành prolin (Fig. 4B). Từ các kết quả về thẩm tách Western được thể hiện trong Fig. 4B, trình tự của epitop dạng thẳng hướng đích bởi mAb5A5 là axit amin 260-269, AsnGlyAsnPheIleAlaProGluTyrAla (NGNFIAPEYA), trên hemagglutinin của kiểu phụ 5H.

1b. Xác định epitop dạng thẳng của mAb 8H12. Điện di gel natri đodexyl sulfat-polyacrylamit (SDS-PAGE) và thẩm tách Western được sử dụng để kiểm tra epitop dạng thẳng của mAb 8H12 theo các phương pháp nêu trong phần 1a. nêu trên cho mAb 5A5. NA1 tái tổ hợp đánh dấu MBP từ H5N1 được biểu hiện và xử lý với 10% SDS-PAGE. NA1 tái tổ hợp bằng khoảng 36 kD, và NA1 đánh dấu MBP được biểu hiện bằng khoảng 82 kD. MAb 8H12 được phản ứng với NA1 biến tính, cho thấy rằng epitop của kháng thể là dạng thẳng.

1c. Xác định epitop dạng cấu hình 2D9, 4F8, 1C1, 3B6, 2F11, 9C1 và 3H11. Các phương pháp của phần 1a. nêu trên được thực hiện bằng cách sử dụng từng MAb 2D9, 4F8, 3B6, 1C1, 2F11, 9C1 và 3H11. Không có

kháng thể nào trong số các kháng thể này phản ứng với HA1 biến tính, cho thấy rằng epitop của các MAb này là dạng cấu hình.

1d. Xác định epitop dạng cấu hình của mAb 6C6 và 3D4. Các phương pháp của phần 1b. nêu trên được thực hiện bằng cách sử dụng mAb 6C6 và 3D4. Kháng thể không phản ứng với NA1 biến tính, cho thấy rằng epitop của hai kháng thể này là dạng cấu hình.

2. Chọn lọc thể đột biến lẫn tránh và lập bản đồ epitop dạng cấu hình/trung hòa kiểu phụ H5 của MAb.

Lượng pha loãng chuỗi 10 lần virus ban đầu A/Indonesia/CDC669/2006(H5N1) được trộn với cùng thể tích của mAb. Sau khi ủ 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng, hỗn hợp được cấy vào lớp đơn tế bào MDCK trong môi trường DMEM chứa 20µg/ml trypsin đã xử lý TPCK (Sigma) và 0,001% DEAE-dextran (Sigma). Sau 7 ngày ở 35°C, virus dịch nổi bề mặt được thu gom và được chọn lọc tiếp. Thể đột biến lẫn tránh cũng được tạo ra bằng cách sử dụng một phương pháp khác, trong đó chủng cha mẹ được ủ với lượng dư mAb trong ít nhất 0,5 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, hỗn hợp được cấy vào phôi gà 10 ngày tuổi. Sau 2 hoặc 3 ngày ở 35°C, virus dịch nổi bề mặt được thu gom và được chọn lọc tiếp. Tiếp theo phương pháp này, thể đột biến lẫn tránh được tách dòng vô tính và được thu gom để chiết ARN. Đột biến điểm đáp ứng về độ bền với sự trung hòa mAb được xác định bằng trình tự sắp thẳng hàng với virus ban đầu. Khả năng cho phép virus đột biến lẫn tránh sự trung hòa mAb của đột biến này được kiểm tra bằng thử nghiệm trung hòa và thử nghiệm ức chế ngưng kết hồng cầu.

Một vài thể đột biến lẫn tránh được chọn bằng cách sử dụng mAb 5C5 được trung hòa. Thể đột biến lẫn tránh được tách dòng vô tính và được thu gom để chiết ARN. Theo trình tự, đột biến điểm xảy ra lần lượt

trên các nucleotit 524, 503 và 602, trên trình tự HA (trình tự này có ở GenBank; số lưu giữ GenBank # CY014481; GenBank GI # 113497155). Nucleotit 524 AC thay đổi thành AT, dẫn đến đột biến trên axit amin 175 từ threonin thành isoleuxin. Nucleotit 503 “A” thay đổi thành “T,” dẫn đến đột biến trên axit amin 168 từ lysin thành isoleuxin. Nucleotit 602 “C” thay đổi thành “A,” dẫn đến đột biến trên axit amin 201 từ alanin thành axit glutamic. Các đột biến này có thể làm cho virus đột biến lẩn tránh sự trung hòa kháng thể từ mAb 5C5, điều này được kiểm tra bằng thử nghiệm trung hòa và thử nghiệm ức chế ngưng kết hồng cầu. Kết quả này cho biết epitop hướng đích mAb 5C5 chứa axit amin 168, 175 và 201 trên hemagglutinin. Các kết quả này được thể hiện trong Bảng 4, thể hiện sự định vị của epitop trung hòa mAb trên phân tử hemagglutinin của AIV (A/Indonesia/CDC669/H5N1).

Các đột biến điểm cho các mAb khác được xác định tương tự như được thể hiện trong Bảng 4.

Bảng 4

Virut ban đầu	Mab	Nucleotit	Thay đổi nucleotit	Axit amin	Thay đổi axit amin
CDC669	5C5	524	C thành T	175	Thr thành Ile
		503	A thành T	168	Lys thành Ile
		602	C thành A	201	Ala thành Glu
	3H11	464	G thành A	155	Gly thành Glu
	2F11	772	G thành A	258	Gly thành Lys
	2F11	628	C thành T	210	Pro thành Ser
	9C1	599	C thành A	200	Ala thành Glu
	2D9	717	T thành A	239	Ser thành Arg
		613	A thành T	205	Arg thành Trp
		717	T thành A	239	Ser thành Arg
		470	C thành T	157	Pro thành Leu

CDC669	4F8	717	T thành A	239	Ser thành Arg
		512	G thành T	171	Ser thành Ile
		715	A thành C	239	Ser thành Arg
		512	G thành T	171	Ser thành Ile
VN1203	2F11	629	C thành T	210	Pro thành Val
		772	G thành A	258	Glu thành Lys
	2D9	700	A thành G	234	Lys thành Glu
	4F8	613	A thành G	205	Lys thành Glu
VN1203 K198M)	9C1	614	T thành A	205	Met thành Lys

MAb 6C6, 3D4 và 8H12 nhận diện neuraminidaza từ H5N1.

1. Neuraminidaza tái tổ hợp được biểu hiện trong hệ virus hình que/Sf9 được sử dụng để kiểm tra phản ứng giữa mAb 6C6 và neuraminidaza.

ARN của virus được phân lập từ các tế bào MDCK bị lây nhiễm virus bằng cách sử dụng chất phản ứng LS Trizol (Invitrogen) theo quy định của nhà sản xuất. Phiên mã ngược và PCR được thực hiện để khuếch đại gen neuraminidaza H5N1/PR8 bằng cách sử dụng các đoạn môi N1 (vào) F (CACCATGAATCCAAATCAGAAGATAACAACC) và N1 (vào) R (CTTGTCATGGTGAATGGCAA). Sản phẩm PCR được tách dòng vô tính vào vật truyền tách dòng vô tính pGEM-T Easy (Promega, WI, USA) theo quy định của nhà sản xuất. Plasmid tái tổ hợp chứa trình tự mã hóa neuraminidaza được sắp xếp trình tự và được xác nhận phù hợp với trình tự tham khảo trong dữ liệu. Gen neuraminidaza được tách dưới dòng vô tính vào vật truyền của pENTR/TEV/D-TOPO làm bước chuyển tiếp, sau đó được lồng vào virus hình que theo hướng dẫn của Gateway System của nhà cung cấp (Invitrogen, CA, USA). Virus hình que tái tổ hợp với gen neuraminidaza được sử dụng để chuyển nhiễm các tế bào côn trùng Sf9 và được biểu hiện theo hướng dẫn của nhà cung cấp (Invitrogen). Các tế bào

côn trùng Sf9 với neuraminidaza được biểu hiện được cố định và IFA được thực hiện với mAb 6C6, như với quy trình IFA với các tế bào MDCK được hướng dẫn trên đây.

Fig. 5A và 5B thể hiện phản ứng điển hình giữa mAb 6C6 và N1 tái tổ hợp được biểu hiện. Phản ứng của mAb 3D4 và N1 tái tổ hợp được biểu hiện tương tự. Fig. 5A thể hiện N1 tái tổ hợp được biểu hiện được phát hiện ở các tế bào Sf9. Trong Fig. 5B, sự hợp nhất giữa ánh sáng tia cực tím và ánh sáng chuẩn cho biết các tế bào riêng rẽ.

2. Epitop của MAb 6C6 và 3D4 là dạng cấu hình chứ không phải là dạng thẳng.

Các tế bào côn trùng Sf9 được gây nhiễm bằng virus hình que với đoạn cài xen NA và được ủ trong 96 giờ ở 28°C. Các tế bào được thu gom, được trộn với dung dịch đệm mẫu và đưa vào gel SDS-PAGE để nhuộm Coomassie Blue và thẩm tách Western với lần lượt (huyết thanh chuột kháng H5N1) mAb6C6 hoặc mAb 3D4. Thẩm tách Western kiểm tra sự biểu hiện của NA tái tổ hợp trong các tế bào Sf9. Không có vạch tín hiệu đối với mAb 6C6 hoặc 3D4 bằng cách thẩm tách Western, điều đó cho thấy epitop của MAb 6C6 và 3D4 là dạng cấu hình.

Fig. 6A và 6B thể hiện phương pháp SDS-PAGE và thẩm tách Western để kiểm tra NA được biểu hiện. Fig. 6A cho thấy rằng phân tử lượng của NA bằng khoảng 49 kDa trên gel SDS-PAGE. Trong Fig. 6B thẩm tách Western cho thấy NA tái tổ hợp phản ứng với huyết thanh chuột kháng H5N1 như kháng thể.

Phòng bệnh và điều trị

Dựa vào khả năng của mAb 5C5 để trung hòa H5N1 ở cả tế bào MDCK lẫn phôi gà và isotyp IgG2a của nó, mAb 5C5, và kháng thể tái tổ hợp bao gồm vùng biến đổi của kháng thể đó, là hữu ích cho cả phòng

bệnh lần điều trị. Thường được chấp nhận rằng, dựa trên cơ sở các nghiên cứu trên chuột (19, 20, 21), kháng thể IgG trung hòa có cả khả năng phòng bệnh và điều trị.

Tương tự, xét về khả năng của MAbs 2D9, 2F11, 3H11, 9C1 và 4F8 để trung hòa H5N1 ở các tế bào MDCK và isotyp IgG1 hoặc IgM của chúng, các mAb này, và kháng thể tái tổ hợp bao gồm vùng biến đổi của các kháng thể đó, là hữu ích cho cả phòng bệnh và điều trị.

Các thử nghiệm dưới đây minh họa đặc tính phòng bệnh và điều trị của mAb 5C5:

Các nhóm gồm 6 con chuột BALB/c trưởng thành (từ 6 đến 8 tuần tuổi) được sử dụng làm mẫu động vật để nghiên cứu hàng rào bảo vệ tránh khỏi sự tấn công của virus gây chết người bằng cách cho sử dụng mAb 5C5. Việc cấy chuột và thu gom máu được thực hiện trong buồng an toàn sinh học với mặt nạ phòng độc cá nhân đã làm sạch không khí. Tất cả các thao tác với các con chuột bị nhiễm cúm đều được thực hiện trong buồng an toàn sinh cấp độ 3 (BSL3).

Để đánh giá hiệu quả của kháng thể đơn dòng khi dùng làm tác nhân phòng bệnh (tức là, trước khi bị nhiễm virus) ở mẫu động vật, mAb 5C5 được tinh chế được dùng ở liều dùng 10mg/kg trong màng bụng (i.p.) chuột. Hai mươi tư giờ sau khi dùng trong màng bụng, the chuột được lấy máu để đo hiệu giá HI với H5N1, sau khi gây nhiễm qua mũi (i.n.) bằng 10 LD₅₀ A/Indonesia/CDC669/H5N1 trong 20µl. Nhóm kiểm chứng (tổng cộng là 6 con chuột) nhận mAb 5C4 of IgG1, là kháng thể đơn dòng của chuột trong nhóm được tạo ra để kháng vi khuẩn *C. jejuni*. Quan sát chuột hàng ngày trong 14 ngày để phân tích sự sống sót. Trong nhóm kiểm chứng, 6/6 chuột đã chết trong vòng 10 ngày sau nhiễm khi bị khuẩn. Trái lại, chuột đã được xử lý mAb 5C5 được bảo vệ đáng kể – tất cả 6 con

chuột trong nhóm vẫn sống sau khoảng thời gian quan sát 14 ngày. Huyết thanh từ mAb 5C5-được dùng cho chuột đã có hơn 64 hiệu giá HI với A/Indonesia/CDC669/H5N1. Số liệu này cho thấy rằng việc dùng mAb 5C5 của IgG2a có thể thâm vào máu chuột và cuối cùng làm thuận lợi hơn việc làm chết virus trong cơ thể chuột.

Để đánh giá hiệu quả của mAb 5C5 trong điều trị, kháng thể được dùng sau khi nhiễm virus. Một ngày (24 giờ) sau khi liều lượng gây chết 10 LD₅₀ A/Indonesia/CDC669/H5N1 trong 20μL được đưa vào mỗi 6 con chuột, mAb 5C5 được dùng ở liều lượng 10mg/kg bằng cách tiêm trong màng bụng (IP). Nhóm kiểm chứng (6 chuột) được tiêm mAb 5C4 của IgG1, là kháng thể trong nhóm được tạo ra để kháng *C. jejuni*. Trong nhóm kiểm chứng, 6/6 chuột đã chết trong vòng 10 ngày sau khi nhiễm khuẩn. Trong nhóm mAb 5C5, 5/6 chuột còn sống nhưng nhiễm virus vào ngày thứ 14.

Các số liệu này cho thấy rằng mAb 5C5 có hiệu quả bằng việc dùng thậm chí sau cả khi đã nhiễm virus, cho thấy rằng kháng thể có thể được sử dụng cho cả trong phòng bệnh lẫn điều trị.

Ví dụ 4

ELISA bắt giữ kháng nguyên (AC-ELISA) cho nhận diện AIV kiểu phụ H5N1 bằng cách sử dụng kết hợp mAb6C6 tương ứng với kiểu phụ N1 và mAb5C5 tương ứng với kiểu phụ H5

Như được mô tả trên đây, mẫu chứa virus H5N1 có thể được nhận diện làm kiểu phụ H5 bằng cách sử dụng mAb 5C5 hoặc mAb 5A5 và riêng rẽ làm kiểu phụ N1 bằng cách sử dụng mAb 6C6. Các mẫu cũng có thể được nhận diện làm H5N1 thông qua việc sử dụng kết hợp một kháng thể 6C6 và kháng thể 5C5. AC-ELISA được thiết kế để phát hiện virus H5N1. MAb 5C5 được ủ ở 0,5g/giếng trong 10μl/giếng trong 10μl PBS

trong đĩa 96 giếng (đĩa miễn dịch U96 MaxiSorp NUNC) qua đêm ở 4°C. Sau khi rửa đĩa bằng PBS-T, đĩa đã phủ được phong bế bằng 1% albumin huyết thanh bò (BSA) trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Dung dịch phong bế sau đó được loại bỏ, và thể phân lập H5N1 bất hoạt được pha loãng trong PBS ở 20 HA đơn vị trong 10µl được cho vào mỗi giếng và được ủ trong 2 giờ.

Các đĩa được rửa bốn lần trong dung dịch đệm rửa PBS-T, và 10µl mAb 6C6 được đánh dấu peroxidaza cây cải ngựa được pha loãng với tỷ lệ 1/500 được cho vào mỗi giếng. Các đĩa được ủ tiếp trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng và sau đó được rửa 6 lần bằng dung dịch đệm rửa. Một trăm microlit chất được điều chế mới (10mg o-phenylendiamin dihydroclorua cho mỗi 20ml dung dịch đệm phosphat xitrat 0,05M, độ pH = 5,0, chứa 0,03% natri perborat) được cho vào mỗi giếng và các đĩa được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong khoảng 5 phút. Phản ứng được dừng lại bằng 5µl axit sulfuric 2N. Độ hấp phụ được đo ở bước sóng 490nm (A_{490}) bằng quang phổ kế đĩa tự động (Mitenyi Biotec). Virut H5N1 có giá trị đọc A_{490} có ý nghĩa, trong khi đó virut H7N1 có giá trị đọc thấp làm mẫu kiểm chứng âm tính. Các kết quả nêu trong Bảng 5 cho thấy rằng sự kết hợp của mAb 5C5 và mAb 6C6 là hữu ích để nhận diện AIV H5N1. Mẫu chứa AIV H5N1 có thể được nhận diện bằng cách sử dụng mAb 5C5 và mAb 6C6 riêng rẽ, nhưng việc sử dụng các kháng thể kết hợp mang lại phương tiện để hạn chế lượng mẫu cần dùng.

Tương tự, sự kết hợp của mAb 5A5 và mAb 6C6, hoặc các tổ hợp thích hợp khác của MAb theo sáng chế, cũng có thể được sử dụng để nhận diện AIV H5N1.

Bảng 5

Kết quả về AC-ELISA bằng cách sử dụng kết hợp mAb 5C5 và mAb 6C6 để xác định H5N1

	#1	#2	#3
A/Indonesia/CDC644/H5N1	1,364	1,275	1,298
A/Indonesia(CDC623/H5N1	1,148	1,162	1,198
A/Indonesia/CDC594/H5N1	0,605	0,589	0,6
A/Indonesia/CDC329/H5N1	1,201	1,165	1,143
A/chicken/Singapore/94(H7N1)	0,206	0,197	0,193
PBS làm mẫu kiểm chứng âm tính	0,188	0,171	0,177
Khoảng trắng	0,053	0,06	0,058

Ví dụ 5. Hoạt tính của MAb 2F11, 9C1 và 3H11

Hoạt tính gắn kết của mỗi MAb 2F11, 9C1 và 3H11 được đánh giá trong thử nghiệm huỳnh quang miễn dịch gián tiếp với các tế bào MDCK bị lây nhiễm H5N1-AIV (IFA), thử nghiệm thâm tách Western (WB), ức chế ngưng kết hồng cầu (HI) và trung hòa virut (VN).

Các kết quả của thử nghiệm được nêu trong các Bảng từ 6 đến 8 dưới đây:

Bảng 6

Hoạt tính gắn kết với thể đột biến lẫn tránh K205M từ AIV H5N1 (A/Vietnam/1203/2004/H5N1)

MAB	IFA	WB	HI	VN
2F11	+	--	+	+
9C1	+	--	+	+
3H11	--	--	--	--

Bảng 7

Hoạt tính gắn kết với thể đột biến lần tránh K205M từ AIV H5N1 (A/Indonesia/CDC669/2206/H5N1)

Mab	IFA	WB	HI	VN
2F11	+	--	+	+
9C1	+	--	+	+
3H11	+	--	+	+

Thể đột biến lần tránh K205M được tạo ra từ tế AIV H5N1 (A/Vietnam/1203/2004/H5N1) qua sàng lọc với mAb 6B8, kháng thể đơn dòng được nộp lưu tại Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Mỹ (American Type Culture Collection) vào 20/3/2007, là ATCC CRL PTA-8246. Sự tương tác đặc hiệu của mAb 9C1 và 2F11 với các thể đột biến K205 này gợi ý về khả năng ứng dụng của hai MAb này trong việc ức chế việc sinh ra thể đột biến lần tránh cùng với mAb 6B8.

Ví dụ 6. Ứng dụng điều trị của MAb 2F11 và 9C1

Cả 2F11 lẫn 9C1 được tạo ra từ thể đột biến lần tránh K205M của chủng H5 A/Vietnam/1203/2004/H5N1 và như vậy có thể được kết hợp với kháng thể đơn dòng khác hướng đích thể đột biến này nhưng không gắn kết, hoặc gắn kết ở hoạt tính thấp hơn, với chủng dạng đại, như mAb 6B8 (được tạo ra bởi tế bào lai 6B8 và được nộp lưu tại ATCC ngày 20/3/2007, theo hiệp ước Budapest và với số lưu giữ là CRL PTA-8246), mAb hướng đích chủng 205K dạng đại ở chủng VN1203, làm tác nhân điều trị. MAb 9C1 nhận diện thể đột biến K205M nhưng không gắn kết với chủng dạng đại VN1203, cho thấy rằng mAb hướng đích epitop của 205 metionin ở chủng VN1203. Hỗn hợp (cocktail) kháng thể đơn dòng bao

gồm MAb 9C1 và 6B8 có thể ức chế một cách hiệu quả nhiễm khuẩn H5N1 và ngăn ngừa thể đột biến lần tránh tạo ra *in vitro* và *in vivo*.

Bảng 9: So sánh hoạt tính HI của MAb 6B8 và 9C1

Mab	Việt nam 1203 (nhóm 1)	
	WT205K	K205M
8B6	+	--
9C1	--	+

Để minh họa hoạt tính của MAb 6B8 và 9C1, 16 đơn vị HA của AIV được ủ với MAb như được thể hiện trong Bảng dưới đây trong ít nhất một nửa giờ ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp được cấy vào phôi gà 10 ngày tuổi. Hiệu giá HA và khả năng sống của phôi được đánh giá hằng ngày. Kết quả được thể hiện trong Bảng 10 dưới đây:

Bảng 10

mAB		1203 (nhóm 1, 16HA)
6B8 (1ug)	Virut HA	+2 ngày p.i.
	Khả năng sống sót của gà	--2 ngày p.i.
6B8 (1ug)+ 9C1 (0,1ug)	Virut HA	--3 ngày p.i.
	Khả năng sống sót của gà	+
6B8 (1ug)+ 9C1 (1ug)	Virut HA	--3 ngày p.i.
	Mức sống sót của gà	+
6B8(1ug)+ 9C1(5ug)	Virut HA	--3 ngày p.i.
	Khả năng sống sót của gà	+
9C1(1ug)	Virut HA	+1 ngày p.i.
	Khả năng sống sót của gà	--2 ngày p.i.

“—” cho biết kết quả âm tính trong thử nghiệm HA hoặc phôi gà chết

“+” cho biết kết quả dương tính trong thử nghiệm HA hoặc phôi gà còn sống

p.i. cho biết sau nhiễm khuẩn

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Jeffery K. Taubenberger, Ann H. Reidl, Raina M. Lourensl, Ruixue Wang, Guozhong Jin and Thomas G. Fanningl. 2006. Molecular virology: Was the 1918 pandemic caused by a bird flu? Was the 1918 flu avian in origin? *Nature*. 440:E9-E10.
2. Ann H. Reid, Jeffery K. Taubenberger & Thomas G. Fanning. 2004. Evidence of an absence: the genetic origins of the 1918 pandemic influenza virus. *Nature Reviews Microbiology* 2:909-914.
3. Patrick J Gavin, Richard B Thomson, Jr. 2003. Review of Rapid Diagnostic Tests for Influenza. *Clinical and Applied Immunology Reviews* 4:151-172.
4. Gregory A. Storch, MD. Rapid diagnostic tests for influenza. 2003. *Current Opinion in Pediatrics*. 15:77-84.
5. Yuen KY, Chan PK, Peiris M, Tsang DN, Que TL, Shortridge KF, et al. 1998. Clinical features and rapid viral diagnosis of human disease associated with avian influenza A H5N1 virus. *Lancet*. 351:467-71.
6. Varghese, J. N. et al. 1998. Drug design against a shifting target: a structural basis for resistance to inhibitors in a variant of influenza virus neuraminidase. *Structure* 6:735-746.
7. Le, Q. M. et al. 2005. Avian flu: isolation of drug-resistant H5N1 virus. *Nature* 438: 754.
8. Kiso, M. et al. 2004. Resistant influenza A viruses in children treated with oseltamivir: descriptive study. *Lancet* 364:759-765.
9. de Jong, M. D. et at. 2005. Oseltamivir resistance during treatment of influenza A (H5N1) infection. *N. Engl. J. Med*. 353:2667-2672.
10. Russell RJ, Haire LF, Stevens DJ, Collins PJ, Lin YP, Blackburn GM, Hay AJ, Gamblin SJ, Skehel JJ. 2006. The structure of H5N1 avian

influenza neuraminidase suggests new opportunities for drug design. *Nature* 443, 45-49.

11. Cameron P Simmons, Nadia L Bernasconi, Amorsolo L Suguitan, Jr., Kimberly Mills, Jerrold M Ward, Nguyen Van Vinh Chau, Tran Tinh Hien, Federica Sallusto, Do Quang Ha, Jeremy Farrar, Menno D de Jong, Antonio Lanzavecchia, and Kanta Subbarao. 2007. Prophylactic and Therapeutic Efficacy of Human Monoclonal Antibodies against H5N1 Influenza. *PLoS Med.* 4:e178.
12. Brendon J Hanson, Adrianus CM Boon, Angeline PC Lim, Ashley Webb, Eng Eong Ooi, and Richard J Webby. 2006. Passive immunoprophylaxis and therapy with humanized monoclonal antibody specific for influenza A H5 hemagglutinin in mice. *Respir Res.* 7: 126.
13. Jiahai Lu, Zhongmin Guo, Xinghua Pan, Guoling Wang, Dingmei Zhang, Yanbin Li, Bingyan Tan, Liping Ouyang, and Xinbing Yu. 2006. Passive immunotherapy for influenza A H5N1 virus infection with equine hyperimmune globulin F(ab')₂ in mice. *Respir Res.*; 7: 43.
14. Chen H, Smith GJ, Li KS, Wang J, Fan XH, Rayner JM, Vijaykrishna D, Zhang JX, Zhang LJ, Guo CT, Cheung CL, Xu KM, Duan L, Huang K, Qin K, Leung YH, Wu WL, Lu HR, Chen Y, Xia NS, Naipospos TS, Yuen KY, Hassan SS, Bahri S, Nguyen TD, Webster RG, Peiris JS, Guan Y. 2006. Establishment of multiple sublineages of H5N1 influenza virus in Asia: implications for pandemic control. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:2845-50.
15. Smith GJ, Naipospos TS, Nguyen TD, de Jong MD, Vijaykrishna D, Usman TB, Hassan SS, Nguyen TV, Dao TV, Bui NA, Leung YH, Cheung CL, Rayner JM, Zhang JX, Zhang LJ, Poon LL, Li KS, Nguyen VC, Hien TT, Farrar J, Webster RG, Chen H, Peiris JS, Guan Y. 2006. Evolution and

adaptation of H5N1 influenza virus in avian and human hosts in Indonesia and Vietnam. *Virology*. 350:258-68.

16. De St. Groth, S. F., and D. Scheidigger. 1980. Production of monoclonal antibodies. Strategy and tactics. *J. Immunol. Methods*. 35:121.

17. Reed, L. J., and H. Muench. 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints, *Am. J. Hyg.* 27:493-497.

18. Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and K. Struhl. 1999. *Current protocols in molecular biology*. John Wiley and Sons, Inc., New York, N.Y.

19. Huber, Victor C., McKeon, Raelene M., Brackin, Martha N., Miller, Laura A., Keating, Rachael, Brown, Scott A., Makarovna, Natalia, Perez, Daniel R., MacDonald, Gene H., McCullers, Jonathan A. 2006. Distinct Contributions of Vaccine-Induced Immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG2a Antibodies to Protective Immunity against Influenza. *Clin. Vaccine Immunol.* 13:981-990.

20. Yuichi Harada, Masamichi Muramatsu, Toshikatsu Shibata, Tasuku Honjo, and Kazumichi Kuroda. Unmutated immunoglobulin M Can Protect Mice from Death by Influenza Virus Infection. *J. Exp. Med.* 197: 1779-1785.

21. Palladino, G, Mozdzanowska, K, Washko, G, Gerhard, W. 1995. Virus-neutralizing antibodies of immunoglobulin G (IgG) but not of IgM or IgA isotypes can cure influenza virus pneumonia in SCID mice. *J. Virol.* 69:2075-2081.

22. Krystyna Mozdzanowska, Jingqi Feng, and Walter Gerhard. J. 2003. Virus-Neutralizing Activity Mediated by the Fab Fragment of a Hemagglutinin-Specific Antibody Is Sufficient for the Resolution of Influenza Virus Infection in SCID Mice. *J. Virol.* 77:8322-8328.

23. Lu J, Guo Z, Pan X, Wang G, Zhang D, Li Y, Tan B, Ouyang L, Yu X. 2006. Passive immunotherapy for influenza A H5N1 virus infection with equine hyperimmune globulin F(ab')₂ in mice. *Respiratory Research*. 7:43.
24. Horimoto, T. et al. Antigenic differences between H5N1 human influenza viruses isolated in 1997 and 2003. *J. Vet. Med. Sci.* 66:303-5.
25. Iwasaki, T., et al. *Acta Neuropathol. (Berl)*., 108:485-92.
26. Steven, J, et al. Structure and receptor specificity of the hemagglutinin from an H5N1 influenza virus. *Science* 312:404-10.
27. Robert G. Webster, A.G. 1994. *Encyclopedia of Virology*, 2:709-724.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Protein gắn kết gắn kết đặc hiệu với epitop dạng cấu hình của glycoprotein vỏ ngưng kết hồng cầu của virus cúm gia cầm kiểu phụ H5 và có đặc tính gắn kết miễn dịch của kháng thể đơn dòng 3H11 được tạo ra bởi tế bào lai 3H11 được nộp lưu tại Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Mỹ (the American Type Culture Collection) với số truy cập là PTA-9374, trong đó epitop dạng cấu hình này chứa axit amin 155 (Gly).
2. Protein gắn kết theo điểm 1, trong đó protein gắn kết này là kháng thể đơn dòng, kháng thể chuỗi đơn, mảnh kháng thể, kháng thể khảm hoặc kháng thể được làm giống như kháng thể của người.
3. Protein gắn kết theo điểm 1, trong đó protein gắn kết này là kháng thể đơn dòng.
4. Kháng thể đơn dòng 3H11 được tạo ra bởi tế bào lai 3H11 được nộp lưu tại Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Mỹ (the American Type Culture Collection) với số truy cập là PTA-9374.
5. Phương pháp phát hiện virus cúm gia cầm kiểu phụ H5 trong mẫu xét nghiệm sinh học, bao gồm bước cho mẫu sinh học này tiếp xúc với protein gắn kết gắn kết đặc hiệu với epitop dạng cấu hình của glycoprotein vỏ ngưng kết hồng cầu của virus cúm gia cầm kiểu phụ H5, protein gắn kết này có đặc tính gắn kết miễn dịch của kháng thể đơn dòng 3H11 được tạo ra bởi tế bào lai 3H11 được nộp lưu tại Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Mỹ (the American Type Culture Collection) với số truy cập là PTA-9374, trong đó epitop dạng cấu hình này chứa axit amin 155 (Gly).
6. Phương pháp theo điểm 5, trong đó protein gắn kết này là kháng thể đơn dòng, kháng thể chuỗi đơn, mảnh kháng thể, kháng thể khảm hoặc kháng thể được làm giống như kháng thể của người.

7. Phương pháp theo điểm 5, trong đó protein gắn kết này là kháng thể đơn dòng.
8. Phương pháp theo điểm 7, trong đó kháng thể đơn dòng là kháng thể 3H11 được tạo ra bởi tế bào lai 3H11 được nộp lưu tại Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Mỹ (the American Type Culture Collection) với số truy cập là PTA-9374.
9. Phương pháp theo điểm 5, bao gồm bước cho mẫu sinh học này tiếp xúc với protein gắn kết thứ hai gắn kết đặc hiệu với glycoprotein vỏ của virus cúm gia cầm kiểu phụ H5, trong đó protein gắn kết thứ nhất là protein gắn kết bất giữ và protein gắn kết thứ hai là protein gắn kết phát hiện chứa hoặc được liên hợp với yếu tố phát hiện được.
10. Phương pháp theo điểm 9, trong đó ít nhất một trong số protein gắn kết thứ nhất và protein gắn kết thứ hai là kháng thể đơn dòng.
11. Phương pháp theo điểm 9, trong đó protein gắn kết thứ nhất và protein gắn kết thứ hai là kháng thể đơn dòng.
12. Phương pháp theo điểm 9, trong đó protein gắn kết thứ nhất được giữ cố định trên bề mặt rắn.
13. Phương pháp theo điểm 9, trong đó protein gắn kết thứ hai chứa nguyên tử phóng xạ, được liên hợp với phân tử huỳnh quang, hoặc được liên hợp với enzym.
14. Kit phát hiện virus cúm gia cầm kiểu phụ H5 trong mẫu xét nghiệm sinh học, bao gồm protein gắn kết gắn kết đặc hiệu với epitop dạng cấu hình của glycoprotein vỏ ngưng kết hồng cầu của virus cúm gia cầm kiểu phụ H5, protein gắn kết này có đặc tính gắn kết miễn dịch của kháng thể đơn dòng 3H11 được tạo ra bởi tế bào lai 3H11 được nộp lưu tại Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Mỹ (the American Type Culture Collection) với số truy cập là PTA-9374, trong đó epitop dạng cấu hình này chứa axit amin

155 (Gly), cùng với ít nhất một chất phản ứng để phát hiện gắn kết của protein gắn kết này với glycoprotein vỏ.

15. Kit theo điểm 14, trong đó kit này bao gồm protein gắn kết thứ hai gắn kết đặc hiệu với glycoprotein vỏ của virus cúm gia cầm kiểu phụ H5, trong đó protein gắn kết thứ nhất là protein gắn kết bắt giữ và protein gắn kết thứ hai là protein gắn kết phát hiện chứa hoặc được liên hợp với yếu tố phát hiện được.

16. Kit theo điểm 15, trong đó ít nhất một trong số protein gắn kết thứ nhất và protein gắn kết thứ hai là kháng thể đơn dòng.

17. Kit theo điểm 15, trong đó protein gắn kết thứ nhất và protein gắn kết thứ hai là kháng thể đơn dòng.

18. Kit theo điểm 15, trong đó protein gắn kết thứ nhất được giữ cố định trên bề mặt rắn.

19. Kit theo điểm 15, trong đó protein gắn kết thứ hai chứa nguyên tử phóng xạ, được liên hợp với phân tử huỳnh quang, hoặc được liên hợp với enzym.

20. Kit theo điểm 14, trong đó protein gắn kết là kháng thể đơn dòng 3H11 được tạo ra bởi tế bào lai 3H11 được nộp lưu tại Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Mỹ (the American Type Culture Collection) với số truy cập là PTA-9374.

Fig.1A

Fig.1B

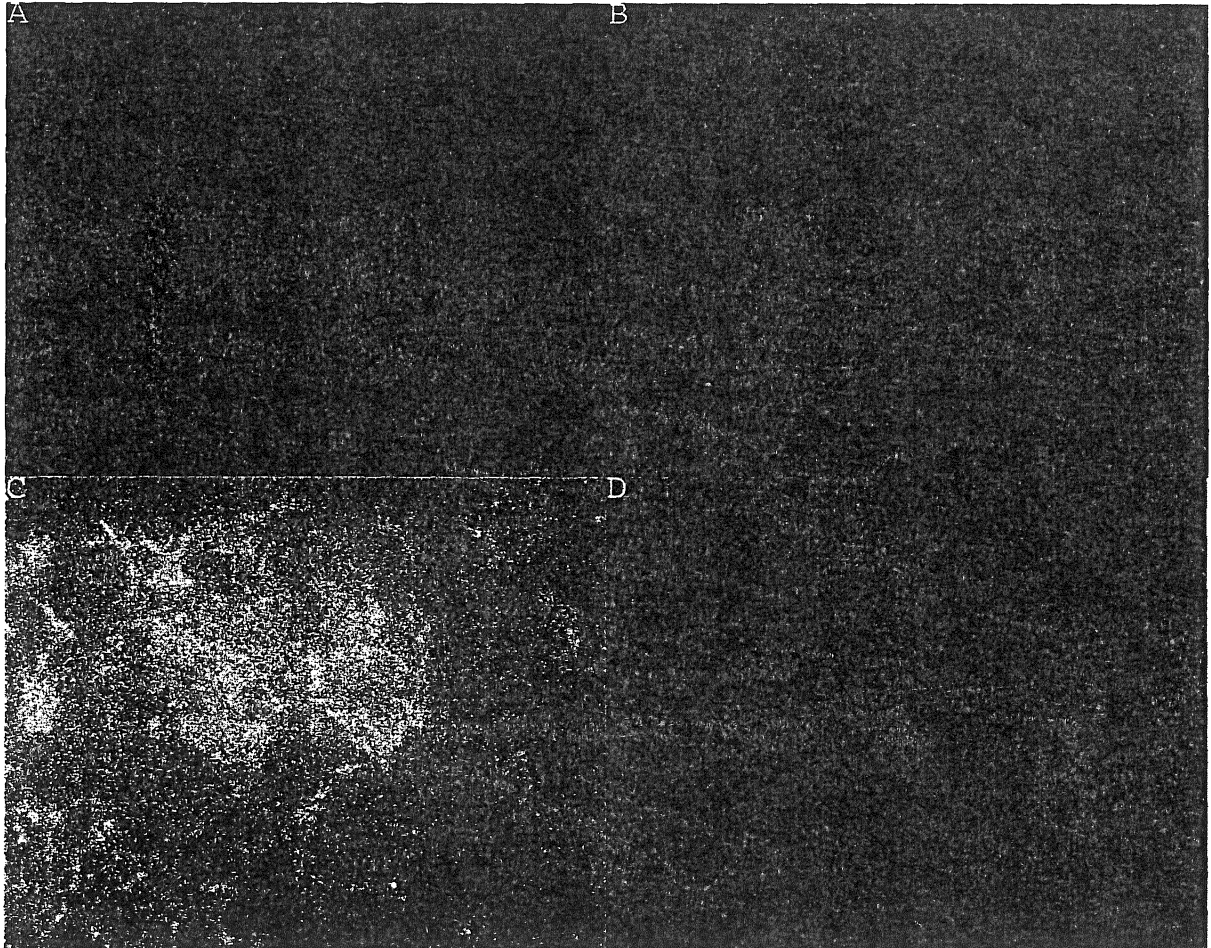


Fig.1C

Fig.1D

Fig.2A

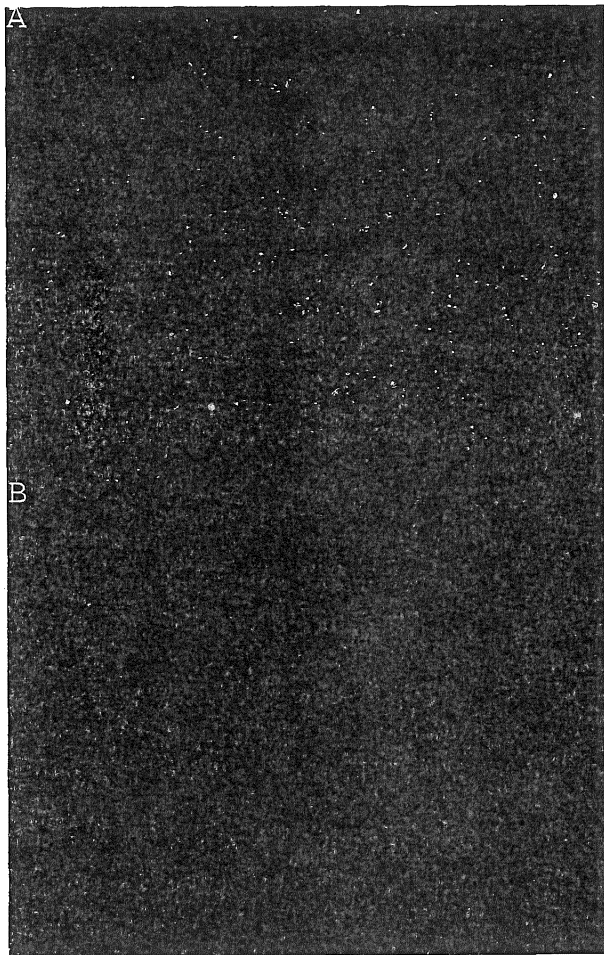


Fig.2B

3 / 7

Fig.3A

Fig.3B

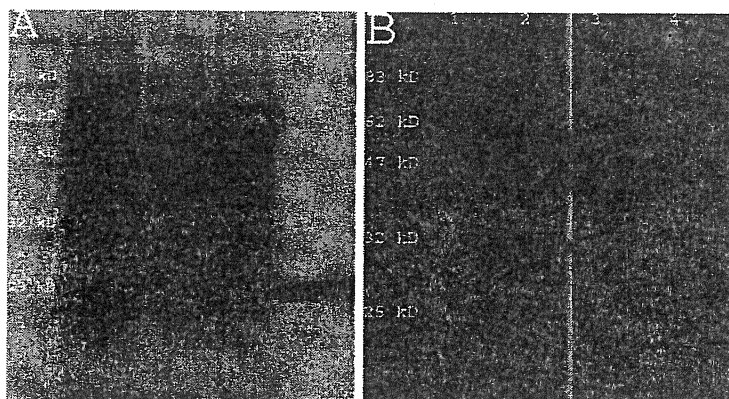


Fig.4A

Thẩm tách
Western bởi 5A5

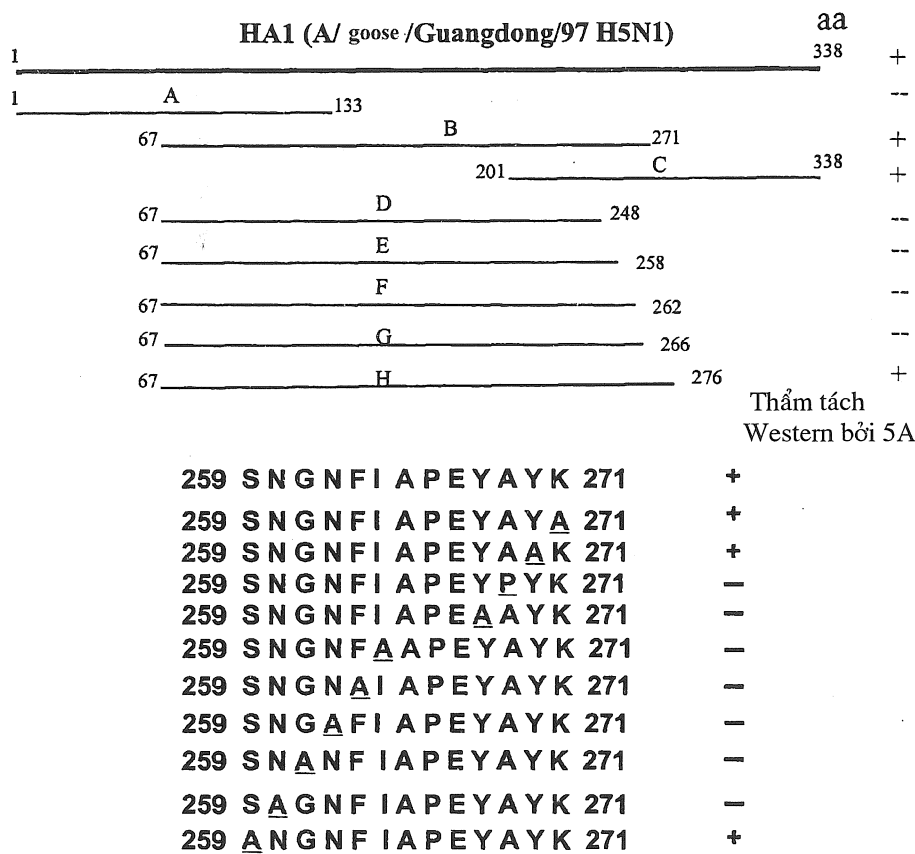


Fig.4B

Fig.5A

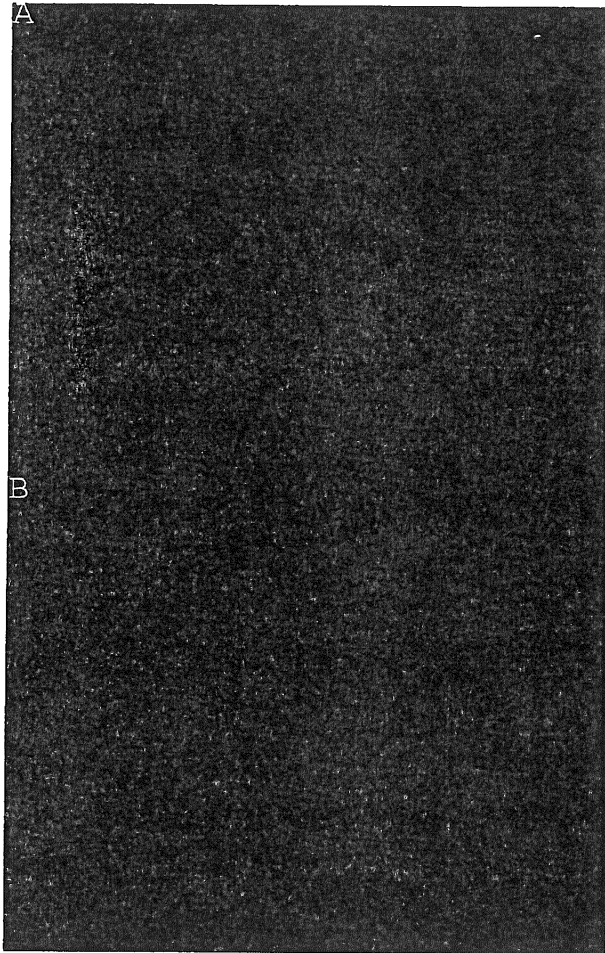
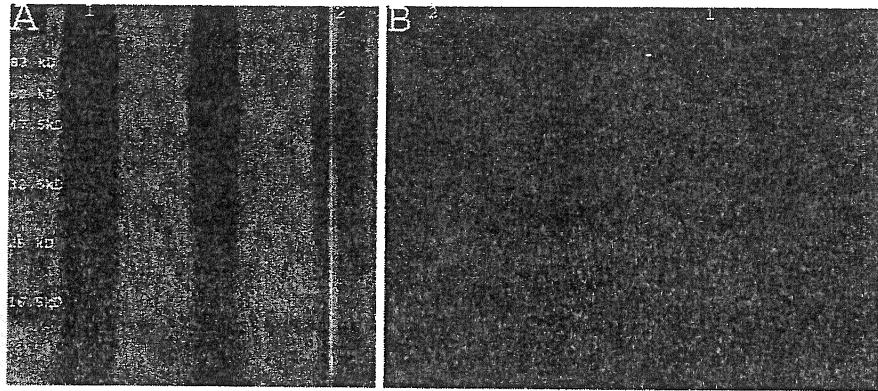


Fig.5B

6 / 7

Fig.6A

Fig.6B



7/7

Fig.7A

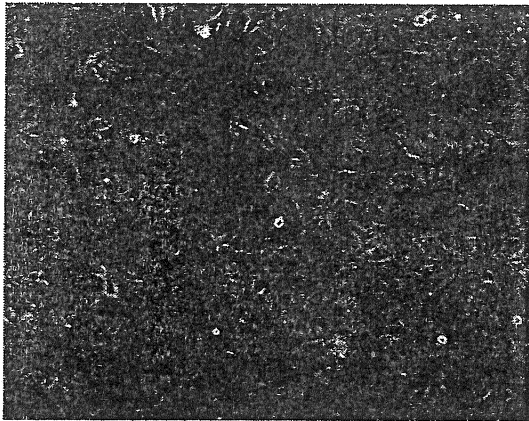


Fig.7B

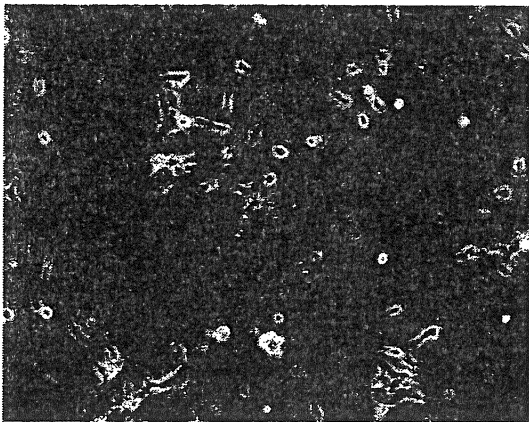


Fig.7C

