



(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)



1-0028718

(51)⁷ A61K 39/155; A61P 31/14

(13) B

(21) 1-2014-03171

(22) 21/03/2013

(86) PCT/EP2013/055935 21/03/2013

(87) WO/2013/139911 26/09/2013

(30) 61/614,429 22/03/2012 US; 12160682.6 22/03/2012 EP

(45) 25/07/2021 400

(43) 25/03/2015 324A

(73) Janssen Vaccines & Prevention B.V. (NL)

Archimedesweg 4, NL-2333 CN Leiden, The Netherlands

(72) RADOSEVIC, Katarina (NL); CUSTERS, Jérôme H.H.V. (NZ); VELLINGA, Jort (NZ); WIDJOJOATMODJO, Myra N. (NZ).

(74) Công ty Cổ phần Sở hữu công nghiệp INVESTIP (INVESTIP)

(54) VACXIN KHÁNG VIRUT HỢP BÀO HÔ HẤP VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT VACXIN NÀY

(57) Sáng chế đề xuất vacxin kháng virus hợp bào hô hấp (RSV), chứa adenovirus tái tổ hợp ở người có kiểu huyết thanh 26 bao gồm axit nucleic mã hóa protein F của RSV hoặc phân hoạt tính miễn dịch học của chúng. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến tế bào chủ được phân lập chứa adenovirus tái tổ hợp ở người có kiểu huyết thanh 26 và phương pháp sản xuất vacxin này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực y học. Cụ thể hơn là, sáng chế đề cập đến vaccin kháng RSV.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Sau khi phát hiện ra virus hợp bào hô hấp (RSV) vào những năm 1950, virus này sớm trở thành tác nhân gây bệnh được công nhận có liên quan đến các ca lây nhiễm đường hô hấp dưới và trên ở người. Trên toàn thế giới, ước tính 64 triệu ca lây nhiễm RSV xảy ra hàng năm làm 160.000 người chết (WHO Acute Respiratory Infections Update September 2009). Bệnh nặng nhất đặc biệt xảy ra ở trẻ sơ sinh đẻ non, người già và người bị suy giảm miễn dịch. Trẻ dưới 2 tuổi, RSV là bệnh lây nhiễm qua đường hô hấp phổ biến nhất, tính xấp xỉ 50% ca nhập viện do bệnh lây nhiễm qua đường hô hấp, và nhập viện nhiều nhất là ở độ tuổi 2-4 tháng. Người ta đã báo cáo rằng hầu hết trẻ em đã bị nhiễm RSV trước hai tuổi. Lây nhiễm lặp lại trong cả cuộc đời là do miễn dịch tự nhiên không có hiệu quả. Mức độ nghiêm trọng, tử vong và mắc bệnh của bệnh RSV ở người già là thứ hai sau các hậu quả gây ra bởi lây nhiễm cúm A không phải bệnh dịch.

RSV là paramyxovirus, thuộc họ phụ pneumovirinae. Bộ gen của nó mã hóa cho nhiều protein khác nhau, bao gồm protein màng được biết là Glycoprotein (G) RSV và protein dung hợp (F) RSV là đích kháng nguyên chính để trung hòa kháng thể. Việc phân cắt protein phân giải của tiền chất protein dung hợp (F0) tạo ra hai polypeptit F1 và F2 liên kết qua cầu disulfit. Các kháng thể kháng phần trung gian dung hợp của protein F1 có thể ngăn ngừa virus xâm nhập vào tế bào và do đó có hiệu quả trung hòa. Bên cạnh là đích để trung hòa kháng thể, RSV F chứa các epitop tế bào T gây độc tế bào (Pemberton *et al* , 1987, *J. Gen. Virol.* 68: 2177-2182).

Các phương pháp điều trị lây nhiễm RSV bao gồm kháng thể đơn dòng kháng protein F của RSV. Chi phí cao liên quan đến kháng thể đơn dòng này và đòi hỏi cho dùng trong môi trường bệnh viện, khiến không thể sử dụng chúng để phòng bệnh ở phạm vi rộng dân cư có nguy cơ. Do đó, có nhu cầu đối với vaccin RSV, mà ưu tiên là có thể được dùng cho trẻ em cũng như cho người già.

Mặc dù đã 50 năm nghiên cứu, vaccin kháng RSV vẫn chưa được cấp phép. Một trở ngại chính đối với sự phát triển vaccin là sự kế thừa của việc tăng cường bệnh do vaccin trong thử nghiệm lâm sàng trong những năm 1960 với vaccin RSV bất hoạt formalin (FI). Trẻ được chủng ngừa FI-RSV không được bảo vệ khỏi lây nhiễm tự nhiên và trẻ đã nhiễm thể hiện trình trạng bệnh nặng hơn trẻ không được chủng ngừa, trong đó có hai trẻ tử vong. Hiện tượng này gọi là ‘bệnh tăng cường’.

Từ thử nghiệm với vaccin FI-RSV, nhiều nghiên cứu khác nhau để tạo ra vaccin RSV đã tiếp tục. Nỗ lực bao gồm các chủng đi qua lạnh giảm sự sống đã biết hoặc các chủng biến thể nhạy nhiệt độ của RSV, (thể khảm) vaccin đơn vị phụ protein, vaccin peptit và protein RSV được biểu hiện từ vector virus tái tổ hợp. Mặc dù một số trong các vaccin này thể hiện dữ liệu tiền lâm sàng hứa hẹn, nhưng không có vaccin nào được cấp phép để dùng cho người do các vấn đề an toàn hoặc thiếu hiệu quả.

Vector adenovirus được sử dụng để điều chế vaccin cho nhiều bệnh khác nhau, bao gồm bệnh liên quan đến ca lây nhiễm RSV. Các phần sau đưa ra các ví dụ về vaccin tuyển chọn RSV trên cơ sở adenovirus đã được mô tả.

Trong một nghiên cứu, RSV.F đã được chèn vào vùng E3 không cơ bản của loại adenovirus sao chép khả biến 4, 5, và 7. Gây miễn dịch ở chuột hại cây bông, áp dụng trong mũi (i.n.) 10^7 pfu, là tạo miễn dịch thích hợp, và bảo vệ kháng thử thách RSV đối với hệ hô hấp dưới, nhưng không bảo vệ kháng thử thách RSV đối với hệ hô hấp trên (Connors *et al* , 1992, *Vaccine* 10: 475-484; Collins, P.L., Prince, G.A., Camargo, E., Purcell, R.H., Chanock, R.M. và Murphy, B.R. Đánh giá hiệu quả bảo vệ của các virus tái tổ hợp bệnh đậu bò và adenovirus biểu hiện glycoprotein virus hợp bào hô hấp. Trong: *Vaccine 90: Modern Approaches to New Vaccines including prevention of AIDS* (Eds. Brown, F., Chanock, R.M., Ginsberg, H. và Lerner, R.A.) Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1990, pp 79-84). Subsequent oral immunization of a chimpanzee was poorly immunogenic (Hsu *et al* , 1992, *J Infect Dis.* 66:769-775).

Trong các nghiên cứu khác (Shao *et al* , 2009, *Vaccine* 27: 5460 - 71; US2011/0014220), hai vector 5 adenovirus tái tổ hợp không khả biến sao chép mang axit nucleic mã hóa phiên bản xuyên màng cắt cụt (rAd-F0ΔTM) hoặc chiều dài đủ (rAd-F0) của protein F của chủng RSV-B1 được thiết kế và được cho qua đường

trong mũi vào chuột BALB/c. Các con vật được khơi mào trong mũi với 10^7 pfu và được tăng cường 28 ngày sau với cùng liều dùng trong mũi. Mặc dù các kháng thể kháng RSV-B1 được trung hòa và phản ứng chéo với chủng RSV-Long và RSV-A2, gây miễn dịch bằng các vectơ này chỉ bảo vệ một phần thử thách sao chép B1 kháng RSV. (Phân) Bảo vệ bằng rAd-F0 Δ TM cao hơn một chút so với bằng rAd-F0.

Trong nghiên cứu khác, quan sát thấy rằng gây miễn dịch trong mũi ở chuột BALB/c bằng 10^{11} hạt virus bằng adenovirus FG-Ad khuyết sao chép (trên cơ sở Ad5) biểu hiện kiểu đại RSV F (FG-Ad-F) làm giảm các độ chuẩn virus ở phổi chỉ 1,5 log 10 so với nhóm đối chứng (Fu *et al* , 2009, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 381: 528-532).

Trong nghiên cứu khác nữa, quan sát thấy rằng adenovector khuyết sao chép trên cơ sở Ad5 tái tổ hợp biểu hiện đơn vị mã được tối ưu đoạn F1 tan được của protein F của RSV A2 được dùng trong mũi (axit amin 155-524) (10^8 PFU) có thể làm giảm sao chép thử thách RSV ở phổi của chuột BALB/c so với chuột đối chứng, nhưng chuột được gây miễn dịch bằng đường trong cơ (tiêm bắp) không biểu hiện bất kỳ bảo vệ nào đối với thử thách (Kim *et al* , 2010, *Vaccine* 28: 3801-3808).

Trong các nghiên cứu khác, adenovector trên cơ sở Ad5 mang đơn vị mã được tối ưu F của RSV chiều dài đủ (AdV-F) hoặc dạng tan được của gen F của RSF (AdV-Fsol) được sử dụng để gây miễn dịch chuột BALB/c hai lần với liều dùng 1×10^{10} OPU (đơn vị phân tử tối ưu: liều dùng 1×10^{10} OPU tương ứng với 2×10^8 GTU (đơn vị truyền tình trạng gen)). Các vectơ này làm giảm mạnh tải virus trong phổi sau khi gây miễn dịch trong mũi, nhưng chỉ một phần sau khi áp dụng dưới da (s.c.) hoặc áp dụng i.m. (Kohlmann *et al* , 2009, *J Virol* 83: 12601-12610; US 2010/0111989).

Trong các nghiên cứu khác nữa, quan sát thấy rằng adenovector sao chép-khuyết trên cơ sở Ad5 tái tổ hợp biểu hiện cADN protein F được tạo trình tự của chủng A2 của RSV được áp dụng trong cơ (10^{10} các đơn vị hạt) có thể làm giảm sao chép thử thách RSV chỉ một phần trong phổi của chuột BALB/c so với chuột đối chứng (Krause *et al* , 2011, *Virology Journal* 8:375-386)

Ngoài việc không hiệu quả hoàn toàn trong nhiều trường hợp, các vaccin RSV dưới đánh giá lâm sàng để sử dụng cho trẻ em và hầu hết các vaccin dưới đánh giá tiền lâm sàng, là các vaccin dùng trong mũi. Ưu điểm quan trọng nhất của chiến lược trong mũi là kích thích trực tiếp miễn dịch của hệ hô hấp cục bộ và loại bỏ tăng cường

bệnh liên quan. Thực vậy, thông thường hiệu quả của ví dụ vaccin tuyển chọn ứng cử kháng RSV trên cơ sở adenovirut thể hiện tốt hơn khi dùng trong mũi so với dùng trong cơ. Tuy nhiên, chủng ngừa trong mũi cũng làm tăng quan ngại về tính an toàn ở trẻ nhỏ dưới 6 tháng. Phản ứng bất lợi phổ biến nhất của các vaccin trong mũi là chảy nước mũi hoặc xung huyết mũi ở mọi độ tuổi. Trẻ sơ sinh phải dùng bình thở ở mũi và do đó phải thở bằng mũi. Do đó, xung huyết mũi ở trẻ nhỏ trong vài tháng tuổi đầu có thể gây trở ngại đối với việc chăm sóc, và trong số ít trường hợp có thể gây ra các vấn đề khó thở.

Hơn 50 kiểu huyết thanh adenovirut ở người khác nhau có được xác định. Trong số đó, kiểu huyết thanh 5 (Ad5) adenovirut đã được nghiên cứu trong lịch sử rộng nhất để sử dụng làm chất mang gen. Tuy nhiên, vectơ adenovirut tái tổ hợp có các kiểu huyết thanh khác nhau có thể làm tăng kết quả khác nhau liên quan đến việc tạo ra đáp ứng miễn dịch và bảo vệ. Ví dụ, WO 2012/021730 mô tả có vectơ adenovirut ở khi kiểu huyết thanh 7 và vectơ adenovirut ở người kiểu huyết thanh 5 mã hóa protein F tạo ra bảo vệ kháng RSV tốt hơn vectơ adenovirut ở người có kiểu huyết thanh 28. Ngoài ra, tính gây miễn dịch khác nhau được quan sát đối với các vectơ trên cơ sở kiểu huyết thanh adenovirut của người hoặc không phải của người (Abbink *et al.* , 2007, *J Virol* 81: 4654-4663; Colloca *et al.* , 2012, *Sci Transl Med* 4, 115ra2). Abbink *et al.* kết luận rằng tất cả vectơ rAd kiểu huyết thanh hiếm ở người được nghiên cứu ít khả năng hơn vectơ rAd5 trong việc không có tính miễn dịch chống Ad5. Gần đây còn được mô tả thêm rằng, trong khi rAd5 có chuyển gen glycoprotein (gp) Ebolavirus (EBOV) đã bảo vệ 100% linh trưởng không phải người, rAd35 và rAd26 với EBOV gp chuyển gen chỉ tạo ra bảo vệ một phần và chiến lược khơi mào-tăng cường khác loại đòi hỏi các vectơ này đạt được bảo vệ toàn diện kháng thử thách virut ebola (Geisbert *et al.* , 2011, *J Virol* 85: 4222-4233). Do đó, trước đây không thể dự đoán tính hiệu quả của vaccin adenovirut tái tổ hợp, chỉ trên cơ sở dữ liệu từ kiểu huyết thanh adenovirut khác.

Tuy nhiên, đối với các vaccin RSV, các thử nghiệm trong các mẫu bệnh thích hợp như chuột hại cây bông cần để xác định xem vaccin tuyển chọn có hiệu quả đủ để phòng ngừa sao chép RSV trong đường mũi và phổi và ở cùng thời điểm là an toàn, cụ thể là không dẫn đến bệnh tăng cường. Ưu tiên là các vaccin tuyển chọn này phải có hiệu quả cao trong các mẫu này, ngay cả cho dùng trong cơ.

Do đó, vẫn có nhu cầu đối với các vaccin hiệu quả và phương pháp chủng ngừa kháng RSV, mà không dẫn đến bệnh tăng cường. Sáng chế nhằm đề xuất vaccin này và phương pháp để chủng ngừa chống RSV theo cách an toàn và hiệu quả.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Ngạc nhiên là các tác giả sáng chế phát hiện ra adenovirut tái tổ hợp có kiểu huyết thanh 26 (Ad26) bao gồm trình tự nucleotit mã hóa protein F của RSV là vaccin kháng RSV rất hiệu quả trong mẫu thử chuột hại cây bông được thiết lập, và đã làm tăng hiệu quả so với dữ liệu được mô tả trước đây cho Ad5 mã hóa RSV F. Điều này chứng minh rằng thậm chí cho dùng riêng, thậm chí qua đường tiêm bắp, Ad26 mã hóa RSV F cũng đủ để tạo ra sự bảo vệ toàn diện chống lại sao chép RSV thử thách.

Sáng chế đề xuất vaccin kháng virut hợp bào hô hấp (RSV), chứa adenovirut tái tổ hợp ở người có kiểu huyết thanh 26 bao gồm axit nucleic mã hóa protein F của RSV hoặc đoạn của chúng.

Theo một số phương án, adenovirut tái tổ hợp bao gồm axit nucleic mã hóa protein F của RSV bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1.

Theo một số phương án, axit nucleic mã hóa protein F của RSV là đơn vị mã được tối ưu để biểu hiện trong tế bào của người.

Theo một số phương án, axit nucleic mã hóa protein F của RSV bao gồm trình tự axit nucleic của SEQ ID NO: 2.

Theo một số phương án, adenovirut tái tổ hợp ở người có loại bỏ trong vùng E1, loại bỏ trong vùng E3, hoặc loại bỏ trong cả hai vùng E1 và E3 của bộ gen adenovirut.

Theo một số phương án, adenovirut tái tổ hợp có bộ gen bao gồm ở đầu tận cùng 5' trình tự CTATCTAT.

Sáng chế còn mô tả phương pháp chủng ngừa cho đối tượng kháng RSV, phương pháp bao gồm cho đối tượng dùng vaccin theo sáng chế.

Theo một số phương án, vaccin được cho dùng qua đường tiêm bắp.

Theo một số phương án, vaccin theo sáng chế được cho đối tượng dùng nhiều hơn một lần.

Theo một số phương án, phương pháp chủng ngừa cho đối tượng chống RSV còn bao gồm cho đối tượng dùng vaccin chứa adenovirut tái tổ hợp ở người có kiểu huyết thanh 35 bao gồm axit nucleic mã hóa protein F của RSV hoặc đoạn của chúng.

Theo một số phương án, phương pháp chủng ngừa cho đối tượng chống RSV còn bao gồm dùng protein F của RSV (ưu tiên là được bào chế dưới dạng chế phẩm được, do đó là vaccin protein) cho đối tượng.

Theo một số phương án, phương pháp chủng ngừa bao gồm dùng liều đơn vaccin cho đối tượng.

Sáng chế còn mô tả phương pháp làm giảm lây nhiễm và/hoặc sao chép RSV trong, ví dụ đường mũi và phổi của, đối tượng, bao gồm cho đối tượng dùng bằng cách tiêm trong cơ chế phẩm chứa adenovirut tái tổ hợp ở người có kiểu huyết thanh 26 bao gồm axit nucleic mã hóa protein F của RSV hoặc đoạn của chúng. Điều này sẽ làm giảm tác dụng có hại gây ra do lây nhiễm RSV ở đối tượng, và do đó góp phần bảo vệ đối tượng chống tác dụng có hại này nhờ cho dùng vaccin. Theo một số phương án, tác dụng có hại của lây nhiễm RSV có thể cơ bản được phòng ngừa, cụ thể là làm giảm đến mức thấp đến nỗi chúng không liên quan đến lâm sàng. Adenovirut tái tổ hợp có thể dưới dạng vaccin theo sáng chế, bao gồm các phương án được mô tả ở trên.

Sáng chế còn đề xuất tế bào chủ được phân lập chứa adenovirut tái tổ hợp ở người có kiểu huyết thanh 26 bao gồm axit nucleic mã hóa protein F của RSV hoặc đoạn của chúng.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp sản xuất vaccin kháng virus hợp bào hô hấp (RSV), bao gồm tạo ra adenovirut tái tổ hợp ở người có kiểu huyết thanh 26 bao gồm axit nucleic mã hóa protein F của RSV hoặc đoạn của chúng, nhân lên adenovirut tái tổ hợp này trong môi trường nuôi cấy của tế bào chủ, phân lập và tinh sạch adenovirut tái tổ hợp, và bào chế adenovirut tái tổ hợp trong chế phẩm được dụng. Adenovirut tái tổ hợp ở người theo khía cạnh này có thể còn là bất kỳ trong số các adenovirut được mô tả theo các phương án ở trên.

Sáng chế còn đề xuất axit nucleic tái tổ hợp được phân lập mà tạo ra bộ gen của adenovirut tái tổ hợp ở người có kiểu huyết thanh 26 bao gồm axit nucleic mã hóa protein F của RSV hoặc đoạn của chúng. Adenovirut có thể còn là bất kỳ trong số các adenovirut như được mô tả theo các phương án ở trên.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG. 1 thể hiện đáp ứng miễn dịch tế bào kháng peptit F chồng lần aa 1-252 của F và peptit F chồng lần aa 241-574 của F của chuột được gây miễn dịch bằng các liều dùng khác nhau của các vectơ trên cơ sở rAd26 (A) và rAd35 (B) chứa gen F của RSV ở 2 và 8 tuần sau khi được gây miễn dịch

FIG. 2 thể hiện đáp ứng của kháng thể kháng RSV ở chuột được gây miễn dịch bằng các liều dùng khác nhau của các vectơ trên cơ sở rAd26 và rAd35 chứa gen F của RSV ở 2 và 8 tuần sau khi được gây miễn dịch.

FIG. 3 thể hiện các kết quả về tỷ lệ của đáp ứng của kháng thể IgG2a so với IgG 1 kháng RSV ở chuột được gây miễn dịch bằng 10^{10} vp các vectơ trên cơ sở rAd26 và rAd35 chứa gen F của RSV ở 8 tuần sau khi được gây miễn dịch

FIG. 4 thể hiện khả năng trùng hòa virus kháng RSV Long ở chuột được gây miễn dịch bằng các liều dùng khác nhau của rAd26 (A) và rAd35 (B) các vectơ trên cơ sở chứa gen F của RSV ở 2 và 8 tuần sau khi được gây miễn dịch.

FIG. 5 thể hiện đáp ứng miễn dịch tế bào kháng peptit F (A) chồng lần aa 1-252 của F và peptit F (B) chồng lần aa 241-574 của F ở chuột được gây miễn dịch khơi mào tăng cường bằng các vectơ trên cơ sở rAd26 và rAd35 chứa gen F của RSV ở 6 và 12 tuần sau khi được gây miễn dịch.

FIG. 6 thể hiện đáp ứng của kháng thể kháng RSV ở chuột được gây miễn dịch khơi mào tăng cường bằng các vectơ trên cơ sở rAd26 và rAd35 chứa gen F của RSV ở các thời điểm khác nhau sau khi gây miễn dịch lần thứ nhất.

FIG. 7 thể hiện khả năng trùng hòa virus kháng RSV Long trong huyết thanh chuột được gây miễn dịch khơi mào tăng cường bằng các liều dùng khác nhau của các vectơ trên cơ sở rAd26 và rAd35 chứa gen F của RSV ở các thời điểm khác nhau sau gây miễn dịch lần thứ nhất.

FIG. 8 thể hiện khả năng trùng hòa virus kháng RSV B1 ở chuột được gây miễn dịch khơi mào tăng cường bằng các liều dùng khác nhau của các vectơ trên cơ sở rAd26 và rAd35 chứa gen F của RSV ở các thời điểm khác nhau sau gây miễn dịch lần thứ nhất.

FIG. 9 thể hiện A) độ chuẩn phổi RSV và B) độ chuẩn mũi RSV ở chuột hại cây bông sau gây miễn dịch khơi mào tăng cường bằng các liều dùng khác nhau của các vector trên cơ sở rAd26 và rAd35 chứa gen F của RSV ở 5 ngày sau thử thách.

FIG. 10 thể hiện giảm độ chuẩn trung hòa virus sau gây miễn dịch khơi mào tăng cường bằng các liều dùng khác nhau của các vector trên cơ sở rAd26 và rAd35 chứa gen F của RSV ở A) 28 ngày, và B) 49 ngày sau gây miễn dịch lần thứ nhất.

FIG. 11 thể hiện xét nghiệm mô bệnh học của phổi của chuột hại cây bông ở ngày hiến sau gây miễn dịch khơi mào tăng cường bằng các liều dùng khác nhau của các vector trên cơ sở rAd26 và rAd35 chứa gen F của RSV.

FIG. 12 thể hiện A) độ chuẩn phổi RSV và B) độ chuẩn mũi RSV ở chuột hại cây bông sau gây miễn dịch liều đơn bằng các liều dùng khác nhau của các vector trên cơ sở rAd26 và rAd35 chứa gen F của RSV ở 5 ngày sau thử thách, được cho dùng qua các đường khác nhau.

FIG. 13 thể hiện độ chuẩn trung hòa virus giảm sau gây miễn dịch liều đơn bằng các liều dùng khác nhau của các vector trên cơ sở rAd26 và rAd35 chứa gen F của RSV ở 28 và 49 ngày sau gây miễn dịch lần thứ nhất, được cho dùng qua các đường khác nhau.

FIG. 14 thể hiện xét nghiệm mô bệnh học của phổi của chuột hại cây bông ở ngày hiến sau gây miễn dịch liều đơn (tiêm bắp) bằng các liều dùng khác nhau của các vector trên cơ sở rAd26 và rAd35 chứa gen F của RSV ở ngày hiến.

FIG. 15 thể hiện bản đồ plasmid bao gồm đầu trái của bộ gen của Ad35 và Ad26 với trình tự mã hóa RSV F:

A. pAdApt35BSU.RSV.F(A2)nat, và B. pAdApt26.RSV.F(A2)nat

FIG. 16 thể hiện A) độ chuẩn phổi RSV và B) độ chuẩn mũi RSV ở chuột hại cây bông sau gây miễn dịch liều đơn ở ngày 0 hoặc ngày 28 bằng các liều dùng khác nhau của các vector trên cơ sở rAd26 chứa gen F của RSV ở 5 ngày sau thử thách. Thử thách là ở ngày 49.

FIG. 17 thể hiện giảm độ chuẩn trung hòa virus sau gây miễn dịch liều đơn bằng các liều dùng khác nhau của rAd26 chứa gen F của RSV ở 49 ngày sau gây miễn dịch như được mô tả cho FIG16.

FIG. 18 thể hiện giảm độ chuẩn trung hòa virus sau gây miễn dịch liều đơn bằng các liều dùng khác nhau của rAd26 chứa gen F của RSV trong thời gian sau gây miễn dịch

FIG. 19 thể hiện độ chuẩn VNA 49 ngày sau kháng RSV Long và RSV Bwash bằng huyết thanh chiết xuất từ chuột hại cây bông được gây miễn dịch bằng 10^{10} Ad-RSV F hoặc không chuyển gen (Ad-e). PB: khơi mào tăng cường.

FIG. 20 thể hiện độ chuẩn phổi RSV ở chuột hại cây bông sau gây miễn dịch liều đơn ở ngày 0 bằng các liều dùng khác nhau của các vector trên cơ sở rAd26 chứa gen F của RSV ở 5 ngày sau thử thách bằng RSV A2 hoặc RSV B15/97.

FIG. 21 thể hiện độ chuẩn mũi RSV ở chuột hại cây bông sau gây miễn dịch liều đơn ở ngày 0 bằng các liều dùng khác nhau của các vector trên cơ sở rAd26 chứa gen F của RSV ở 5 ngày sau thử thách bằng RSV A2 hoặc RSV B15/97.

FIG. 22 thể hiện độ chuẩn VNA trong huyết thanh chuột hại cây bông sau gây miễn dịch liều đơn ở ngày 0 bằng các liều dùng khác nhau của các vector trên cơ sở rAd26 chứa gen F của RSV ở các thời điểm khác nhau sau khơi mào.

FIG. 23 thể hiện độ chuẩn phổi RSV ở chuột hại cây bông sau gây miễn dịch liều đơn ở ngày 0 bằng các liều dùng khác nhau của các vector trên cơ sở rAd26 chứa gen F của RSV ở 5 ngày sau thử thách bằng liều dùng tiêu chuẩn (10^5) hoặc liều cao (5×10^5) RSV A2.

FIG. 24 thể hiện độ chuẩn mũi RSV ở chuột hại cây bông sau gây miễn dịch liều đơn ở ngày 0 bằng các liều dùng khác nhau của các vector trên cơ sở rAd26 chứa gen F của RSV ở 5 ngày sau thử thách với thử thách bằng liều dùng tiêu chuẩn (10^5) hoặc liều cao (5×10^5) RSV A2.

FIG. 25 thể hiện độ chuẩn phổi RSV ở chuột hại cây bông sau gây miễn dịch ở ngày 0 và 28 bằng các liều dùng khác nhau của gây miễn dịch đơn hoặc gây miễn dịch khơi mào tăng cường bằng các vector trên cơ sở rAd26 chứa gen F của RSV ở 5 ngày sau thử thách, với thử thách được thực hiện 210 ngày sau gây miễn dịch.

FIG. 26 thể hiện độ chuẩn VNA của huyết thanh chuột hại cây bông sau gây miễn dịch liều đơn và gây miễn dịch khơi mào tăng cường ở 140 ngày sau gây miễn dịch

FIG. 27 thể hiện xét nghiệm mô bệnh học của phổi của chuột hại cây bông hiến sau gây miễn dịch đơn hoặc gây miễn dịch khơi mào tăng cường bằng các liều

dùng khác nhau của các vectơ trên cơ sở rAd26 chứa gen F của RSV ở 2 ngày sau thử thách. Các chấm thể hiện trung vị và râu giá trị bách phân thứ 25 và 75.

FIG. 28 thể hiện xét nghiệm mô bệnh học của phổi của chuột hại cây bông hiên sau gây miễn dịch đơn hoặc gây miễn dịch khơi mào tăng cường bằng các liều dùng khác nhau của các vectơ trên cơ sở rAd26 chứa gen F của RSV ở 6 ngày sau thử thách. Các chấm thể hiện trung vị và râu giá trị bách phân thứ 25 và 75.

FIG. 29 thể hiện giảm độ chuẩn trung hòa virus sau gây miễn dịch bằng rAd26 chứa gen F của RSV (Ad26.RSV.F) sau đó tăng cường bằng Ad26.RSV.F hoặc bằng protein bổ trợ F của RSV (sau F).

FIG. 30 thể hiện giảm kháng thể IgG2a và IgG1, và tỷ lệ ở đây, sau gây miễn dịch bằng Ad26.RSV.F sau đó tăng cường bằng Ad26.RSV.F hoặc tăng cường bằng protein bổ trợ F của RSV (sau F).

FIG. 31 thể hiện tạo ra IFN-g bởi các tế bào đơn nhân lách sau gây miễn dịch bằng Ad26.RSV.F sau đó tăng cường bằng Ad26.RSV.F hoặc bằng protein bổ trợ F của RSV (sau F).

Mô tả chi tiết sáng chế

Thuật ngữ ‘tái tổ hợp’ đối với adenovirus, như được sử dụng ở đây nghĩ là nó được biến đổi bởi bàn tay con người, ví dụ ít sửa đổi đầu tận cùng được tách dòng hoạt tính trong đó và/hoặc chứa gen khác loài, cụ thể là không phải là adenovirus kiểu dại có tự nhiên.

Trình tự ở đây được cho hướng từ 5’ đến 3’ direction, như đã biết trong lĩnh vực.

“Protein vỏ ngoài của adenovirus” đề cập đến protein trên lớp vỏ ngoài của adenovirus tham gia vào việc xác định kiểu huyết thanh và/hoặc tính hướng kích thích của adenovirus cụ thể. Protein vỏ ngoài của adenovirus chủ yếu bao gồm protein sợi, penton và/hoặc hexon. Adenovirus của (hoặc ‘trên cơ sở’) kiểu huyết thanh nhất định theo sáng chế chủ yếu bao gồm protein sợi, penton và/hoặc hexon của kiểu huyết thanh nhất định đó, và ưu tiên là bao gồm protein sợi, penton và/hoặc hexon của kiểu huyết thanh nhất định đó. Các protein này chủ yếu được mã hóa bởi bộ gen của adenovirus tái tổ hợp. Adenovirus tái tổ hợp của kiểu huyết thanh nhất định có thể tùy ý bao gồm và/hoặc mã hóa các protein khác từ các kiểu huyết thanh adenovirus khác.

Do đó, như một ví dụ không giới hạn, adenovirut tái tổ hợp mà chứa hexon, penton và sợi của được coi là adenovirut tái tổ hợp trên cơ sở Ad26.

Adenovirut tái tổ hợp 'trên cơ sở' adenovirut như được sử dụng ở đây, được dẫn xuất từ kiểu đại, ít nhất trong trình tự. Điều này có thể được thực hiện bằng cách tách dòng phân tử, sử dụng bộ gen kiểu đại hoặc các phần của chúng làm vật liệu khởi đầu. Có thể sử dụng trình tự đã biết của bộ gen adenovirut kiểu đại để tạo ra (các phần của) bộ gen đột biến mới bằng cách tổng hợp ADN, mà có thể thực hiện bằng các quy trình thông thường bởi các công ty dịch vụ có kinh doanh trong lĩnh vực tổng hợp ADN và/hoặc tách dòng phân tử (ví dụ GeneArt, Invitrogen, GenScripts, Eurofins).

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực hiểu rằng nhiều polynucleotit và axit nucleic khác nhau có thể mã hóa polypeptit giống nhau do sự thoái hóa của mã hóa gen. Cần hiểu rằng người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể, sử dụng các kỹ thuật thông thường, tạo ra sự thể nucleotit mà không ảnh hưởng trình tự polypeptit được mã hóa bởi polynucleotit được mô tả từ đó phản ánh việc sử dụng đơn vị mã của sinh vật chủ cụ thể bất kỳ trong đó polypeptit là được biểu hiện. Do đó, trừ khi có chỉ dẫn khác, "trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin" bao gồm tất cả trình tự nucleotit mà là các phiên bản thoái hóa của mỗi cái khác và mã hóa trình tự axit amin giống nhau. Trình tự nucleotit mã hóa protein và ARN có thể bao gồm intron.

Theo một phương án ưu tiên, axit nucleic mã hóa protein F của RSV hoặc đoạn của chúng là đơn vị mã được tối ưu để biểu hiện trong tế bào của động vật có vú, như tế bào của người. Phương pháp tối ưu hóa đơn vị mã là đã biết và đã được mô tả trước đây (ví dụ WO 96/09378). Ví dụ của trình tự tối ưu hóa đơn vị mã đặc hiệu của protein F của RSV được mô tả trong SEQ ID NO: 2 của EP 2102345 B1.

Theo một phương án, protein F của RSV là từ chủng RSV A2, và có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1. Theo một phương án được đặc biệt ưu tiên, axit nucleic mã hóa protein F của RSV bao gồm trình tự axit nucleic của SEQ ID NO: 2. Tác giả sáng chế phát hiện ra rằng phương án này tạo ra biểu hiện ổn định và vacxin theo phương án này cho phép bảo vệ đối với sao chép RSV trong đường mũi và phổi ngay cả sau liều đơn được dùng qua đường tiêm bắp.

Thuật ngữ "đoạn" như được sử dụng ở đây đề cập đến peptit có sự loại gốc amin và/hoặc gốc carboxy và/hoặc bên trong, nhưng khi trình tự axit amin còn lại giống với các vị trí tương ứng trong trình tự của protein F của RSV, ví dụ, trình tự chiều dài đủ của protein F của RSV. Đáng lưu ý là để tạo ra đáp ứng miễn dịch và nói chung để chủng ngừa, protein không cần chiều dài đủ hoặc có các chức năng của kiểu đại, và các đoạn của protein có tác dụng tương tự. Thật vậy, các đoạn của protein F của RSV tương tự F1 hoặc F tan được được biểu hiện có hiệu quả trong việc tạo ra đáp ứng miễn dịch tương tự F chiều dài đủ (Shao *et al* , 2009, *Vaccine* 27: 5460-71, Kohlmann *et al* , 2009, *J Virol* 83: 12601-12610). Sự kết hợp của các đoạn F-protein tương ứng với axit amin 255-278 hoặc 412-524 vào việc tạo miễn dịch hoạt tính làm tạo ra trung hòa kháng thể và một số bảo vệ kháng thử thách RSV (Sing *et al* , 2007, *Virol. Immunol.* 20, 261-275; Sing *et al* , 2007, *Vaccine* 25, 6211-6223).

Đoạn theo sáng chế là đoạn hoạt tính miễn dịch học, và chủ yếu bao gồm ít nhất 15 axit amin, hoặc ít nhất 30 axit amin, của protein F của RSV. Theo một số phương án, ít bao gồm ít nhất 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, hoặc 550 axit amin, của protein F của RSV.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ hiểu rằng các thay đổi có thể thực hiện với protein, ví dụ bằng cách thế, loại, thêm axit amin, v.v., ví dụ bằng các quy trình sinh học phân tử thông thường. Thông thường, thế axit amin bảo thủ có thể được áp dụng mà không làm mất chức năng hoặc tính gây miễn dịch của polypeptit. Điều này có thể được kiểm tra dễ dàng theo các quy trình thông thường đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực.

Thuật ngữ "vacxin" đề cập đến tác nhân hoặc chế phẩm chứa thành phần hoạt tính có tác dụng làm giảm độ gây miễn dịch chữa bệnh ở đối tượng chống lại mầm bệnh hoặc bệnh nhất định. Theo sáng chế, vacxin bao gồm lượng có hiệu quả của adenovirut tái tổ hợp mã hoá protein F của RSV, hoặc đoạn kháng nguyên của chúng, mà tạo ra đáp ứng miễn dịch kháng protein F của RSV. Sáng chế đề xuất phương pháp phòng ngừa bệnh đường hô hấp thấp nghiêm trọng dẫn đến việc nằm viện và làm giảm tần suất biến chứng như viêm phổi và viêm tiểu phế quản do lây nhiễm và sao chép RSV ở đối tượng. Do đó, sáng chế còn đề xuất phương pháp phòng ngừa hoặc làm giảm bệnh đường hô hấp thấp nghiêm trọng, phòng ngừa hoặc làm giảm (ví dụ rút ngắn) việc nằm viện, và/hoặc làm giảm tần suất và/hoặc tính nghiêm trọng của

viêm phổi hoặc viêm tiểu phế quản gây ra bởi RSV ở đối tượng, bao gồm cho đối tượng dùng bằng cách tiêm trong cơ chế phẩm chứa adenovirut tái tổ hợp ở người có kiểu huyết thanh 26 bao gồm axit nucleic mã hóa protein F của RSV hoặc đoạn của chúng. Thuật ngữ “vacxin” theo sáng chế nghĩa là chế phẩm được, và do đó chủ yếu bao gồm chất pha loãng được dụng, chất mang hoặc tá dược. Có thể hoặc không bao gồm các thành phần hoạt tính khác. Theo một số phương án có thể là vacxin tổ hợp còn bao gồm các thành phần khác làm giảm đáp ứng miễn dịch, ví dụ kháng các protein khác của RSV và/hoặc kháng các tác nhân gây nhiễm khác.

Vector theo sáng chế là adenovirut tái tổ hợp, còn gọi là vector adenovirut tái tổ hợp. Điều chế vector adenovirut tái tổ hợp là đã biết trong lĩnh vực.

Theo một số phương án, vector adenovirut theo sáng chế là thiếu trong ít nhất một chức năng gen cơ bản của vùng E1, ví dụ vùng E1a và/hoặc vùng E1b, của bộ gen adenovirut mà cần để sao chép virut. Theo một số phương án, vector adenovirut theo sáng chế là thiếu trong ít nhất phần của vùng E3 không cơ bản. Theo một số phương án, vector là thiếu trong ít nhất một chức năng gen cơ bản của vùng E1 và ít nhất phần của vùng E3 không cơ bản. Vector adenovirut có thể là "thiếu hụt gấp bội," nghĩa là vector adenovirut là thiếu trong một hoặc nhiều chức năng gen cơ bản trong mỗi vùng hai hoặc nhiều vùng của bộ gen adenovirut. Ví dụ, vector adenovirut thiếu E1- hoặc E1-, thiếu E3- có thể còn thiếu trong ít nhất một gen cơ bản của vùng E4 và/hoặc ít nhất một gen cơ bản của vùng E2 (ví dụ, vùng E2A và/hoặc vùng E2B).

Vector adenovirut, phương pháp để xây dựng chúng và phương pháp để nhân lên chúng, đã biết trong lĩnh vực và được mô tả trong, ví dụ, Patent Mỹ số 5,559,099, 5,837,511, 5,846,782, 5,851,806, 5,994,106, 5,994,128, 5,965,541, 5,981,225, 6,040,174, 6,020,191, và 6,113,913, và Thomas Shenk, "Adenoviridae and their Replication", M. S. Horwitz, "Adenoviruses", Chương 67 và 68, tương ứng, trong *Virology*, B. N. Fields *et al.*, eds., tái bản lần thứ 3, Raven Press, Ltd., New York (1996), và các tài liệu khác được đề cập ở đây. Cơ bản là, việc xây dựng vector adenovirut liên quan đến việc sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử tiêu chuẩn, như các kỹ thuật được mô tả trong, ví dụ, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, Laboratory Manual*, tái bản lần thứ 2, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), Watson *et al.*, *Recombinant DNA*, tái bản lần thứ 2, Scientific American

Books (1992), và Ausubel *et al* ., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, NY (1995), và các tài liệu khác được đề cập ở đây.

Theo sáng chế, adenovirut là adenovirut ở người có kiểu huyết thanh 26. Vaccin theo sáng chế trên cơ sở kiểu huyết thanh này cũng như các vectơ trên cơ sở Ad35 cho thấy một cách ngạc nhiên là có tiềm năng hơn loại được mô tả trong lĩnh vực kỹ thuật mà trên cơ sở Ad5, do chúng không tạo ra bảo vệ toàn diện kháng sao chép thử thách RSV sau khi cho dùng riêng lẻ trong cơ (Kim *et al* , 2010, Vaccin 28: 3801-3808; Kohlmann *et al* , 2009, *J Virol* 83: 12601-12610; Krause *et al* , 2011, *Virology Journal* 8:375). Kiểu huyết thanh theo sáng chế thông thường còn có tỷ suất lưu hành huyết thanh thấp và/hoặc các độ chuẩn kháng thể trung hòa tồn tại trước thấp trong quần thể người. Vectơ adenovirut tái tổ hợp của kiểu huyết thanh này và của Ad35 chuyển gen khác nhau được đánh giá trong các thử nghiệm lâm sàng, và do đó còn thể hiện để có đặc tính an toàn tuyệt vời. Điều chế vectơ rAd26 được mô tả, ví dụ, trong WO 2007/104792 và trong Abbink *et al* ., (2007) *Virol* 81(9): 4654-63. Trình tự bộ gen ví dụ của Ad26 được thấy trong GenBank Accession EF 153474 và trong SEQ ID NO:1 của WO 2007/104792. Điều chế rAd35 vectơ được mô tả, ví dụ, trong Patent Mỹ số 7,270,811, trong WO 00/70071, và trong Vogels *et al* ., (2003) *J Virol* 77(15): 8263-71. Trình tự bộ gen ví dụ của Ad35 được thấy trong GenBank Accession AC_000019 và trên Fig. 6 của WO 00/70071.

Adenovirut tái tổ hợp theo sáng chế có thể là sao chép-khả biến hoặc sao chép-khuyết.

Theo một số phương án, adenovirut là sao chép khuyết, ví dụ do nó có sự loại bỏ trong vùng E1 của bộ gen. Như đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực, trong trường hợp loại bỏ vùng cơ bản từ bộ gen adenovirut, các chức năng được mã hóa bởi các vùng này phải được cho ở trans, ưu tiên là bởi tế bào tạo, cụ thể là khi các phần hoặc toàn bộ các vùng E1, E2 và/hoặc E4 được loại bỏ khỏi adenovirut, chúng phải có mặt trong tế bào tạo, ví dụ được tích hợp trong bộ gen của chúng, hoặc ở dạng gọi là adenovirut trợ giúp hoặc plasmid trợ giúp. Adenovirut còn có thể có loại bỏ trong vùng E3, không cần để sao chép, và do đó loại bỏ này không phải bổ sung.

Tế bào tạo (đôi khi còn được gọi trong lĩnh vực và ở đây là ‘tế bào đóng gói’ hoặc ‘tế bào bổ sung’ hoặc ‘tế bào chủ’) mà có thể được sử dụng có thể là tế bào tạo bất kỳ trong đó adenovirut mong muốn có thể được lai tạo. Ví dụ, việc lai tạo vector adenovirut tái tổ hợp được thực hiện trong tế bào tạo mà bổ sung các khuyết trong adenovirut. Các tế bào tạo này ưu tiên là có trong bộ gen của chúng ít nhất trình tự E1 adenovirut, và do đó có khả năng bổ sung adenovirut tái tổ hợp với loại bỏ trong vùng E1. Bất kỳ tế bào tạo bổ sung E1 có thể được sử dụng, như tế bào vồng mạc của người được làm bất tử bởi E1, ví dụ các tế bào 911 hoặc PER.C6 (xem Patent Mỹ 5,994,128), amnioxyt biến đổi E1 (xem Patent Châu Âu 1230354), các tế bào A549 biến đổi E1 (xem ví dụ WO 98/39411, Patent Mỹ 5,891,690), GH329:HeLa (Gao et al , 2000, *Human Gene Therapy* 11: 213-219), 293, và tương tự. Theo một số phương án, các tế bào tạo ví dụ là tế bào HEK293, hoặc tế bào PER.C6, hoặc tế bào 911, hoặc tế bào IT293SF, và tương tự.

Đối với các adenovirut khuyết E1 không phải nhóm phụ C như Ad35 (nhóm phụ B) hoặc Ad26 (nhóm phụ D), được ưu tiên là để trao đổi trọn vẹn mã hóa E4-orf6 của các adenovirut không phải nhóm phụ C này với E4-orf6 của adenovirut của nhóm phụ C như Ad5. Điều này cho phép lây truyền các adenovirut này trong các dòng tế bào bổ sung đã biết mà biểu hiện gen E1 của Ad5, như ví dụ tế bào 293 hoặc tế bào PER.C6 (xem, ví dụ Havenga *et al* , 2006, *J. Gen. Virol.* 87: 2135-2143; WO 03/104467, được kết hợp toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn). Theo một số phương án, adenovirut có thể sử dụng là adenovirut của người có kiểu huyết thanh 35, với loại bỏ trong vùng E1 mà axit nucleic mã hóa protein F của kháng nguyên RSV được tách dòng vào đó, và với vùng E4 orf6 của Ad5. Theo một số phương án, adenovirut trong chế phẩm vacxin theo sáng chế là adenovirut của người có kiểu huyết thanh 26, với loại bỏ trong vùng E1 mà axit nucleic mã hóa protein F của kháng nguyên RSV được tách dòng vào đó, và với vùng E4 orf6 của Ad5.

Theo các phương án tùy ý khác, không cần đặt vùng E4orf6 khác loại (ví dụ của Ad5) trong vector adenovirut, nhưng thay vào đó vector không phải nhóm phụ C khuyết E1 được lai tạo trong dòng tế bào biểu hiện cả E1 và E4orf6 tương hợp, ví dụ dòng tế bào 293-ORF6 biểu hiện cả E1 và E4orf6 từ Ad5 (xem ví dụ Brough *et al* , 1996, *J Virol* 70: 6497-501 mô tả sự hình thành của tế bào 293-ORF6; Abrahamsen *et al* , 1997, *J Virol* 71: 8946-51 và Nan *et al* , 2003, *Gene Therapy* 10: 326-36 mỗi tài

liệu mô tả sự hình thành của E1 loại bỏ vectơ adenovirut không phải nhóm phụ C sử dụng dòng tế bào này).

Tùy ý, tế bào bổ sung biểu hiện E1 từ kiểu huyết thanh mà để được lai tạo có thể được sử dụng (xem ví dụ WO 00/70071, WO 02/40665).

Đối với adenovirut nhóm phụ B, như Ad35, có loại bỏ trong vùng E1, ưu tiên là giữ lại đầu 3' của khung đọc mở E1B 55K trong adenovirut, ví dụ phía dòng ngược trực tiếp 166 bp của khung đọc mở pIX hoặc đoạn bao gồm chúng như dòng ngược trực tiếp đoạn 243 bp của đơn vị mã khởi đầu pIX (được đánh dấu ở đầu 5' bởi vị trí giới hạn *Bsu36I* trong bộ gen Ad35), do điều này làm tăng tính ổn định của adenovirut nhờ trình tự khởi đầu phiên mã của gen pIX có một phần trong vùng này (xem, ví dụ Havenga *et al* , 2006, *J. Gen. Virol.* 87: 2135-2143; WO 2004/001032, được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn).

“Axit nucleic khác loại” (ở đây còn gọi là ‘chuyển gen’) trong adenovirut của sáng chế là axit nucleic mà không có mặt một cách tự nhiên trong adenovirut. Nó được đưa vào adenovirut ví dụ bằng các kỹ thuật sinh học phân tử tiêu chuẩn. Theo sáng chế, axit nucleic khác loại mã hóa protein F của RSV hoặc đoạn của chúng. Nó có thể ví dụ được tách dòng vào vùng E1 hoặc E3 loại bỏ của vectơ adenovirut. Chuyển gen thường liên kết hoạt động để biểu hiện trình tự đối chứng. Điều này có thể ví dụ được thực hiện bằng cách đặt axit nucleic mã hóa (các) chuyển gen dưới đối chứng của trình tự khởi đầu phiên mã. Trình tự điều hòa khác có thể được thêm. Nhiều trình tự khởi đầu phiên mã có thể được sử dụng để biểu hiện (các) chuyển gen, và đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Ví dụ không giới hạn của trình tự khởi đầu phiên mã thích hợp để thu được biểu hiện trong tế bào nhân thật là trình tự khởi đầu phiên mã CMV (US 5,385,839), ví dụ trình tự khởi đầu phiên mã ngay ban đầu CMV, ví dụ bao gồm nt. -735 đến +95 từ trình tự tăng cường gen/trình tự khởi đầu phiên mã ngay ban đầu CMV. Tín hiệu polyadenyl hóa, ví dụ tín hiệu polyA hoocmon sinh trưởng của bò (US 5,122,458), có thể có mặt ở sau (các) chuyển gen.

Theo một số phương án, vectơ Ad26 tái tổ hợp theo sáng chế chứa nucleotit đầu tận cùng 5' là trình tự nucleotit: CTATCTAT. Các phương án này là hữu ích vì vectơ này biểu hiện tăng sao chép trong các quy trình tạo ra, dẫn đến việc các m

adenovirut có sự đồng nhất cải thiện, so với vectơ có trình tự đầu tận cùng 5' nguyên gốc (thông thường CATCATCA) (xem cả các đơn sáng chế số PCT/EP2013/054846 và US 13/794,318, tên sáng chế 'Batches of recombinant adenovirus with altered terminal ends' nộp ngày 12 Tháng Ba 2012 dưới tên Crucell Holland B.V.), được kết hợp toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn. Sáng chế do đó còn đề xuất các mẻ adenovirut tái tổ hợp mã hóa protein F của RSV hoặc phần của chúng, trong đó adenovirut là adenovirut của người có kiểu huyết thanh 26, và trong đó cơ bản tất cả (ví dụ ít nhất 90%) adenovirut trong mẻ chứa bộ gen với trình tự nucleotit đầu tận cùng CTATCTAT.

Theo sáng chế, protein F của RSV có thể chiết xuất từ các chủng bất kỳ có trong tự nhiên hoặc tái tổ hợp RSV, ưu tiên là từ các chủng RSV của người, như A2, Long, hoặc các chủng B. Theo các phương án khác, trình tự có thể là trình tự liên ứng trên cơ sở nhiều protein F của các trình tự axit amin RSV. Theo một ví dụ của sáng chế, chủng RSV là chủng RSV-A2.

Theo sáng chế, protein F của RSV có thể là chiều dài đầy đủ của protein F của RSV, hoặc đoạn của chúng. Theo một phương án của sáng chế, trình tự nucleotit mã hóa protein F của RSV mã hóa chiều dài đầy đủ của protein F của RSV (F0), như axit amin của SEQ ID NO: 1. Theo một ví dụ của sáng chế, trình tự nucleotit mã hóa protein F của RSV có trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 2. Tùy ý, trình tự mã hóa protein F của RSV có thể là trình tự bất kỳ mà có ít nhất khoảng 80%, ưu tiên là hơn 90%, ưu tiên hơn là ít nhất khoảng 95%, tương đồng với trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 2. Theo các phương án khác, trình tự được tối ưu đơn vị mã như ví dụ được cho trong SEQ ID NO: 2, 4, 5 hoặc 6 của WO 2012/021730 có thể được sử dụng.

Theo một phương án khác của sáng chế, trình tự nucleotit có thể tùy ý mã hóa đoạn của protein F của RSV. Đoạn có thể thu được từ một trong số hoặc cả loại bỏ gốc amin và gốc carboxy. Phạm vi loại bỏ có thể được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực để, ví dụ, thu được sản lượng tốt hơn adenovirut tái tổ hợp. Đoạn sẽ được chọn để chứa đoạn hoạt tính miễn dịch học của protein F, cụ thể là phần mà sẽ tạo ra tăng đáp ứng miễn dịch ở đối tượng. Điều này có thể dễ dàng xác định được bằng cách sử dụng các phương pháp in silico, in vitro và/hoặc in vivo, tất cả đều quen thuộc đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Theo một phương án theo sáng chế, đoạn là protein F cắt cụt vùng mã hóa xuyên màng của

RSV (F0ΔTM, xem ví dụ US 20110014220). Các đoạn của protein F còn có thể là vùng F1 hoặc F2 của protein F. Các đoạn của F còn có thể là các đoạn chứa các epitop trung hòa và các epitop tế bào T (Sing *et al* , 2007, *Virol. Immunol.* 20, 261-275; Sing *et al* , 2007, *Vaccine* 25, 6211-6223).

Thuật ngữ 'khoảng' đối với các giá trị số như được dùng trong sáng chế nghĩa là giá trị $\pm 10\%$.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp để tạo ra vaccin kháng virut hợp bào hô hấp (RSV), bao gồm tạo ra denovirut tái tổ hợp ở người có kiểu huyết thanh 26 mà bao gồm axit nucleic mã hóa protein F của RSV hoặc đoạn của chúng, nhân lên adenovirut tái tổ hợp này trong môi trường nuôi cấy của tế bào chủ, phân lập và tinh sạch adenovirut tái tổ hợp, và đưa adenovirut tái tổ hợp vào chế phẩm dược dụng.

Adenovirut tái tổ hợp có thể được điều chế và được lai tạo trong tế bào chủ, theo các phương pháp đã biết, mà thu được nuôi cấy tế bào của tế bào chủ được cho lây nhiễm adenovirut. Nuôi cấy tế bào có thể là dạng nuôi cấy tế bào bất kỳ, bao gồm nuôi cấy tế bào dính, ví dụ tế bào dính vào bề mặt của bình nuôi cấy hoặc vi chất mang, cũng như nuôi cấy huyền phù.

Nuôi cấy huyền phù phạm vi lớn nhất được thực hiện là các quy trình mẻ hoặc mẻ cho ăn bởi vì chúng dễ thực hiện và mở rộng phạm vi nhất. Ngày nay, các quy trình tiếp theo trên cơ sở nguyên tắc đổ tràn ngập ngày càng trở nên phổ biến và cũng thích hợp (xem ví dụ WO 2010/060719, và WO 2011/098592, cả hai được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn, mô tả phương pháp thích hợp để thu và tinh sạch lượng adenovirut tái tổ hợp lớn).

Tế bào tạo được nuôi cấy để làm tăng số lượng tế bào và virut và/hoặc độ chuẩn virut. Nuôi cấy tế bào được thực hiện để cho phép chúng chuyển hóa, và/hoặc lớn lên và/hoặc phân chia và/hoặc tạo ra virut có lợi theo sáng chế. Điều này có thể được thực hiện bằng các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực, và bao gồm nhưng không giới hạn ở cung cấp dinh dưỡng cho tế bào, ví dụ môi trường nuôi cấy hợp lý. Môi trường nuôi cấy thích hợp là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực và có thể thường lấy từ nguồn thương mại với số lượng lớn, hoặc được làm theo yêu cầu theo các phương pháp tiêu chuẩn. Nuôi cấy có thể được thực hiện ví dụ trong các đĩa, các bình trực hoặc trong các phản

ứng sinh học, sử dụng mẻ, mẻ cho ăn, hệ thống liên tục và tương tự. Các điều kiện thích hợp để nuôi cấy tế bào là đã biết (xem ví dụ Tissue Culture, Academic Press, Kruse và Paterson, các nhà biên soạn (1973), và R.I. Freshney, Culture of animal cells: A manual of basic technique, tái bản lần thứ tư (Wiley-Liss Inc., 2000, ISBN 0-471-34889-9).

Cơ bản là, adenovirut sẽ được phơi ra tế bào tạo thích hợp trong nuôi cấy, cho phép hấp thụ virut. Thông thường, khuấy tối ưu nằm trong khoảng từ 50 đến 300 rpm, cơ bản là khoảng 100-200, ví dụ khoảng 150, DO chính là 20-60%, ví dụ 40%, độ pH tối ưu nằm trong khoảng từ 6,7 và 7,7, nhiệt độ tối ưu nằm trong khoảng từ 30 đến 39°C, ví dụ 34-37°C, và MOI tối ưu nằm trong khoảng từ 5 đến 1000, ví dụ khoảng 50-300. Cơ bản là, adenovirut gây nhiễm các tế bào tạo một cách tự phát, và đưa các tế bào tạo tiếp xúc với các hạt rAd đủ để lây nhiễm tế bào. Thông thường, gốc hạt adenovirut được thêm vào nuôi cấy để bắt đầu lây nhiễm, và sau đó adenovirut nhân lên trong các tế bào tạo. Việc này đều quen thuộc đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực.

Sau khi lây nhiễm adenovirut, virut lắp lại bên trong tế bào và nhờ đó được khuếch đại, quy trình đề cập đến ở đây là nhân bản adenovirut. Lây nhiễm denovirut cuối cùng tạo ra phân giải tế bào bị lây nhiễm. Các đặc tính gây liệt của adenovirut do đó cho phép hai cách tạo ra virut khác nhau. Cách thứ hai là thu virut trước khi phân giải tế bào, sử dụng các nhân tố bên ngoài để phân giải tế bào. Cách thứ hai là thu virut nổi trên bề mặt sau (hầu hết) phân giải tế bào hoàn thiện bởi virut tạo ra (xem ví dụ Patent Mỹ 6,485,958, mô tả việc thu adenovirut mà không phân giải tế bào chủ bằng các nhân tố bên ngoài). Ưu tiên là sử dụng các nhân tố bên ngoài để phân giải hoạt tính tế bào để thu adenovirut.

Các phương pháp có thể được sử dụng cho phân giải tế bào hoạt tính là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực, và được bàn đến trong ví dụ WO 98/22588, tr. 28-35. Các phương pháp hữu dụng này là ví dụ, kết đông-tan giá, cắt cứng, phân giải ưu trương và/hoặc phân giải nhược trương, cắt lỏng, sóng siêu âm, đun ép áp suất cao, phân giải bằng chất tẩy, kết hợp các cách ở trên, và tương tự. Theo một phương án của sáng chế, tế bào được phân giải bằng cách sử dụng ít nhất một chất tẩy. Sử dụng chất tẩy để phân giải có lợi ích là đây là phương pháp dễ, và có thể mở rộng phạm vi dễ.

Các chất tẩy có thể được sử dụng, và phương pháp sử dụng chúng, thường là đã biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Một số ví dụ đã được bàn đến ví dụ trong WO 98/22588, tr. 29-33. Các chất tẩy có thể bao gồm chất tẩy anion, cation, ion lưỡng tính, và không ion. Nồng độ của chất tẩy có thể thay đổi, ví dụ nằm trong khoảng 0,1%-5% (khối lượng/khối lượng). Theo một phương án, chất tẩy được sử dụng là Triton X-100.

Nucleaza có thể được sử dụng để loại bỏ sự lây nhiễm, cụ thể là chủ yếu từ tế bào tạo, axit nucleic. Các nucleaza ví dụ thích hợp để dùng theo sáng chế bao gồm Benzonase®, Pulmozyme®, hoặc bất kỳ DNase và/hoặc RNase khác được sử dụng thông thường trong lĩnh vực. Theo các phương án được ưu tiên, nucleaza là Benzonase®, mà thủy phân nhanh axit nucleic bằng cách thủy phân liên kết phosphodiester bên trong giữa các nucleotit đặc hiệu, nhờ đó làm giảm độ nhớt của chất dung giải tế bào. Benzonase® có thể được mua từ Merck KGaA (mã W214950). Nồng độ trong đó nucleaza được sử dụng ưu tiên là nằm trong khoảng 1-100 đơn vị/ml. Tùy ý, hoặc ngoài xử lý nucleaza, còn có thể kết tủa chọn lọc tế bào chủ ADN ra khỏi chế phẩm adenovirus trong quá trình tinh chế adenovirus, sử dụng các tác nhân tạo kết tủa chọn lọc như domiphen bromua (xem ví dụ US 7,326,555; Goerke et al., 2005, Biotechnology and bioengineering, Tập 91: 12-21; WO 2011/045378; WO 2011/045381).

Phương pháp để thu adenovirus từ nuôi cấy tế bào tạo đã được mô tả sâu trong WO 2005/080556.

Theo một số phương án, adenovirus thu được được tinh chế tiếp. Tinh chế adenovirus có thể được thực hiện trong một vài bước bao gồm lắng gạn, siêu lọc, khử lọc hoặc phân tách bằng sắc ký như được mô tả trong ví dụ WO 05/080556, được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn. Lắng gạn có thể được thực hiện bằng bước lọc, loại mảnh tế bào và tạp chất khác từ chất dung giải tế bào. Siêu lọc được dùng để cô đặc dung dịch virus. Khử lọc, hoặc trao đổi đệm, sử dụng máy siêu lọc là cách để loại và trao đổi muối, đường và tương tự. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực biết cách làm thế nào để tìm ra các điều kiện tối ưu cho mỗi bước tinh chế. Tương tự WO 98/22588, được kết hợp toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn, mô tả phương pháp để tạo ra và tinh chế vector adenovirus. Phương pháp bao gồm việc nuôi tế bào chủ, gây nhiễm tế bào chủ bằng adenovirus, thu và phân giải tế bào chủ, cô đặc chất dung giải

thô, trao đổi đệm của chất dung giải thô, xử lý bằng chất dung giải với nucleaza, và tinh sạch tiếp virus sử dụng sắc ký.

Ưu tiên là, tinh chế sử dụng ít nhất một bước tinh chế, như ví dụ được bàn đến trong WO 98/22588, tr. 61-70. Nhiều quy trình đã được mô tả để tinh chế thêm adenovirus, trong đó bước tinh chế là bao gồm trong quy trình. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ hiểu rằng các quy trình này, và có thể thay đổi cách sử dụng chính xác các bước sắc ký để tối ưu hóa quy trình. Ví dụ có thể tinh chế adenovirus bằng các bước sắc ký trao đổi anion, xem ví dụ WO 2005/080556 và Konz *et al* , 2005, *Hum Gene Ther* 16: 1346-1353. Nhiều phương pháp tinh chế adenovirus khác đã được mô tả và nằm trong nghiên cứu của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Phương pháp khác để tạo ra và tinh sạch adenovirus được bộc lộ trong ví dụ (WO 00/32754; WO 04/020971; US 5,837,520; US 6,261,823; WO 2006/108707; Konz *et al* , 2008, *Methods Mol Biol* 434: 13-23; Altaras *et al* , 2005, *Adv Biochem Eng Biotechnol* 99: 193-260), tất cả được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn.

Để dùng cho người, sáng chế có thể sử dụng chế phẩm được bao gồm rAd và chất mang hoặc tá dược được dùng. Trong bối cảnh sáng chế, thuật ngữ "Dược dụng" nghĩa là chất mang hoặc tá dược, với liều dùng và nồng độ được dùng, sẽ không gây ra bất kỳ tác động không mong muốn hoặc có hại ở các đối tượng được cho dùng. Các chất mang và tá dược được dùng này là đã biết trong lĩnh vực (xem Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, A. R. Gennaro, Ed., Mack Publishing Company [1990]; Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins, S. Frokjaer và L. Hovgaard, Eds., Taylor & Francis [2000]; và Handbook of Pharmaceutical Excipients, tái bản lần thứ 3, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press [2000]). rAd được tinh chế ưu tiên là được điều chế và cho dùng là dung dịch vô trùng mặc dù cũng có thể sử dụng các chế phẩm khô lạnh. Dung dịch vô trùng được điều chế bằng cách lọc vô trùng hoặc bằng các phương pháp khác mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực đã biết. Sau đó các dung dịch này được làm khô lạnh hoặc đổ đầy vào hộp phân liều dược. Độ pH của dung dịch thường nằm trong khoảng pH 3,0 đến 9,5, ví dụ pH 5,0 đến 7,5. rAd cơ bản là trong dung dịch có chất đệm dược dụng thích hợp, và dung dịch của rAd còn có thể chứa muối. Chất làm ổn định tùy ý có thể có mặt, như albumin. Theo một số phương án, chất tẩy được thêm. Theo một số phương án, rAd có thể được điều chế thành chế phẩm tiêm. Các chế phẩm này

chứa lượng có hiệu quả rAd, hoặc là dung dịch lỏng, huyền phù lỏng vô trùng hoặc các dạng đông khô và tùy ý chứa chất ổn định hoặc tá dược. Vacxin adenovirut còn có thể được sol khí để cho dùng trong mũi (xem ví dụ WO 2009/117134).

Ví dụ, adenovirut có thể được lưu trữ trong chất đệm mà còn được dùng cho Adenovirus World Standard (Hoganson *et al* , Development of a stable adenoviral vector formulation, *Bioprocessing* Tháng Ba 2002, tr. 43-48): 20 mM Tris pH 8, 25 mM NaCl, 2,5% glyxerol. Chất đệm chế phẩm hữu dụng khác thích hợp để dùng cho người là 20 mM Tris, 2 mM MgCl₂, 25 mM NaCl, sucroza 10% khối lượng/thể tích, polysorbat-80 0,02% khối lượng/thể tích. Thấy rằng, nhiều chất đệm khác có thể được sử dụng, và một số ví dụ về chế phẩm thích hợp để lưu trữ và cho dùng thuốc của chế phẩm (adeno)virut tinh chế có thể ví dụ được tìm thấy trong patent Châu Âu số 0853660, Patent Mỹ 6,225,289 và trong các công bố đơn sáng chế quốc tế WO 99/41416, WO 99/12568, WO 00/29024, WO 01/66137, WO 03/049763, WO 03/078592, WO 03/061708.

Theo một số phương án chế phẩm bao gồm adenovirut còn bao gồm một hoặc hoặc tá dược. Tá dược là đã biết trong lĩnh vực để làm tăng thêm đáp ứng miễn dịch đối với yếu tố quyết định kháng nguyên được áp dụng, và chế phẩm được bao gồm adenovirut và tá dược thích hợp ví dụ được bộc lộ trong WO 2007/110409, được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn. Các thuật ngữ "tá dược" và "chất kích thích miễn dịch" được sử dụng luân phiên ở đây, và được xác định là một hoặc nhiều chất gây ra kích thích hệ miễn dịch. Trong bối cảnh này, tá dược được sử dụng để làm tăng đáp ứng miễn dịch đối với vectơ adenovirut theo sáng chế. Các ví dụ về tá dược thích hợp bao gồm muối nhôm như nhôm hydroxit và/hoặc nhôm phosphat; chế phẩm nhũ dầu (hoặc chế phẩm dầu trong nước), bao gồm nhũ tương squalen nước, như MF59 (xem ví dụ WO 90/14837); chế phẩm saponin, như ví dụ QS21 và các phức hợp kích thích miễn dịch (ISCOMS) (xem ví dụ US 5,057,540; WO 90/03184, WO 96/11711, WO 2004/004762, WO 2005/002620); các chất dẫn xuất từ vi khuẩn hoặc vi sinh vật, ví dụ về các chất này là monophosphoryl lipit A (MPL), 3-O- deaxylat hóa MPL (3dMPL), CpG- motif chứa oligonucleotit, độc tố vi khuẩn ADP-ribosyl hóa hoặc dạng đột biến của nó, như nội độc tố LT không bền nhiệt từ *E. coli* , độc tố khuẩn tả CT, và tương tự. Còn có thể sử dụng tá dược mã hóa vectơ, ví dụ bằng cách sử dụng axit nucleic khác loại mã hóa dung hợp vùng chứa ít kim loại của protein liên kết C4

(C4bp) với kháng nguyên mong muốn (ví dụ Solabomi *et al* , 2008, *Infect Immun* 76: 3817-23). Theo một số phương án chế phẩm theo sáng chế bao gồm nhôm làm tá dược, ví dụ dưới dạng nhôm hydroxit, nhôm phosphat, nhôm kali phosphat, hoặc kết hợp của chúng, ở các nồng độ 0,05 – 5 mg, ví dụ từ 0,075-1,0 mg, hàm lượng nhôm mỗi liều dùng.

Theo các phương án khác, các chế phẩm không chứa tá dược.

Cũng có thể theo sáng chế cho dùng các thành phần hoạt tính khác, kết hợp với vaccin theo sáng chế. Các thành phần hoạt tính khác này có thể chứa ví dụ kháng nguyên RSV khác hoặc vector bao gồm axit nucleic mã hóa chúng. Vector này có thể là không adenovirut hoặc adenovirut, trong đó loại adenovirut có thể có kiểu huyết thanh bất kỳ. Ví dụ của kháng nguyên RSV khác bao gồm protein G RSV hoặc phần hoạt tính miễn dịch học của chúng. Ví dụ, adenovector rAd/3xG trên cơ sở khuyết Ad5 sao chép tái tổ hợp được dùng trong mũi, biểu hiện vùng lõi tan được của glycoprotein G (axit amin 130 đến 230) là được bảo vệ trong mẫu chuột (Yu *et al* , 2008, *J Virol* 82: 2350-2357), và mặc dù không được bảo vệ khi cho dùng qua đường tiêm bắp, rõ ràng từ các dữ liệu này là G của RSV là kháng nguyên thích hợp để tạo ra đáp ứng bảo vệ. Các thành phần hoạt tính khác có thể còn chứa các kháng nguyên không phải RSV, ví dụ từ các tác nhân gây bệnh khác như virut, vi khuẩn, vật ký sinh, và tương tự. Việc cho dùng các thành phần hoạt tính khác có thể ví dụ được thực hiện bằng các tách riêng việc cho dùng hoặc bằng cách cho dùng kết hợp các sản phẩm của vaccin theo sáng chế và các thành phần hoạt tính khác. Theo một số phương án, các kháng nguyên không adenovirut khác (ngoài RSV.F), có thể được mã hóa trong vector theo sáng chế. Theo một số phương án, do đó có thể được mong muốn để biểu hiện nhiều hơn một protein từ adenovirut đơn, và trong các trường hợp này nhiều trình tự mã hóa ví dụ có thể được liên kết để tạo ra dịch mã đơn từ cắt xét biểu hiện đơn hoặc có thể có mặt trong hai cắt xét biểu hiện riêng biệt được tách dòng thành các phân khác nhau của bộ gen adenovirut.

Các chế phẩm adenovirut được dùng cho đối tượng, ví dụ đối tượng người. Tổng liều dùng adenovirut được cấp cho đối tượng trong một lần dùng có thể thay đổi như đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực, và thường trong khoảng 1×10^7 hạt virut (vp) đến 1×10^{12} vp, ưu tiên là từ 1×10^8 vp đến 1×10^{11} vp, ví dụ từ 3×10^8 đến 5×10^{10} vp, ví dụ từ 10^9 đến 3×10^{10} vp.

Việc cho dùng các chế phẩm adenovirut có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các đường dùng tiêu chuẩn. Các phương án không giới hạn bao gồm cho dùng ngoài đường tiêu hóa, như bằng cách tiêm ví dụ trong da, trong cơ, v.v., hoặc dưới da, qua da, hoặc cho dùng ở niêm mạc, ví dụ trong mũi, miệng, và tương tự. Việc dùng trong mũi thường thấy là đường dùng được ưu tiên đối với vaccin kháng RSV. Tác dụng quan trọng nhất của chiến lược dùng trong mũi vật sống là kích thích trực tiếp sự miễn dịch của hệ hô hấp cục bộ và không làm tăng bệnh liên quan. Chỉ các vaccin dưới đánh giá lâm sàng đối với sử dụng nhi khoa ở thời điểm hiện tại là vaccin dùng trong mũi vật sống (Collins và Murphy. *Vaccines against human respiratory syncytial virus*). Trong: *Perspectives in Medical Virology 14: Respiratory Syncytial Virus* (Ed. Cane, P.), Elsevier, Amsterdam, the Netherlands, tr233-277). Dùng trong mũi là đường dùng được ưu tiên thích hợp theo sáng chế. Tuy nhiên, được đặc biệt ưu tiên theo sáng chế là cho dùng vaccin qua đường tiêm bắp, do đã phát hiện một cách đáng ngạc nhiên là cho dùng trong cơ của vaccin theo sáng chế tạo ra sự bảo vệ kháng RSV sao chép trong mũi và phổi của chuột hại bông, không giống vaccin RSV trong cơ trên cơ sở các kiểu huyết thanh adenovirut khác đã được báo cáo trước đó. Tác dụng của cho dùng trong cơ là đơn giản và dễ thiết lập, và không tạo ra các băn khoăn về tính an toàn đối với áp dụng trong mũi của trẻ dưới 6 tuổi. Theo một phương án chế phẩm được cho dùng bằng cách tiêm trong cơ, ví dụ vào cơ delta của cánh tay, hoặc cơ bên ngoài của đùi. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực biết các khả năng khác nhau để dùng chế phẩm, ví dụ vaccin để tạo ra đáp ứng miễn dịch đối với (các) kháng nguyên trong vaccin.

Đối tượng như được sử dụng ở đây ưu tiên là động vật có vú, ví dụ loài gặm nhấm, ví dụ chuột, chuột hại cây bông, hoặc động vật linh trưởng không phải người, hoặc người. Tốt hơn, đối tượng này là đối tượng người. Đối tượng có thể ở độ tuổi bất kỳ, ví dụ từ khoảng 1 tháng đến 100 tuổi, ví dụ từ khoảng 2 tháng đến khoảng 80 tuổi, ví dụ từ khoảng 1 tháng đến khoảng 3 tuổi, từ khoảng 3 tuổi đến khoảng 50 tuổi, từ khoảng 50 tuổi đến khoảng 75 tuổi, v.v..

Còn có thể cho phép một hoặc nhiều lần dùng tăng cường một hoặc nhiều vaccin adenovirut theo sáng chế. Nếu thực hiện chủng ngừa tăng cường, cơ bản là, chủng ngừa tăng cường này sẽ được cho dùng cho cùng đối tượng ở thời điểm nằm trong khoảng từ một tuần đến một năm, ưu tiên là từ hai tuần đến bốn tháng, sau khi

dùng chế phẩm cho đối tượng trong lần thứ nhất (mà trong các trường hợp được đề cập là ‘chủng ngừa khời mào’). Trong các phác đồ tăng cường tùy ý, còn có thể cho dùng vectơ khác nhau, ví dụ một hoặc nhiều adenovirut có kiểu huyết thanh khác nhau, hoặc vectơ khác như MVA, hoặc ADN, hoặc protein, cho đối tượng sau chủng ngừa khời mào. Ví dụ có thể dùng cho đối tượng vectơ adenovirut tái tổ hợp theo sáng chế là khời mào, và tăng cường bằng chế phẩm bao gồm protein F của RSV.

Theo một số phương án, việc cho dùng bao gồm cho dùng khời mào và ít nhất một lần cho dùng tăng cường. Theo một số phương án của chúng, cho dùng khời mào với rAd35 bao gồm axit nucleic mã hóa protein F của RSV hoặc đoạn của chúng (‘rAd35-RSV.F’) và cho dùng tăng cường với rAd26 bao gồm axit nucleic mã hóa protein F của RSV theo sáng chế (‘rAd26-RSV.F’). Theo các phương án khác của chúng, cho dùng khời mào với rAd26-RSV.F và cho dùng tăng cường với rAd35-RSV.F. Theo các phương án khác, cả cho dùng khời mào và cho dùng tăng cường là với rAd26.RSV.F. Theo một số phương án, cho dùng khời mào với rAd26-RSV.F và cho dùng tăng cường là với protein F của RSV. Theo tất cả các phương án này, có thể cung cấp các lần cho dùng tăng cường với vectơ hoặc protein giống hoặc khác nhau. Các phương án trong đó tăng cường với protein F của RSV có thể đặc biệt có lợi bao gồm ví dụ ở các đối tượng người già trong nhóm có nguy cơ (ví dụ có COPD hoặc suyễn) ở 50 tuổi hoặc già hơn, hoặc ví dụ ở đối tượng khỏe mạnh ở 60 tuổi hoặc già hơn hoặc 65 tuổi hoặc già hơn.

Theo một số phương án, cho dùng bao gồm cho dùng đơn lẻ adenovirut tái tổ hợp theo sáng chế, mà không cho dùng (tăng cường) thêm. Các phương án này là có lợi về việc giảm tính phức tạp và chi phí của phác đồ cho dùng so với phác đồ khời mào tăng cường. Sự bảo vệ toàn diện đã quan sát được sau cho dùng đơn lẻ vectơ adenovirut tái tổ hợp theo sáng chế mà không cần cho dùng tăng cường ở mẫu chuột hại cây bông trong các ví dụ ở đây.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế còn được giải thích thêm trong các ví dụ sau đây. Các ví dụ không làm giới hạn sáng chế trong trường hợp bất kỳ. Chúng chỉ dùng để làm rõ sáng chế.

Ví dụ 1: Điều chế các vectơ adenovirut

Tách dòng gen F của RSV vào vùng E1 của Ad35 và Ad26:

Gen RSV.F(A2)nat, mã hóa protein dung hợp (F) của RSV tự nhiên của chủng A2 (Genbank ACO83301.1), là gen được tối ưu cho biểu hiện ở người và được tổng hợp, bởi Geneart. Trình tự Kozak (5' GCCACC 3') được bao gồm trực tiếp trước đơn vị mã khởi đầu ATG, và hai đơn vị mã kết thúc (5' TGA TAA 3') được thêm ở đầu của trình tự mã hóa RSV.F(A2)nat. Gen RSV.F(A2)nat được chèn vào plasmit pAdApt35BSU và plasmit pAdApt26 qua vị trí HindIII và XbaI. Plasmit thu được, pAdApt35BSU.RSV.F(A2)nat và pAdApt26.RSV.F(A2)nat được mô tả trên Fig. 15. Trình tự axit amin của protein F, và đơn vị mã tối ưu trình tự mã hóa trình tự axit amin này, được cho trong Bảng 1 là SEQ. ID. NOs: 1 và 2, tương ứng.

Nuôi cấy tế bào:

Tế bào PER.C6 (Fallaux *et al.* , 1998, *Hum Gene Ther* 9: 1909-1917) được duy trì trong môi trường Eagle biến đổi Dulbecco (DMEM) với 10% huyết thanh bào thai bò (FBS), được bổ sung 10mM MgCl₂.

Tạo ra, lây nhiễm và chuyển adenovirut:

Tất cả adenovirut được tạo ra trong tế bào PER.C6 bằng cách tái tổ hợp cùng loại đơn lẻ và tạo ra như được mô tả trước đây (đối với rAd35: Havenga *et al.* , 2006, *J. Gen. Virol.* 87: 2135–2143; đối với rAd26: Abbink *et al.* , 2007, *J. Virol.* 81: 4654-4663). Tóm lại, tế bào PER.C6 được chuyển nhiễm bằng plasmit vector Ad, sử dụng Lipofectamine theo chỉ dẫn được cung cấp bởi nhà sản xuất (Life Technologies). Để giải thoát vector Ad35 mang cát xét biểu hiện chuyển gen RSV.F(A2)nat, plasmit pAdApt35BSU.RSV.F(A2)nat và cosmit pWE/Ad35.pIX-rITR.dE3.5orf6 được sử dụng, trong khi đó đối với vector Ad26 mang cát xét biểu hiện chuyển gen RSV.F(A2)nat, plasmit pAdApt26.RSV.F(A2)nat và pWE.Ad26.dE3.5orf6.cosmit được sử dụng. Tế bào được thu một ngày sau khi CPE đầy đủ, rửa đông, ly tâm trong 5 phút ở 3,000 rpm, và được lưu trữ ở -20°C. Các virut tiếp theo là bản được tinh chế và khuếch đại trong PER.C6 được nuôi cấy trên giếng đơn của tấm nuôi cấy mô đa giếng 24 giếng. Khuếch đại tiếp được thực hiện trong PER.C6 được nuôi cấy sử dụng bình thót cổ nuôi cấy mô T25 và bình thót cổ nuôi cấy mô T175. Chất dung giải thô T175, 3 đến 5 ml được sử dụng để chủng ngừa 20× bình thót cổ nuôi cấy mô ba lớp T175 chứa 70% lớp dịch nuôi cấy của tế bào PER.C6. Virut được tinh chế bằng phương pháp tinh chế CsCl hai bước. Cuối cùng, v

Ví dụ 2. Tạo ra khả năng miễn dịch kháng F của RSV sử dụng adenovirut tái tổ hợp có kiểu huyết thanh 26 và 35 *in vivo*.

Đây là thử nghiệm để đánh giá khả năng của adenovirut tái tổ hợp có kiểu huyết thanh (Ad26) và adenovirut tái tổ hợp có kiểu huyết thanh 35 (Ad35) để tạo ra khả năng miễn dịch kháng kháng nguyên F của glycoprotein của RSV ở chuột BALB/c.

Trong nghiên cứu này động vật được phân phối trong nhóm thử nghiệm gồm 5 chuột. Động vật được gây miễn dịch bằng liều đơn Ad26 hoặc Ad35 mang gen F của RSV chiều dài đủ (Ad26-RSV.F hoặc Ad35- RSV.F) hoặc không chuyển gen (Ad26e hoặc Ad35e). Ba độ pha loãng theo thứ tự gấp 10 lần của rAd nằm trong khoảng từ 10^{10} đến 10^8 hạt virut (vp) được cho qua đường tiêm bắp. Về đối chứng, một nhóm gồm 3 con vật nhận vectơ trống Ad26e và một nhóm nhận vectơ trống Ad35e.

Thử nghiệm ELISPOT được dùng để xác định số lượng tương đối của tế bào T bài tiết IFN γ đặc hiệu của protein F trong lá lách, và cơ bản được thực hiện như được mô tả bởi Radošević *et al* . (Clin Vaccine Immunol. 2010;17(11):1687-94.). Để kích thích các tế bào đơn nhân lách trong thử nghiệm ELISPOT, hai tập hợp peptit gồm có 11 peptit 15-mer chồng lẫn axit amin bắc qua toàn bộ trình tự của protein F (A2) của RSV được sử dụng. Số đơn vị tạo thành điểm (SFU) cho mỗi 10^6 tế bào được tính toán.

Để xác định các độ chuẩn của kháng thể thử nghiệm ELISA được sử dụng. Vì thế, các tấm ELISA (Thermo Scientific) được phủ 25 μ g/ml kháng nguyên bất hoạt hoàn toàn RSV Long (Virion Serion, cat# BA113VS). Các mẫu huyết thanh pha loãng được thêm vào các tấm, và các kháng thể kháng RSV của IgG được xác định sử dụng IgG kháng chuột ghi nhãn biotin (DAKO, cat# E0413), sử dụng phát hiện bằng horseradish peroxidaza (PO)- streptavidin (SA) tiếp hợp. Các độ chuẩn được tính toán bằng nội suy tuyến tính, sử dụng tín hiệu 1,5x OD từ 50x huyết thanh tự nhiên pha loãng làm phần cắt. Các độ chuẩn của các kháng thể IgG1 và IgG2a đặc hiệu của RSV trong huyết thanh của chuột được xác định bằng IgG1 kháng chuột ghi nhãn PO và IgG2a kháng chuột ghi nhãn PO (Southern Biotechnology Associates, cat#s 1070-05 và 1080-05) được dùng để định lượng lớp phủ.

Hoạt tính trung hòa virut (VNA) của kháng thể được xác định bởi thử nghiệm vi trung hòa, cơ bản được thực hiện như được mô tả by Johnson *et al* . (J Infect Dis.

1999 Jul;180(1):35-40.). Tế bào VERO dễ nhiễm RSV được gieo trong các tấm nuôi cấy tế bào 96 giếng một ngày trước khi lây nhiễm. Vào ngày lây nhiễm, các huyết thanh được pha loãng theo thứ tự và các đối chứng được trộn với 1200 pfu RSV (Long hoặc B1) và được ủ 1 h ở 37°C. Tiếp đó, hỗn hợp virus/kháng thể được chuyển vào các tấm 96 giếng chứa các đơn lớp tế bào VERO. Ba ngày sau khi các đơn lớp được găng bằng 80% axeton đá lạnh và kháng nguyên RSV được xác định bằng kháng thể đơn dòng kháng F. Độ chuẩn trung hòa được biểu hiện như độ pha loãng huyết thanh ($\log_2$) tạo ra giảm 50% trong OD450 từ các giếng đối chứng chỉ có virus (IC_{50}).

Ở con vật sau khi mào tuần 2 và tuần 8 được hiển và các đáp ứng tế bào và thể dịch được theo dõi như được mô tả ở trên.

Fig. 1 thể hiện rằng tất cả các liều dùng của Ad26-RSV.F (Fig. 1A) và Ad35-RSV.F (Fig. 1B) đều có hiệu quả trong việc tạo ra đáp ứng miễn dịch tế bào tốt và đáp ứng ổn định theo thời gian. Không có sự khác biệt đáng kể của liều dùng vector lên đáp ứng tế bào T với hoặc là Ad26-RSV.F hoặc Ad35-RSV.F quan sát được.

Fig. 2 thể hiện các độ chuẩn kháng thể trong cùng thử nghiệm như được mô tả ở trên. Cả hai vector tạo ra thời gian rất rõ và tăng độ lặp liều dùng trong các độ chuẩn ELISA (Fig. 2). Các độ chuẩn kháng F tăng rõ từ 2 đến 8 tuần, mà đáng kể đối với 10^{10} liều dùng. Ở 8 tuần không có sự khác biệt trong các độ chuẩn giữa vector Ad26-RSV.F hoặc Ad35-RSV.F.

Sự phân bố lớp phụ (IgG1 với IgG2a) của IgG đặc hiệu của F được xác định để đánh giá sự cân bằng của đáp ứng Th1 với Th2. Đáp ứng Th2/Th1 lệch dẫn đến việc các con vật tăng bệnh của RSV được tăng cường của vacxin như quan sát thấy với RSV bất hoạt formalin. Như được thể hiện trên Fig. 3, tỷ lệ IgG2a/IgG1 đối với cả Ad26-RSV.F và Ad35-RSV.F cao hơn 1. Điều này chỉ ra mạnh mẽ rằng adenovector Ad26-RSV.F và Ad35-RSV.F ức chế loại Th1 hơn là loại Th2 của đáp ứng.

Fig. 4 thể hiện các độ chuẩn trung hòa virus (VNA) của cùng huyết thanh được dùng cho các độ chuẩn kháng thể. Sự tạo miễn dịch bằng Ad26-RSV.F và rAd35-RSV.F dẫn đến tạo ra các độ chuẩn kháng thể trung hòa. Các độ chuẩn VNA tăng mạnh trong khoảng từ hai đến tám tuần sau khi khi mào ở chuột được cho 10^{10} vp. Ở tám tuần không có sự khác biệt về độ chuẩn giữa vector Ad26-RSV.F và Ad35-RSV.F ở chuột được cho 10^{10} vp.

Từ các thử nghiệm tạo miễn dịch này rõ ràng rằng vectơ Ad35 và Ad26 nuôi dưỡng chuyển gen RSV.F tạo ra đáp ứng tế bào và thể dịch kháng RSV.F.

Ví dụ 3. Khả năng miễn dịch kháng RSV.F sau khơi mào-tăng cường khác loại sử dụng vectơ adenovirut tái tổ hợp mã hóa RSV.F.

Nghiên cứu này được thiết kế để đánh giá khả năng của các phác đồ khơi mào-tăng cường trên cơ sở vectơ adenovirut chiết xuất từ hai kiểu huyết thanh khác nhau để tạo ra khả năng miễn dịch kháng RSV.F.

Nghiên cứu này liên quan đến chuột BALB/c được phân bổ trong nhóm thử nghiệm gồm 8 chuột. Các con vật được gây miễn dịch bằng cách tiêm trong cơ với 10^{10} vp mang trình tự kiểu đại của gen RSV.F trên cơ sở/chiết xuất từ RSV A2 (Ad-RSV.F hoặc Ad35-RSV.F) hoặc không chuyển gen (Ad26e hoặc Ad35e). Một nhóm con vật được khơi mào ở tuần với Ad26-RSV.F và tăng cường ở tuần 4 với Ad35-RSV.F hoặc Ad35e. Nhóm con vật khác được khơi mào với Ad35-RSV.F và tăng cường ở tuần 4 với Ad26-RSV.F hoặc Ad26e. Nhóm chuột đối chứng được khơi mào với Ad35e và tăng cường ở tuần 4 với Ad26e. Ở tuần 6 và tuần 12 sau khơi mào 8 con vật được hiến ở mỗi thời điểm và đáp ứng tế bào và thể dịch được theo dõi bằng các thử nghiệm miễn dịch học đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực và như được mô tả ở trên.

Fig. 5 thể hiện đáp ứng tế bào ở 6 và 12 tuần sau khơi mào. Ở 6 tuần sau khơi mào (và 2 tuần sau tăng cường), hiệu quả tăng cường đáng kể bởi cả Ad26-RSV.F và Ad35-RSV.F lên đáp ứng của tế bào T được đo, và độ lớn của đáp ứng của tế bào T độc lập với trật tự gây miễn dịch bằng Ad26-RSV.F hoặc Ad35-RSV.F trong khơi mào-tăng cường. Ở 12 tuần sau khơi mào (8 tuần sau tăng cường), chuột được khơi mào bằng Ad26-RSV.F duy trì mức tế bào T đặc hiệu của F cao hoặc trong các con chỉ được khơi mào và các con được khơi mào-tăng cường, so với các con được khơi mào rAd35-RSV.F. Nói chung, lượng lymphoxt đặc hiệu F (SFU) cao và ổn định trong ít nhất 12 tuần ở tất cả các con được gây miễn dịch bằng hoặc rAd26-RSV.F hoặc rAd35-RSV.F (khơi mào/hoặc khơi mào-tăng cường).

Fig. 6 thể hiện đáp ứng thể dịch ở các thời điểm khác nhau sau chủng ngừa khơi mào-tăng cường bằng vectơ adenovirut. Ad35.RSV.F và Ad26.RSV.F khơi mào tốt như nhau, và hiệu quả tăng cường đáng kể được tạo ra bởi hoặc là Ad26.RSV.F hoặc rAd35.RSV.F lên đáp ứng tế bào B được thể hiện. Tuy nhiên, phạm vi đáp ứng

tế bào B trong khơi mào-tăng cường khác loại là độc lập với trật tự gây miễn dịch Ad35.RSV.F và Ad26.RSV.F, và sau các độ chuẩn ELISA tăng cường được giữ ổn định trong 12 tuần.

Fig. 7 thể hiện độ chuẩn của kháng thể trung hòa virus ở các thời điểm khác nhau sau gây miễn dịch khơi mào-tăng cường. Cả vectơ Ad35.RSV.F và Ad26.RSV.F khơi mào tốt như nhau để đạt được các độ chuẩn VNA rõ ràng, như được quan sát đối với các độ chuẩn ELISA. Tương tự, tăng độ chuẩn VNA sau khơi mào-tăng cường khác loại là độc lập với trật tự của gây miễn dịch Ad35.RSV.F và Ad26.RSV.F. Hiệu quả tăng cường bởi hoặc là Ad26.RSV.F hoặc Ad35.RSV.F lên độ chuẩn VNA là đáng kể ở cả hai thời điểm và đạt tối đa ở 6 tuần. Các nhóm chỉ được khơi mào với Ad.RSV.F tăng độ chuẩn VNA ở 12 tuần so với 6 tuần. Trình tự F của RSV trong kết cấu vectơ adenovirus chiết xuất từ phân lập A2 của RSV. Thử nghiệm trung hòa được mô tả theo sáng chế trên cơ sở chủng RSV Long, thuộc nhóm phụ A của RSV, chứng minh rằng các kháng thể tạo ra bởi F (A2) có khả năng làm trung hòa chéo loại phụ chủng A của RSV khác nhau.

Vì protein F của RSV là rất bảo thủ trong số các phân lập RSV, nó đã được thử nghiệm xem huyết thanh từ các con vật được gây miễn dịch bằng vectơ Ad-RSV.F có khả năng làm trung hòa chéo phân lập chủng B của RSV nguyên mẫu, RSV B1. Như thể hiện trên Fig. 8, huyết thanh của chuột được gây miễn dịch cũng có khả năng trung hòa chéo chủng B1. khả năng trung hòa chéo RSV B1 không phụ thuộc vào vectơ được sử dụng trên đó trong nhóm chỉ khơi mào, hoặc trật tự gây miễn dịch khơi mào-tăng cường với vectơ Ad26.RSV.F và Ad35.RSV.F.

Nhìn chung, các dữ liệu này thể hiện rằng phác đồ khơi mào-tăng cường, gây miễn dịch liên tiếp với Ad26.RSV.F và Ad35.RSV.F tạo ra đáp ứng thể dịch và tế bào, và đáp ứng miễn dịch thể dịch bao gồm khả năng trung hòa các phân lập của cả loại phụ A và B của RSV.

Ví dụ 4. Tạo ra sự bảo vệ kháng lây nhiễm RSV sử dụng vectơ adenovirus tái tổ hợp in vivo ở mẫu chuột hại cây bông.

Thử nghiệm này được thực hiện để đánh giá khả năng của các phác đồ khơi mào-tăng cường trên cơ sở vectơ adenovirus chiết xuất từ hai kiểu huyết thanh khác nhau để tạo ra sự bảo vệ kháng sao chép thử thách RSV ở chuột hại cây bông. Chuột hại cây bông (*Sigmodon hispidus*) dễ nhiễm RSV cả hệ hô hấp trên và dưới và được

thấy là dễ hơn ít nhất 50 lần so với các chủng chuột (Niewiesk *et al* , 2002, *Lab. Anim.* 36(4):357-72). Tuy nhiên chuột hại cây bông là mẫu ban đầu đánh giá hiệu quả và độ an toàn của các vacxin tuyển chọn RSV, kháng virus và kháng thể. Dữ liệu tiền lâm sàng được tạo ra ở mẫu chuột hại cây bông nâng cao sự phát triển của hai chế phẩm kháng thể (RespiGam® và Synagis®) cho các thử nghiệm lâm sàng mà không cần nghiên cứu trung gian trên linh trưởng không phải người.

Nghiên cứu kết nạp chuột hại cây bông trong các nhóm thử nghiệm gồm 8 chuột hại cây bông mỗi nhóm. Các con vật được gây miễn dịch bằng cách tiêm trong cơ 10^9 hạt virus (vp) hoặc 10^{10} vp vectơ adenovirus mang gen F (A2) của RSV chiều dài đủ (Ad26.RSV.F hoặc Ad35.RSV.F) hoặc không chuyển gen (Ad26e hoặc Ad35e). Các con vật được tăng cường 28 ngày sau với cùng liều dùng vp, hoặc là với cùng (khởi mào-tăng cường cùng loại) hoặc với kiểu huyết thanh adenovirus khác (khởi mào-tăng cường khác loại); nhóm đối chứng được gây miễn dịch theo đó với vectơ Ad-e, trừ khi chỉ 1 liều được áp dụng (10^{10}). Nhóm đối chứng gồm 6 con vật. Các con vật nhiễm trong mũi với RSV A2 (10^4 đơn vị tạo tấm (pfu)) được sử dụng để làm đối chứng dương đối chứng dương để bảo vệ kháng sao chép thử thách, như đã biết là lây nhiễm ban đầu với virus RSV bảo vệ kháng sao chép thử thách thứ cấp (Prince. *Lab Invest* 1999, 79:1385-1392). Ngoài ra, RSV bất hoạt formalin (FI-RSV) được dùng làm đối chứng cho bệnh mô bệnh học được tăng cường vacxin. Ba tuần sau gây miễn dịch lần thứ hai (tăng cường), chuột hại cây bông được thử thách trong mũi bằng 1×10^5 pfu của tấm-được tinh chế RSV A2. Về đối chứng, một nhóm chuột hại cây bông không được gây miễn dịch nhưng nhận virus thử thách, và nhóm đối chứng khác không được gây miễn dịch và không được thử thách. Chuột hại cây bông được hiến 5 ngày sau lây nhiễm, thời điểm tại đó virus thử thách RSV đạt độ chuẩn đỉnh (Prince. *Lab Invest* 1999, 79:1385-1392), và các độ chuẩn RSV của phổi và mũi được xác định bằng chuẩn độ tấm virus (Prince *et al* . 1978, *Am J Pathology* 93,711-791).

Fig. 9 thể hiện độ chuẩn virus RSV cao ở phổi và mũi được quan sát ở các đối chứng không được gây miễn dịch cũng như các con vật nhận vectơ adenovirus không chuyển gen, tương ứng $5,3 \pm 0,13 \log_{10}$ pfu/gam và $5,4 \pm 0,35 \log_{10}$ pfu. Ngược lại, không virus thử thách có thể phát hiện trong mô phổi và mũi từ các con vật nhận

gây miễn dịch khơi mào-tăng cường bằng vector Ad26.RSV.F và/hoặc Ad35.RSV.F, độc lập với liều dùng hoặc phác đồ.

Các dữ liệu này chứng minh rõ ràng rằng cả vector trên cơ sở Ad35 và trên cơ sở Ad26 đều cho bảo vệ kháng sao chép thử thách RSV trong mẫu chuột hại cây bông. Điều này là ngạc nhiên, vì vector trên cơ sở Ad5 adenovirut mã hóa F của RSV được biết không có khả năng tạo ra bảo vệ toàn diện ở các mẫu con vật sau khi dùng trong cơ.

Trong quá trình thử nghiệm, các mẫu máu được lấy trước khi gây miễn dịch (ngày 0), trước khi gây miễn dịch tăng cường (ngày 28), ở ngày thử thách (ngày 49) và ở ngày hiến (ngày 54). Các huyết thanh được thử nghiệm trong thử nghiệm trung hòa virut trên cơ sở thử nghiệm tấm (VNA) để tạo ra trung hòa kháng thể đặc hiệu của RSV cơ thể như được mô tả by Prince (Prince *et al* . 1978, *Am J Pathology* 93,711-791). Độ chuẩn trung hòa được biểu hiện như độ pha loãng huyết thanh ($\log_2$) tạo ra 50% giảm tấm so với từ các giếng đối chứng chỉ virut (IC_{50}).

Fig. 10 thể hiện rằng các con vật đối chứng không có trung hòa kháng thể virut ở ngày 28 và ngày 49, trong khi đó tạo ra các độ chuẩn VNA cao sau khi các con vật được khơi mào bằng vector Ad26.RSV.F hoặc Ad35.RSV.F. Sự tăng vừa phải về độ chuẩn VNA được quan sát sau khi gây miễn dịch tăng cường. Lây nhiễm ban đầu với virut A2 của RSV tạo ra độ chuẩn VNA vừa phải hơn là tăng dần theo thời gian.

Để đánh giá xem vacxin Ad26.RSV.F hoặc Ad35.RSV.F có thể làm tăng bệnh sau thử thách với A2 của RSV, phân tích mô bệnh học của phổi được thực hiện 5 ngày sau lây nhiễm. Phổi được thu, đổ ngập formalin, tách mô, và nhuộm hematoxylin và eosin để đánh giá mô học. Điểm mô học được làm mờ, theo các tiêu chuẩn công bố bởi Prince (Prince *et al* . *Lab Invest* 1999, 79:1385-1392), và được cho điểm đối với các thông số sau: viêm quanh phế quản, viêm quanh mạch, viêm phổi kẽ, và viêm phế nang. Fig. 11 thể hiện việc cho điểm bệnh phổi của thử nghiệm. Sau thử thách RSV, các con vật được gây miễn dịch FI-RSV thể hiện mô bệnh học tăng cao trên toàn bộ thông số mô bệnh học được đánh giá, so với các con vật được thử thách gây miễn dịch giả, mà được giả định trên cơ sở các nghiên cứu đã công bố trước đây (Prince *et al* . *Lab Invest* 1999, 79:1385-1392). Điểm mô bệnh học ở Ad26.RSV.F và Ad35.RSV.F được gây miễn dịch so với các con vật được gây miễn dịch giả hoặc gây miễn dịch rAd-e, là giống nhau, mặc dù viêm quanh mạch trong các

con vật được gây miễn dịch rAd-RSV.F thể hiện là thấp hơn một chút. Do đó, các vaccin Ad26.RSV.F và Ad35.RSV.F không gây ra bệnh tăng cường, không giống các vaccin FI-RSV.

Toàn bộ chiến lược chủng ngừa tạo ra bảo vệ đầy đủ kháng sao chép thử thách RSV, tạo ra trung hòa kháng thể virus mạnh, và không quan sát thấy tăng cường bệnh. Ví dụ 5. Hiệu quả bảo vệ của vector rAd sử dụng các đường dùng khác nhau sau khi gây miễn dịch đơn

Nghiên cứu này để đánh giá ảnh hưởng của các đường dùng lên hiệu quả bảo vệ tạo ra bởi vector Ad26 hoặc Ad35 mã hóa RSV.F. Vaccin hoặc là được dùng qua đường tiêm bắp hoặc trong mũi.

Chuột hại cây bông được gây miễn dịch đơn bằng 1×10^9 hoặc 1×10^{10} hạt virus (vp) của Ad26 hoặc Ad35 mang hoặc là F của RSV làm chuyển gen (Ad26.RSV.F hoặc Ad35.RSV.F) hoặc không chuyển gen (Ad26-e hoặc Ad35-e) ở ngày 0, được thử thách ở ngày 49 với 10^5 RSV pfu và được hiến ở ngày 54.

Fig. 12 thể hiện các kết quả của thử nghiệm trong đó virus thử thách ở phổi và mũi được xác định. Độ chuẩn virus RSV cao được phát hiện ở phổi và mũi của chuột không được gây miễn dịch hoặc được gây miễn dịch bằng vector adenovirus không chuyển gen, tương ứng $4,9 \pm 0,22 \log_{10}$ pfu/gam và $5,4 \pm 0,16 \log_{10}$ pfu. Ngược lại, phổi và mũi từ các con vật nhận hoặc là Ad35-RSV.F hoặc Ad26-RSV.F không có sao chép virus thử thách, độc lập với đường dùng và liều dùng.

Các dữ liệu này chứng minh một cách đáng ngạc nhiên rằng mỗi một trong số các vector Ad26- và Ad35- trên cơ sở mã hóa protein F của RSV cho bảo vệ toàn diện ở các thử nghiệm thử thách của chuột hại cây bông, độc lập với đường dùng của vector. Điều này bất ngờ, vì không có vaccin RSV trên cơ sở adenovirus nào đã công bố, mà trên cơ sở các kiểu huyết thanh khác, đã chứng minh sự bảo vệ toàn diện sau khi chủng ngừa trong cơ.

Trong quá trình thử nghiệm, các mẫu máu được lấy trước khi gây miễn dịch (ngày 0), 4 tuần sau khi gây miễn dịch (ngày 28), và ở ngày thử thách (ngày 49). Huyết thanh được thử nghiệm trong thử nghiệm trung hòa để tạo ra kháng thể đặc hiệu RSV (Fig. 13). Trước khi gây miễn dịch không có trung hòa kháng thể virus được thấy trong chuột hại cây bông bất kỳ. Tất cả các chiến lược gây miễn dịch vector adenovirus, độc lập với đường dùng, rõ ràng tạo ra các độ chuẩn VNA, mà vẫn ổn

định theo thời gian. Các dữ liệu này chứng minh một cách đáng ngạc nhiên rằng mỗi một trong số các vectơ Ad26- và Ad35- trên cơ sở mã hóa protein F của RSV cho các chuẩn độ cao của trung hòa kháng thể virus ở các thử nghiệm gây miễn dịch ở chuột hại cây bông, độc lập với đường dùng của vectơ.

Để đánh giá xem gây miễn dịch đơn của vacxin Ad26.RSV.F hoặc Ad35.RSV.F có thể tạo ra bệnh tăng cường vacxin sau thử thách với A2 của RSV, phân tích mô bệnh học của phổi được thực hiện 5 ngày sau lây nhiễm (Fig. 14). Gây miễn dịch đơn với rAd26.RSV.F hoặc rAd35.RSV.F tạo ra các điểm bệnh lý miễn dịch giống nhau ở rAd26.RSV.F hoặc rAd35.RSV.F được gây miễn dịch so với các con vật được gây miễn dịch rAd-e hoặc gây miễn dịch giả, như quan sát ở các thử nghiệm gây miễn dịch khơi mào-tăng cường được mô tả ở trên. Rõ ràng là, bệnh trầm trọng không quan sát thấy, ngược lại với các con vật được khơi mào với FI-RSV. Các điểm mô bệnh học của các con vật được gây miễn dịch bằng vectơ rAd được so với các con vật lây nhiễm giả.

Kết luận là, tất cả các chiến lược chủng ngừa liều đơn tạo ra bảo vệ toàn diện kháng sao chép thử thách RSV, tạo ra trung hòa kháng thể virus mạnh và không thể hiện tăng bệnh lý.

Ví dụ 6. Vectơ với các biến thể như các đoạn của F của RSV hoặc với trình tự khởi đầu phiên mã tùy ý thể hiện tính gây miễn dịch tương tự

Các ví dụ ở trên được thực hiện với vectơ biểu hiện F của RSV kiểu đại. Mặt khác, các dạng cắt cụt hoặc biến đổi của F đã được cấu tạo trong rAd35, đề xuất các phương án của các đoạn của F của RSV trong vectơ adenovirus. Dạng cắt cụt hoặc biến đổi F này bao gồm dạng cắt cụt của RSV-F trong đó vùng tế bào chất và vùng xuyên màng là thiếu (cụ thể là chỉ đoạn ectodomain còn lại), và dạng đoạn của RSV-F với sự cắt cụt vùng tế bào chất và vùng xuyên màng và loại bỏ khác bên trong trong ectodomain và thêm vùng trimer hóa. Các vectơ này không cải thiện các đáp ứng so với rAd35.RSV.F với protein F chiều dài đủ.

Ngoài ra, vectơ rAd35 khác với trình tự khởi đầu phiên mã thay thế khác dẫn đến biểu hiện của F của RSV kiểu đại, đã được cấu tạo.

Khả năng miễn dịch di truyền của các dạng biến đổi của RSV. F và các biến thể của trình tự khởi đầu phiên mã được so sánh trong mẫu chuột và so với Ad35.RSV.F mà biểu hiện F kiểu đại. Tất cả vectơ Ad35 chứa các biến thể F này

hoặc các biến thể trình tự khởi đầu phiên mã thể hiện đáp ứng trong cùng trật tự phạm vi như Ad35.RSV.F .

Ví dụ 7. Bảo vệ ngắn hạn kháng RSV lây nhiễm sau khi gây miễn dịch bằng vector adenovirut tái tổ hợp in vivo ở mẫu chuột hại cây bông.

Thử nghiệm này xác định khả năng kích thích nhanh bảo vệ bởi vector adenovirut biểu hiện protein -F của RSV trong mẫu chuột hại cây bông. Nhằm mục đích này, chuột hại cây bông được gây miễn dịch bằng liều tiêm bắp đơn của 10^7 , 10^8 hoặc 10^9 hạt virus (vp) vector adenovirut mang gen F (A2) của RSV chiều dài đủ (Ad26.RSV.F) hoặc không chuyển gen (Ad26e) ở ngày 0 hoặc ở ngày 21. Các con vật nhiễm RSV A2 qua mũi (10^4 tấm tạo đơn vị (pfu)) được dùng làm đối chứng dương để bảo vệ kháng sao chép thử thách, như đã biết rằng lây nhiễm ban đầu với virus RSV bảo vệ kháng sao chép thử thách thứ cấp (Prince. *Lab Invest* 1999, 79:1385-1392). ở ngày 49, bảy hoặc bốn tuần sau khi gây miễn dịch, chuột hại cây bông được thử thách trong mũi với 1×10^5 pfu của tấm-được tinh chế RSV A2. Chuột hại cây bông được hiến 5 ngày sau lây nhiễm, thời điểm tại đó virus thử thách RSV đạt các độ chuẩn đỉnh (Prince. *Lab Invest* 1999, 79:1385-1392), và các độ chuẩn RSV phổi và mũi được xác định bởi chuẩn độ tấm virus (Prince *et al* . 1978, *Am J Pathology* 93,711-791). Fig. 16A và Fig. 16B thể hiện độ chuẩn virus RSV cao ở phổi và ở mũi quan sát thấy ở các con vật nhận vector adenovirut không chuyển gen, tương ứng $4,8 \pm 0,11 \log_{10}$ pfu/gam và $5,1 \pm 0,32 \log_{10}$ pfu/gam. Ngược lại, không virus thử thách được phát hiện ở mô phổi và mũi từ các con vật nhận gây miễn dịch bằng vector Ad26.RSV.F, độc lập về thời gian giữa gây miễn dịch và thử thách. Thử nghiệm này chỉ ra rõ ràng rằng kích thích nhanh của bảo vệ kháng sao chép virus thử thách bởi Ad26 biểu hiện RSV-F. Mẫu máu được lấy từ chuột hại cây bông được gây miễn dịch ở ngày 0, ở ngày 28 và ở ngày thử thách (ngày 49). Huyết thanh được thử trong thử nghiệm trung hòa để tạo ra kháng thể đặc hiệu RSV (Fig. 17) Gây miễn dịch bằng vector adenovirut tạo ra các độ chuẩn VNA phụ thuộc liều dùng. Fig 18 thể hiện các con vật đối chứng không có trung hòa kháng thể virus ở ngày 28 và ngày 49, trong khi các độ chuẩn VNA cao được tạo ra ở các con vật 28 hoặc 49 ngày sau gây miễn dịch với 10^7 đến 10^9 Ad26.RSV.F vp. Lây nhiễm ban đầu bằng virus A2 của RSV tạo ra các độ chuẩn VNA vừa phải hơn là tăng dần theo thời gian. Thử nghiệm này chỉ ra rõ

ràng kích thích nhanh của bảo vệ kháng sao chép virus thử thách bởi Ad26 biểu hiện RSV-F.

Ví dụ 8. Bảo vệ kháng lây nhiễm nhóm phụ A và nhóm phụ B của RSV sau khi gây miễn dịch bằng vector adenovirus tái tổ hợp *in vivo* ở mẫu chuột hại cây bông.

Chủng RSV có thể được chia thành hai nhóm phụ, nhóm phụ A và B. Sự chia nhóm phụ này là trên cơ sở sự khác nhau về tính kháng nguyên của glycoprotein G biến đổi cao. Trình tự của protein F được bảo thủ cao hơn nhưng cũng được xếp vào các nhóm phụ A và B giống nhau. Ví dụ 3 được mô tả rằng huyết thanh của chuột được gây miễn dịch bằng vector Ad-RSV.F cũng có khả năng trung hòa chéo chủng B1 *in vitro*. Fig 19 thể hiện rõ rằng huyết thanh chuột hại cây bông chiết xuất từ chuột hại cây bông được gây miễn dịch bằng Ad26.RSV-FA₂ thể hiện các độ chuẩn VNA cao ở ngày 49 sau gây miễn dịch kháng RSV-A Long (nhóm phụ A) và Bwash (nhóm phụ B, ATCC #1540). Sau đó, bảo vệ *in vivo* kháng hoặc là thử thách nhóm phụ A hoặc B được xác định ở chuột hại cây bông bằng các liều dùng adenovirus vector thấp nằm trong khoảng từ 10^6 đến 10^8 vp. Nhằm mục đích này chuột hại cây bông được chia thành các nhóm thử nghiệm gồm 8 chuột hại cây bông mỗi nhóm. Các con vật được gây miễn dịch ở ngày 0 bằng cách tiêm trong cơ 10^6 , 10^7 , hoặc 10^8 hạt virus (vp) vector adenovirus mang gen F (A2) của RSV chiều dài đủ (Ad26.RSV.F) hoặc không chuyển gen (Ad26e) ở ngày 0. ở ngày 49 các con vật được thử thách trong mũi bằng hoặc là 10^5 pfu RSV-A2 (chủng RSV-A) hoặc RSV-B 15/97 (chủng RSV-B). Fig. 20 thể hiện độ chuẩn virus RSV cao ở phổi và ở mũi quan sát thấy ở các con vật nhận vector adenovirus không chuyển gen. Ngược lại, không hoặc hạn chế virus thử thách được phát hiện ở mô phổi và mũi của các con vật đã gây miễn dịch bằng Ad26.RSV.F. Chỉ có những khác biệt nhỏ quan sát thấy về bảo vệ khi thử thách bằng hoặc là RSV-A2 hoặc RSV-B 15/97. Ad26.RSV.FA₂ thể hiện bảo vệ toàn diện kháng sao chép thử thách ở phổi khi sử dụng các liều dùng 10^8 và 10^7 vp, và vượt giới hạn khác thường ở 10^6 vp Ad26.RSV.FA₂. Xu hướng tương tự được thấy để bảo vệ kháng sao chép virus thử thách ở mũi, mặc dù sự vượt một phần được thấy ở tất cả các con vật ở 10^6 và 10^7 vp Ad26.RSV.FA₂, mặc dù thấp hơn ở nhóm đối chứng (Fig 21). Trong quá trình thử nghiệm, mẫu máu được lấy ở ngày thử thách (ngày 49). Huyết thanh được thử trong thử nghiệm trung hòa để tạo ra kháng thể đặc hiệu RSV (Fig 22). Ví dụ này chứng minh rằng vector adenovirus ở các liều

dùng thấp bằng 10^6 đến 10^8 vp Ad26.RSV thể hiện đáp ứng liều dùng của các độ chuẩn VNA kháng A2 của RSV. Trước khi gây miễn dịch không virus trung hòa kháng thể được thấy ở chuột hại cây bông bất kỳ.

Ad26.RSV.F được chứng minh là ở mức độ nào đó tốt hơn Ad35.RSV.F, vì cái sau thể hiện vượt nhất định ở các thử nghiệm thử thách ở mũi ở liều dùng bằng 10^8 vp.

Ví dụ 9. Bảo vệ kháng liều dùng thử thách cao của RSV-A2 sau khi gây miễn dịch bằng vector adenovirus tái tổ hợp in vivo ở mẫu chuột hại cây bông.

Ví dụ này xác định bảo vệ kháng liều dùng thử thách cao bằng 5×10^5 pfu so với liều dùng tiêu chuẩn bằng 1×10^5 pfu RSV-A2. Nghiên cứu kết nạp chuột hại cây bông trong các nhóm thử nghiệm gồm 8 chuột hại cây bông mỗi nhóm. Các con vật được gây miễn dịch bằng cách tiêm trong cơ đơn liều bằng 10^7 hoặc 10^8 hạt virus (vp) vector adenovirus mang gen F (A2) của RSV chiều dài đủ (Ad26.RSV.F) hoặc không chuyển gen (Ad26e) ở ngày 0. Các con vật được lây nhiễm trong mũi bằng A2 của RSV (10^4 tấm tạo đơn vị (pfu) được sử dụng làm đối chứng dương để bảo vệ kháng sao chép thử thách. Chuột hại cây bông được hiến 5 ngày sau lây nhiễm, và các độ chuẩn RSV phổi và mũi được xác định bởi chuẩn độ tấm virus. Fig. 23 thể hiện liều dùng thử thách cao hơn tạo ra tải virus ở phổi cao hơn ở các con vật nhận vector adenovirus không chuyển gen hơn là liều dùng thử thách tiêu chuẩn. Các con vật được gây miễn dịch bằng 10^7 hoặc 10^8 vp vector Ad26.RSV.F được bảo vệ hoàn toàn kháng các độ chuẩn thử thách RSV cao và tiêu chuẩn ở phổi. Fig 24 thể hiện các con vật được gây miễn dịch bằng 10^8 vp vector Ad26.RSV.F được bảo vệ hoàn toàn kháng các độ chuẩn thử thách RSV cao và tiêu chuẩn ở mũi, trong khi các con vật được gây miễn dịch bằng 10^7 vp vector Ad26.RSV.F được bảo vệ một phần kháng các độ chuẩn thử thách RSV cao và tiêu chuẩn.

Ví dụ 10. Bảo vệ dài hạn kháng RSV-A2 và RSV-B15/97 sau khi gây miễn dịch bằng vector adenovirus tái tổ hợp in vivo ở mẫu chuột hại cây bông.

Ví dụ này xác định tính bền của bảo vệ kháng RSV-A2 và RSV-B15/97 sau khi gây miễn dịch bằng vector adenovirus tái tổ hợp in vivo ở mẫu chuột hại cây bông. Nghiên cứu kết nạp chuột hại cây bông trong các nhóm thử nghiệm gồm 6 chuột hại cây bông mỗi nhóm. Các con vật được gây miễn dịch bằng cách tiêm trong cơ 10^8 hạt virus (vp) hoặc 10^{10} vp vector adenovirus mang gen F (A2) của RSV chiều dài đủ (Ad26.RSV.F) hoặc không chuyển gen (Ad26e hoặc Ad35e). Các con vật được tăng

cường 28 ngày sau bằng cùng liều dùng vp, hoặc là bằng cùng vector (Ad26.RSV.F) (khởi mào-tăng cường cùng loại) hoặc bằng Ad35.RSV.F adenovirut (khởi mào-tăng cường khác loại); nhóm đối chứng được gây miễn dịch theo đó bằng vector Ad-e, ngoại trừ chỉ một 1 liều dùng được áp dụng (10^{10}). Một số nhóm không nhận gây miễn dịch tăng cường. Nhóm đối chứng gồm 6 con vật. Các con vật được lây nhiễm trong mũi bằng RSV A2 và B15/97 (10^4 tấm tạo đơn vị (pfu) được sử dụng làm đối chứng dương để bảo vệ kháng sao chép thử thách. Thử thách ở 210 ngày sau gây miễn dịch lần thứ nhất.

Fig. 25 thể hiện độ chuẩn virut RSV cao ở phổi và ở mũi được thấy ở các con vật nhận vector adenovirut không chuyển gen. Ngược lại, không virut thử thách có thể phát hiện ở mô phổi của các con vật được gây miễn dịch bằng Ad26.RSV.F và/hoặc Ad35.RSV.F. Không virut thử thách RSV-A2 có thể phát hiện ở mô mũi của các con vật được gây miễn dịch bằng Ad26.RSV.F và/hoặc Ad35.RSV.F. Thử thách bằng RSV-B15/97 tạo ra sao chép virut giới hạn trong các mô mũi của các con vật được gây miễn dịch bằng Ad26.RSV.F và/hoặc Ad35.RSV.F, ngoại trừ các con vật nhận khởi mào Ad26.RSV.F sau đó tăng cường Ad35.RSV.F với 10^{10} vp. Fig 26 thể hiện các độ chuẩn kháng thể trung hòa virut ở 140 ngày sau gây miễn dịch. Gây miễn dịch chỉ bằng khởi mào bằng vector adenovirut hoặc khởi mào tăng cường bằng các liều 10^8 và 10^{10} vp thể hiện đáp ứng liều của các độ chuẩn VNA bền trong ít nhất 4,5 tháng sau gây miễn dịch. Tuy nhiên các độ chuẩn quan sát được cao hơn các độ chuẩn trung hòa tạo ra bởi gây miễn dịch trong mũi ban đầu. Hiệu quả tăng cường rõ ràng bởi hoặc là Ad26.RSV.F hoặc Ad35.RSV.F lên các độ chuẩn VNA được quan sát thấy.

Kết luận là, ví dụ này thể hiện các độ chuẩn VNA kéo dài sau gây miễn dịch với các liều dùng đơn hoặc kép của Ad26.RSV.F hoặc Ad35.RSV.F, và bảo vệ đầy đủ dài hạn trong phổi và mũi kháng thử thách virut cùng loại kết hợp với bảo vệ đầy đủ dài hạn trong phổi và bảo vệ một phần trong mũi kháng thử thách virut khác loại.

Ví dụ 11. Vắng mặt bệnh lý miễn dịch tăng cường vaccin sau khi gây miễn dịch bằng vector adenovirut tái tổ hợp in vivo ở mẫu chuột hại cây bông

Để đánh giá xem vaccin Ad26.RSV.F có thể làm tăng bệnh sau khi thử thách bằng A2 của RSV, phân tích mô bệnh học của phổi được thực hiện 2 và 6 ngày sau lây nhiễm. Hai ngày sau thử thách, đáp ứng tức thì (bao gồm thâm nhiễm bạch cầu trung tính ở phổi) đạt đỉnh, trong khi thay đổi hơi cấp như thâm nhiễm lymphoxt đạt

đinh ở ngày 6 sau lây nhiễm (Prince et al., J Virol, 1986, 57:721-728). Nghiên cứu kết nạp chuột hại cây bông trong các nhóm thử nghiệm gồm 12 chuột hại cây bông mỗi nhóm. Các con vật được gây miễn dịch bằng cách tiêm trong cơ 10^8 hạt virus (vp) hoặc 10^{10} vp vector adenovirus mang gen F (A2) của RSV chiều dài đủ (Ad26.RSV.F) hoặc không chuyển gen (Ad26e). Một số nhóm được tăng cường 28 ngày sau bằng cùng liều dùng vp với cùng vector (Ad26.RSV.F) (khởi mào-tăng cường cùng loại); nhóm đối chứng được gây miễn dịch sau đó bằng vector Ad-e, except that ngoại trừ chỉ 1 liều dùng được áp dụng (10^{10}). Nhóm đối chứng gồm 12 con vật. Các con vật được lây nhiễm trong mũi bằng RSV A2 (10^4 tấm tạo đơn vị (pfu)) được sử dụng làm đối chứng dương để bảo vệ kháng sao chép thử thách. FI-RSV được gây miễn dịch các con vật được sử dụng làm đối chứng cho bệnh tăng cường. Phổi được thu, đồ ngập formalin, tách mô, và nhuộm hematoxylin và eosin để đánh giá mô học. Điểm mô bệnh học được làm mờ, theo tiêu chuẩn được công bố bởi Prince (Prince *et al.* Lab Invest 1999, 79:1385-1392), và được cho điểm cho các thông số sau: viêm quanh phế quản, viêm quanh mạch, viêm phổi kẽ, và viêm phế nang. Cho điểm bệnh lý phổi của thử nghiệm này được mô tả trên Fig. 27 cho ngày 2 và trên Fig 28 cho ngày 6. Sau thử thách RSV, các con vật được gây miễn dịch bằng FI-RSV thể hiện ở ngày 2 và ngày 6 mô bệnh học tăng trên toàn bộ thông số mô bệnh học được đánh giá so với các con vật được gây miễn dịch giả và được thử thách, mà có thể xảy ra trên cơ sở các nghiên cứu trước đây. Các điểm mô bệnh học ở tất cả các nhóm được gây miễn dịch bằng vector Ad26.RSV.F có thể so với các con vật được gây miễn dịch giả ở ngày 2 và ở ngày 6 sau thử thách luôn có điểm thấp hơn được thử thách gây miễn dịch giả (Ad26.e). Vì vậy, vaccine Ad26.RSV.F không gây ra bệnh tăng cường, không giống vaccine FI-RSV.

Ví dụ 12. Khởi mào Ad26.RSV.F được tăng cường bằng protein F tái tổ hợp tạo ra đáp ứng lệch Th1 ở mẫu chuột.

Trong ví dụ này phân tích xem đáp ứng miễn dịch đối với khởi mào Ad26.RSV.F có thể được tăng cường bằng cách tăng cường bằng protein F bổ trợ của RSV tái tổ hợp. Nhằm mục đích này chuột được chia thành các nhóm thử nghiệm gồm 7 chuột mỗi nhóm. Các con vật được gây miễn dịch ở ngày 0 bằng cách tiêm trong cơ 10^{10} hạt virus (vp) vector adenovirus mang gen F (A2) của RSV chiều dài đủ

(Ad26.RSV.F) hoặc PBS. ở ngày 28 các con vật được tăng cường tiêm bắp bằng hoặc là cùng vectơ cùng liều, hoặc bằng protein bổ trợ F của RSV (chiều dài đủ; cấu hình sau dung hợp: sau F) (ở 2 liều dùng: 5 μ g và 0,5 μ g). Fig. 29 thể hiện rõ ràng rằng huyết tương chiết xuất từ chuột được gây miễn dịch bằng Ad26.RSV-F_{A2} và được tăng cường bằng F bổ trợ của RSV thể hiện các độ chuẩn VNA cao ở 12 tuần sau gây miễn dịch kháng RSV-A Long (nhóm phụ A). Fig. 30 thể hiện tỷ lệ IgG2a/IgG1 trong huyết thanh của chuột được gây miễn dịch bằng Ad26.RSV-F_{A2} và được tăng cường bằng protein bổ trợ F của RSV. Tỷ lệ cao là một dấu hiệu của đáp ứng cân bằng Th1, trong khi tỷ lệ thấp chỉ ra đáp ứng lệch Th2. Rõ ràng, các con vật được gây miễn dịch bằng Ad26.RSV.F, được tăng cường với hoặc là Ad26.RSV.F hoặc protein F của RSV tạo ra tỷ lệ IgG2a/IgG1 cao, trong khi chuột đối chứng được gây miễn dịch bằng FI-RSV hoặc protein F của RSV (không có bối cảnh của vectơ adenovirus) tạo ra tỷ lệ thấp. Do đáp ứng lệch Th1 là rất mong muốn trong vaccin RSV để tránh bệnh tăng cường theo thử thách và tạo ra trí nhớ tế bào T mạnh, đáp ứng lệch Th2 của gây miễn dịch bằng protein có thể nhắm đến đáp ứng Th1 khi khơi mào Ad26.RSV.F được áp dụng. Fig. 31 thể hiện đáp ứng tế bào ở lá lách chiết xuất từ chuột được gây miễn dịch bằng Ad26.RSV-F_{A2} và được tăng cường bằng protein bổ trợ F của RSV. Có thể thấy rõ rằng tăng cường bằng protein bổ trợ F của RSV sẽ làm tăng mạnh đáp ứng tế bào.

Bảng 1. trình tự

SEQ ID NO: 1: Trình tự axit amin của protein dung hợp RSV (Genbank ACO83301.1):

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYT
SVITIELSNIKKKNCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRA
RRELPRFMNYTLNNAKKTNTLSKKRKRRLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLH
LEGEVNIKISALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVKNKQSC
SISNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVTTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPIT
NDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSP
LCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAV.V.KVQSNRVFCDTMNS
LTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASN
KNRGIKTFNSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPIINFY
DPLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAVKSTTNIMITTHIVII
VILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIASFN

SEQ ID NO: 2: đơn vị mã tối ưu gen RSV.F(A2)nat mã hóa cho protein dung hợp RSV

ATGGAAGTGTGATCCTGAAGGCCAACGCCATCACCACCATCCTGACCGC
CGTGACCTTCTGCTTCGCCAGCGGCCAGAACATCACCAGGAATTCTACC
AGAGCACCTGTAGCGCCGTGTCCAAGGGCTACCTGAGCGCCCTGCGGACC
GGCTGGTACACCAGCGTGATCACCATCGAGCTGAGCAACATCAAAAAGA
ACAAGTGCAACGGCACCGACGCCAAAATCAAGCTGATCAAGCAGGAACT
GGACAAGTACAAGAACGCCGTGACCGAGCTGCAGCTGCTGATGCAGAGC
ACCCCCGCCACCAACAACCGGGCCAGACGGGAGCTGCCCCGGTTCATGAA
CTACACCCTGAACAACGCCAAAAGACCAACGTGACCCTGAGCAAGAAG
CGGAAGCGGCGGTTCCTGGGCTTCCTGCTGGGCGTGGGCAGCGCCATTGC
TAGCGGAGTGGCTGTGTCTAAGGTGCTGCACCTGGAAGGCGAAGTGAACA
AGATCAAGTCCGCCCTGCTGAGCACCAACAAGGCCGTGGTGTCCCTGAGC
AACGGCGTGTCCGTGCTGACCAGCAAGGTGCTGGATCTGAAGAACTACAT
CGACAAGCAGCTGCTGCCCATCGTGAACAAGCAGAGCTGCAGCATCAGC
AACATCGAGACAGTGATCGAGTTCCAGCAGAAGAACAACCGGCTGCTGG
AAATCACCCGCGAGTTCAGCGTGAACGCCGGCGTGACCACCCCGTGTCC
ACCTACATGCTGACCAACAGCGAGCTGCTGAGCCTGATCAACGACATGCC
CATCACCAACGACCAGAAAAAGCTGATGAGCAACAACGTGCAGATCGTG
CGGCAGCAGAGCTACTCCATCATGTCCATCATCAAAGAAGAGGTGCTGGC
CTACGTGGTGCAGCTGCCCCTGTACGGCGTGATCGACACCCCTGCTGGA
AGCTGCACACCAGCCCCCTGTGCACCACCAACACCAAAGAGGGCAGCAA
CATCTGCCTGACCCGGACCGACCGGGGCTGGTACTGCGATAATGCCGGCA
GCGTGTCAATTCTTTCCACAAGCCGAGACATGCAAGGTGCAGAGCAACCGG
GTGTTCTGCGACACCATGAACAGCCTGACCCTGCCAGCGAGGTGAACCT
GTGCAACGTGGACATCTTCAACCCTAAGTACGACTGCAAGATCATGACCT
CCAAGACCGACGTGTCCAGCTCCGTGATCACCTCCCTGGGCGCCATCGTG
TCCTGCTACGGCAAGACCAAGTGCACCGCCAGCAACAAGAACCGGGGCA

TCATCAAGACCTTCAGCAACGGCTGCGACTACGTGTCCAACAAGGGCGTG
GACACCGTGTCCGTGGGCAACACCCTGTACTACGTGAACAAACAGGAAG
GCAAGAGCCTGTACGTGAAGGGCGAGCCCATCATCAACTTCTACGACCCC
CTGGTGTTCCCCAGCGACGAGTTCGACGCCAGCATCAGCCAGGTCAACGA
GAAGATCAACCAGAGCCTGGCCTTCATCAGAAAGAGCGACGAGCTGCTG
CACAATGTGAATGCCGTGAAGTCCACCACCAATATCATGATCACCACAAT
CATCATCGTGATCATCGTCATCCTGCTGTCCCTGATCGCCGTGGGCCTGCT
GCTGTACTGCAAGGCCCGGTCCACCCCTGTGACCCTGTCCAAGGACCAGC
TGAGCGGCATCAACAATATCGCCTTCTCCAAC

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Vacxin kháng virus hợp bào hô hấp (RSV), chứa adenovirus tái tổ hợp ở người có kiểu huyết thanh 26 bao gồm axit nucleic mã hóa protein F của RSV hoặc đoạn của chúng.
2. Vacxin theo điểm 1, trong đó adenovirus tái tổ hợp bao gồm axit nucleic mã hóa protein F của RSV bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1.
3. Vacxin theo điểm bất kỳ trong số các điểm trên, trong đó axit nucleic mã hóa protein F của RSV là đơn vị mã được tối ưu để biểu hiện trong tế bào của người.
4. Vacxin theo điểm bất kỳ trong số các điểm trên, trong đó axit nucleic mã hóa protein F của RSV bao gồm trình tự axit nucleic của SEQ ID NO: 2.
5. Vacxin theo điểm bất kỳ trong số các điểm trên, trong đó adenovirus tái tổ hợp ở người có loại bỏ trong vùng E1, loại bỏ trong vùng E3, hoặc loại bỏ trong cả hai vùng E1 và E3 của bộ gen adenovirus.
6. Vacxin theo điểm bất kỳ trong số các điểm trên, trong đó adenovirus tái tổ hợp có bộ gen bao gồm ở đầu tận cùng 5' trình tự CTATCTAT.
7. Tế bào chủ được phân lập chứa adenovirus tái tổ hợp ở người có kiểu huyết thanh 26 bao gồm axit nucleic mã hóa protein F của RSV hoặc đoạn của chúng.
8. Phương pháp sản xuất vacxin kháng virus hợp bào hô hấp (RSV), trong đó phương pháp này bao gồm các bước: tạo ra adenovirus tái tổ hợp ở người có kiểu huyết thanh 26 bao gồm axit nucleic mã hóa protein F của RSV hoặc đoạn của chúng, nhân lên adenovirus tái tổ hợp này trong môi trường nuôi cấy của tế bào chủ, phân lập và tinh sạch adenovirus tái tổ hợp, và bào chế adenovirus tái tổ hợp trong chế phẩm được dùng.
9. Axit nucleic tái tổ hợp được phân lập mà tạo thành bộ gen của adenovirus tái tổ hợp ở người có kiểu huyết thanh 26 bao gồm axit nucleic mã hóa protein F của RSV hoặc đoạn của chúng.

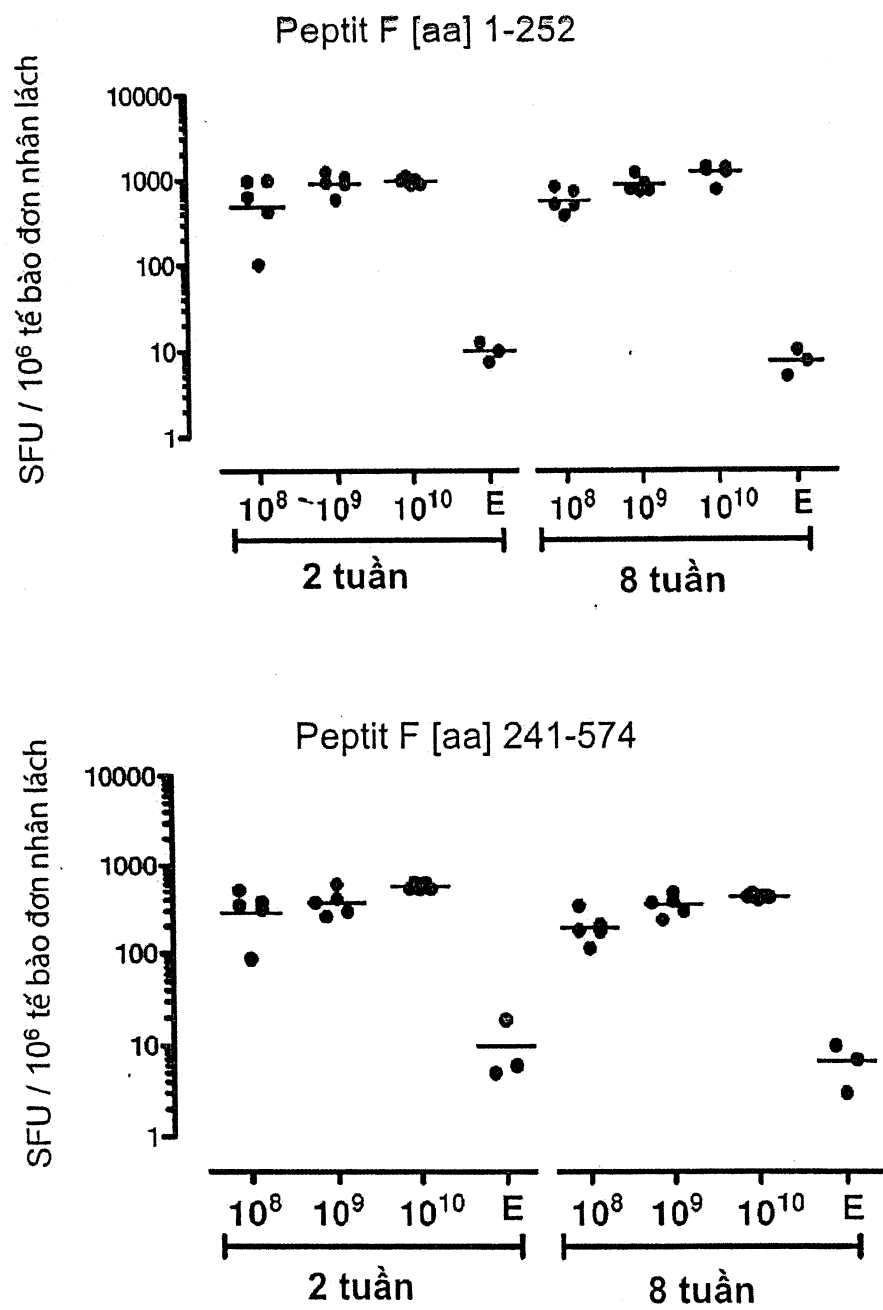


Fig. 1A

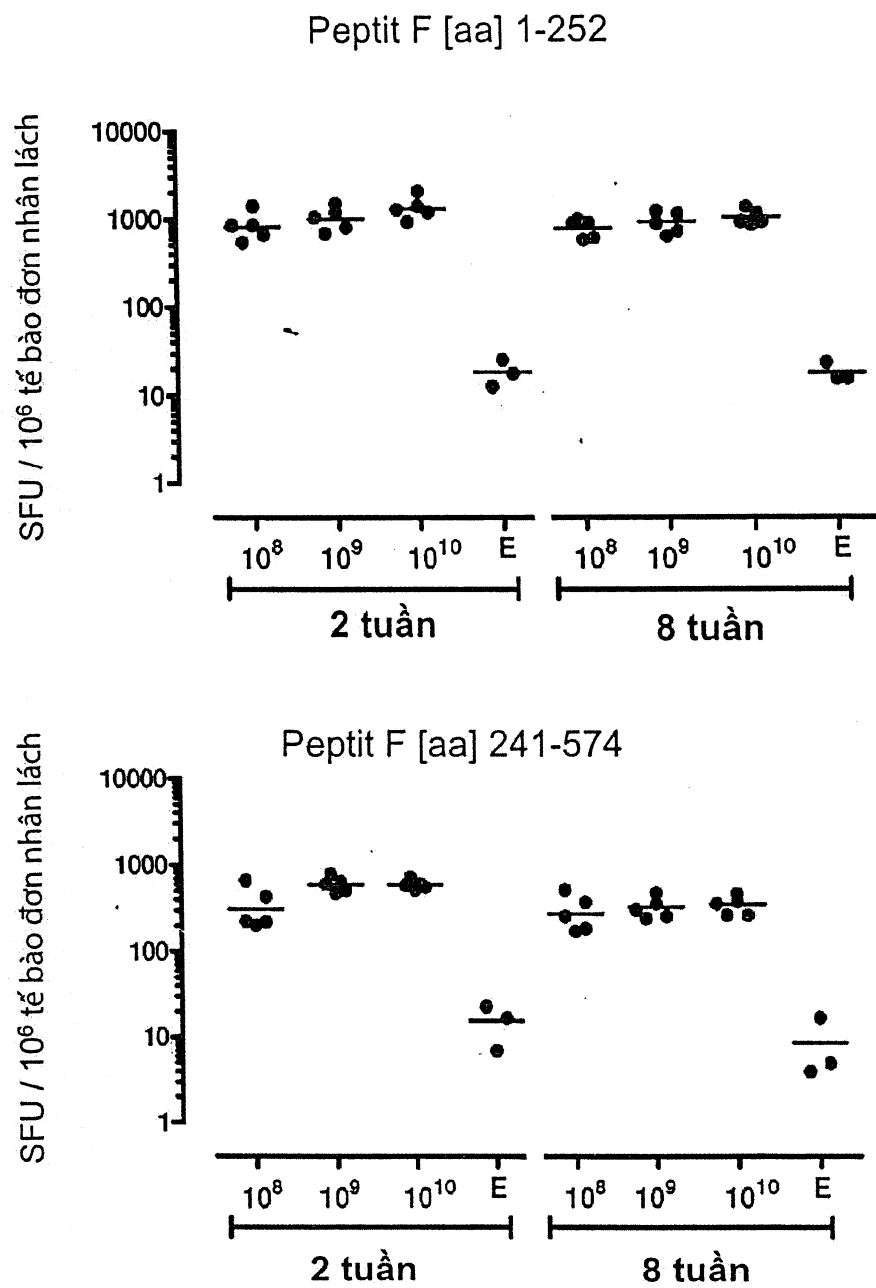
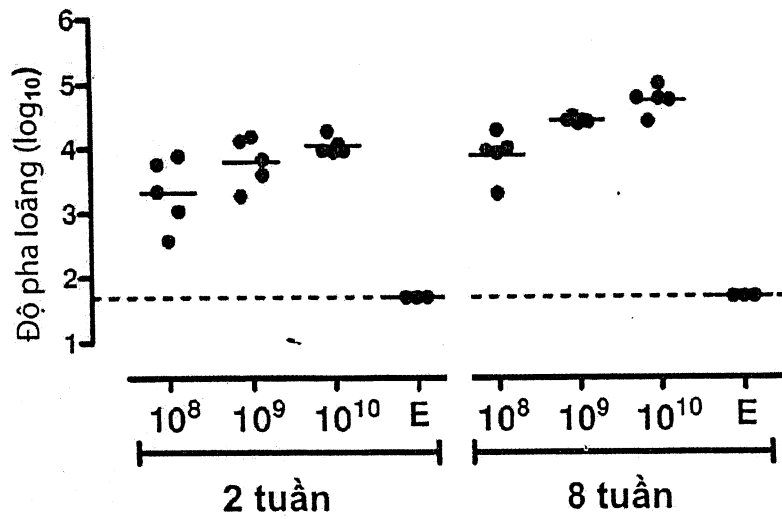


Fig. 1B

A) Ad26-RSV.F



B) Ad35-RSV.F

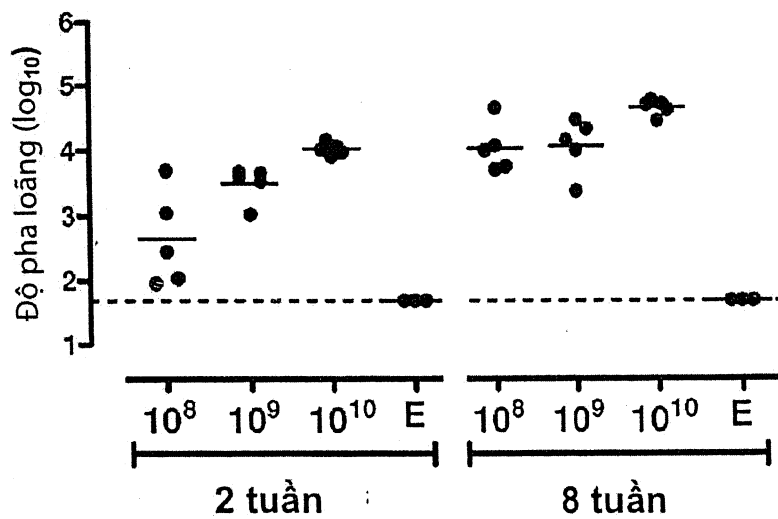


Fig. 2

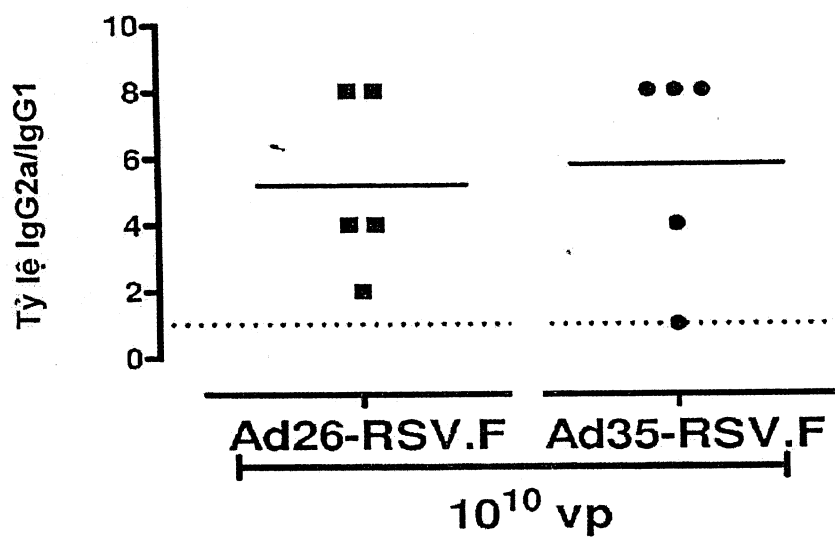
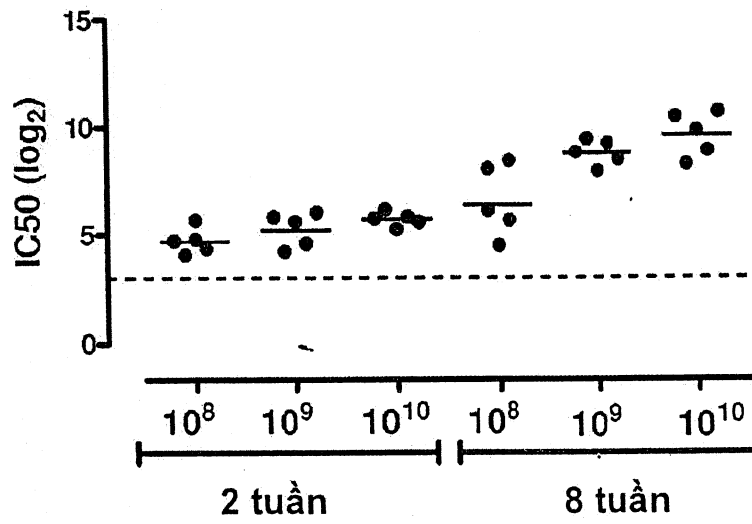


Fig. 3

A) Ad26-RSV.F



B) Ad35-RSV.F

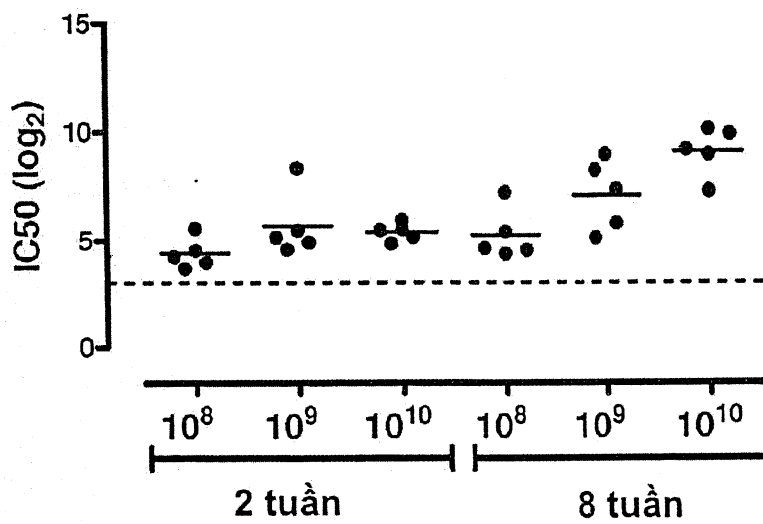


Fig. 4

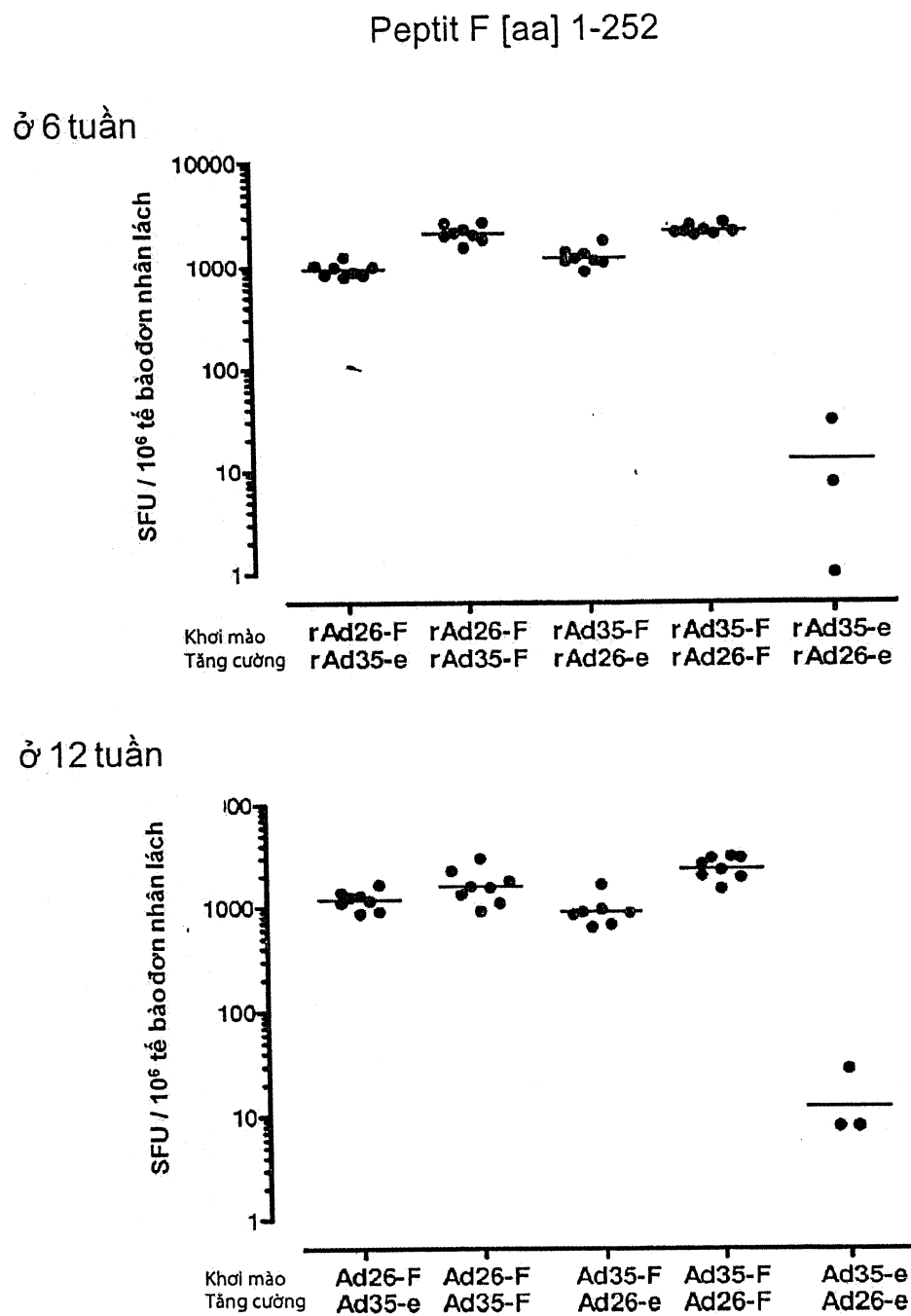


Fig. 5A

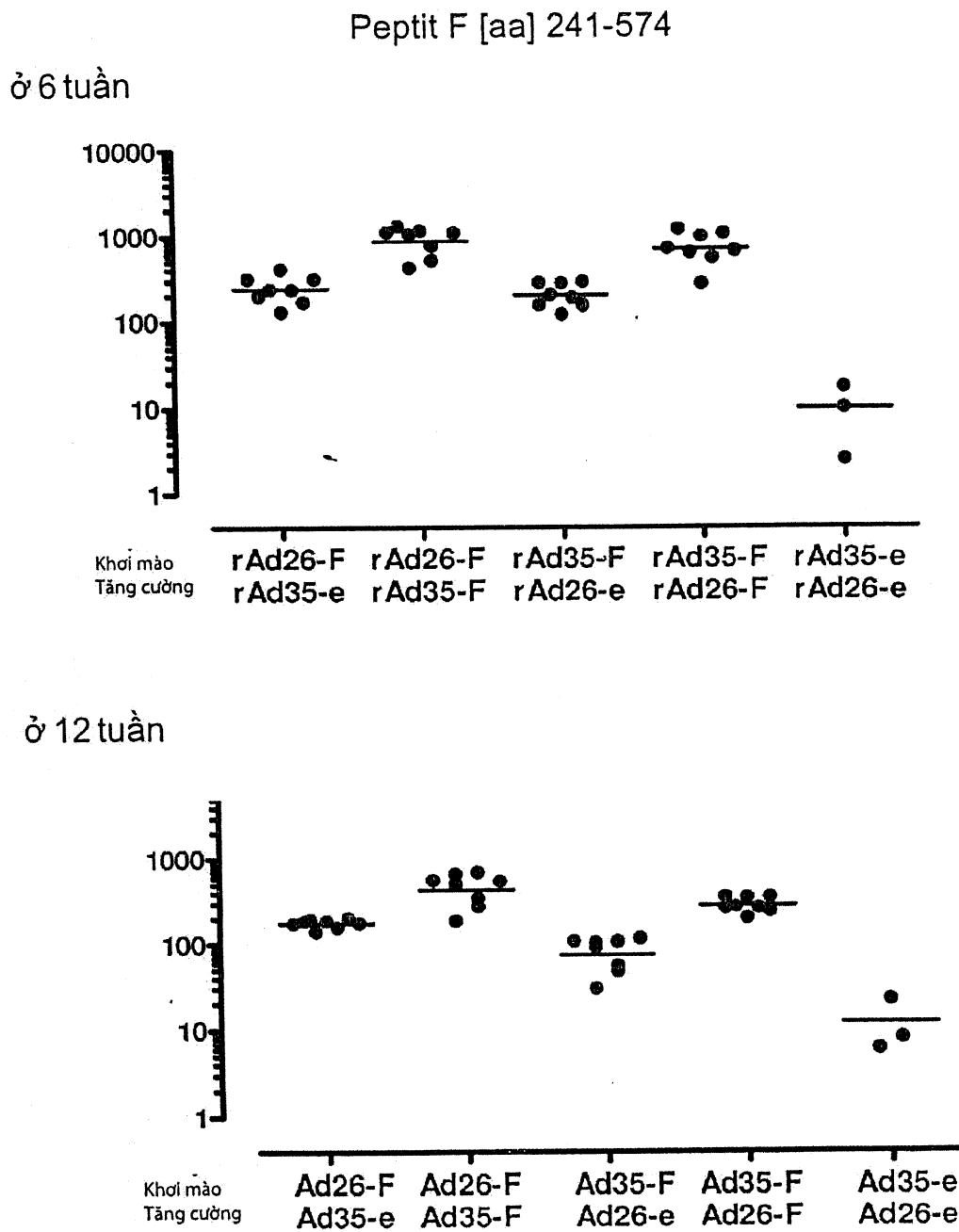


Fig. 5B

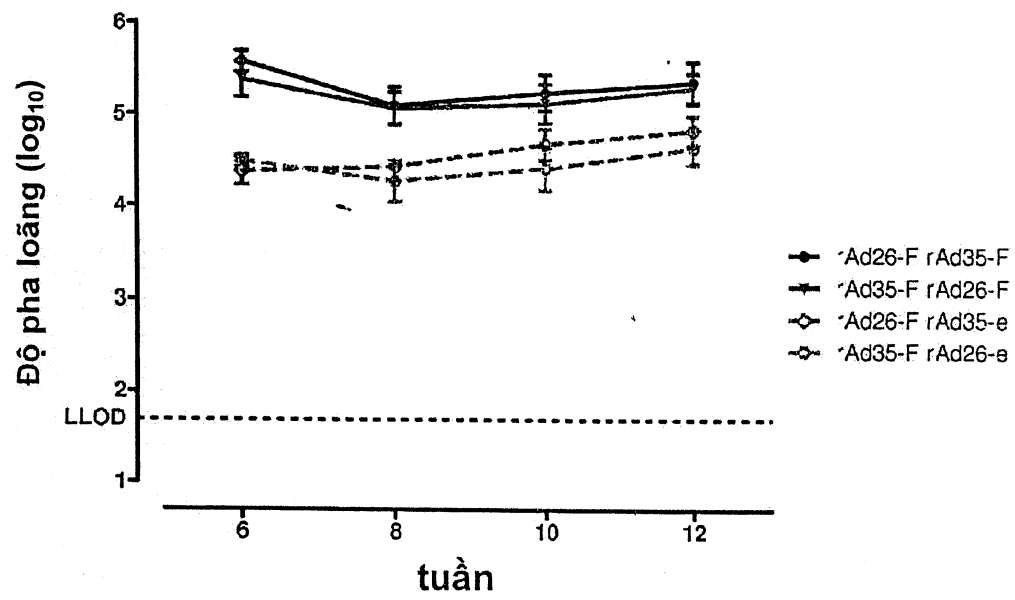


Fig. 6

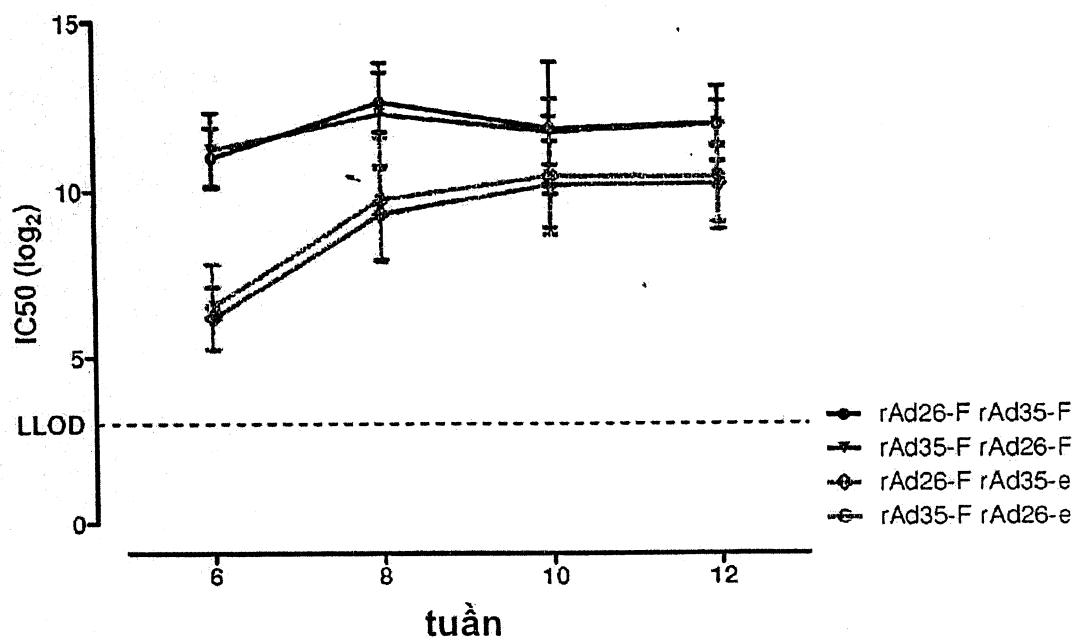
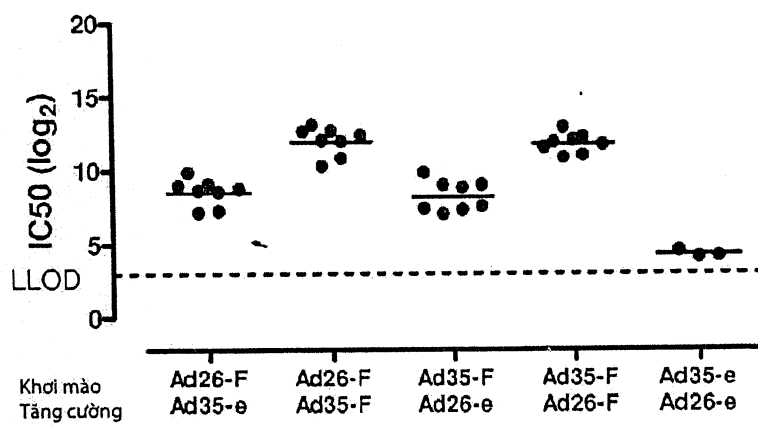


Fig. 7

ở 6 tuần



ở 12 tuần

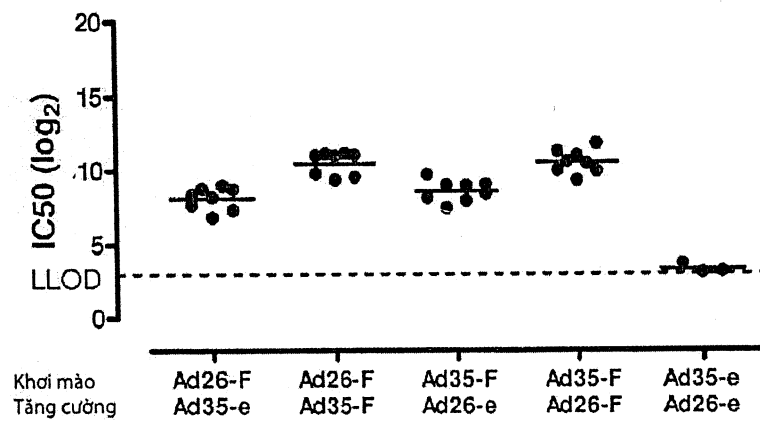


Fig. 8

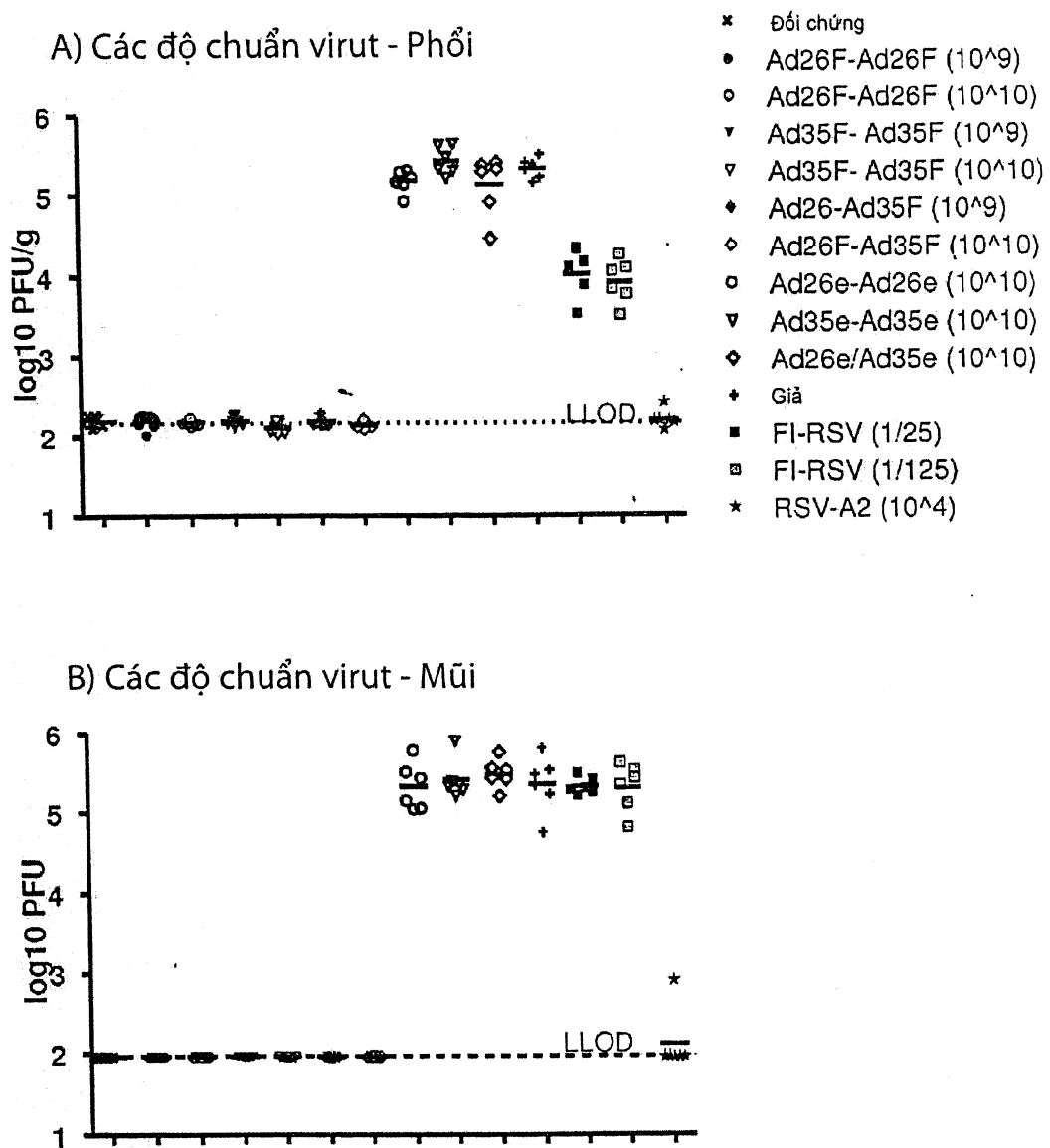


Fig. 9

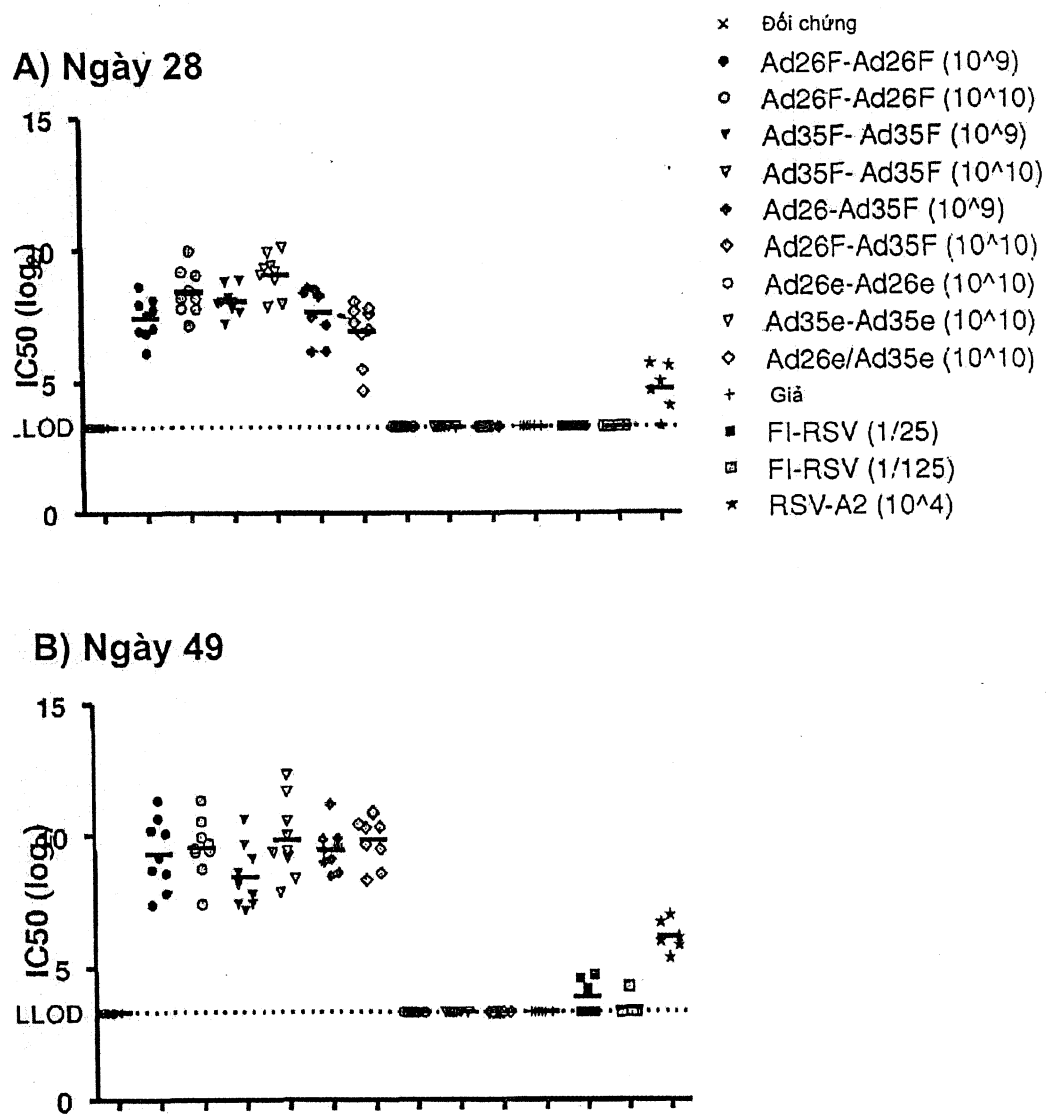


Fig. 10

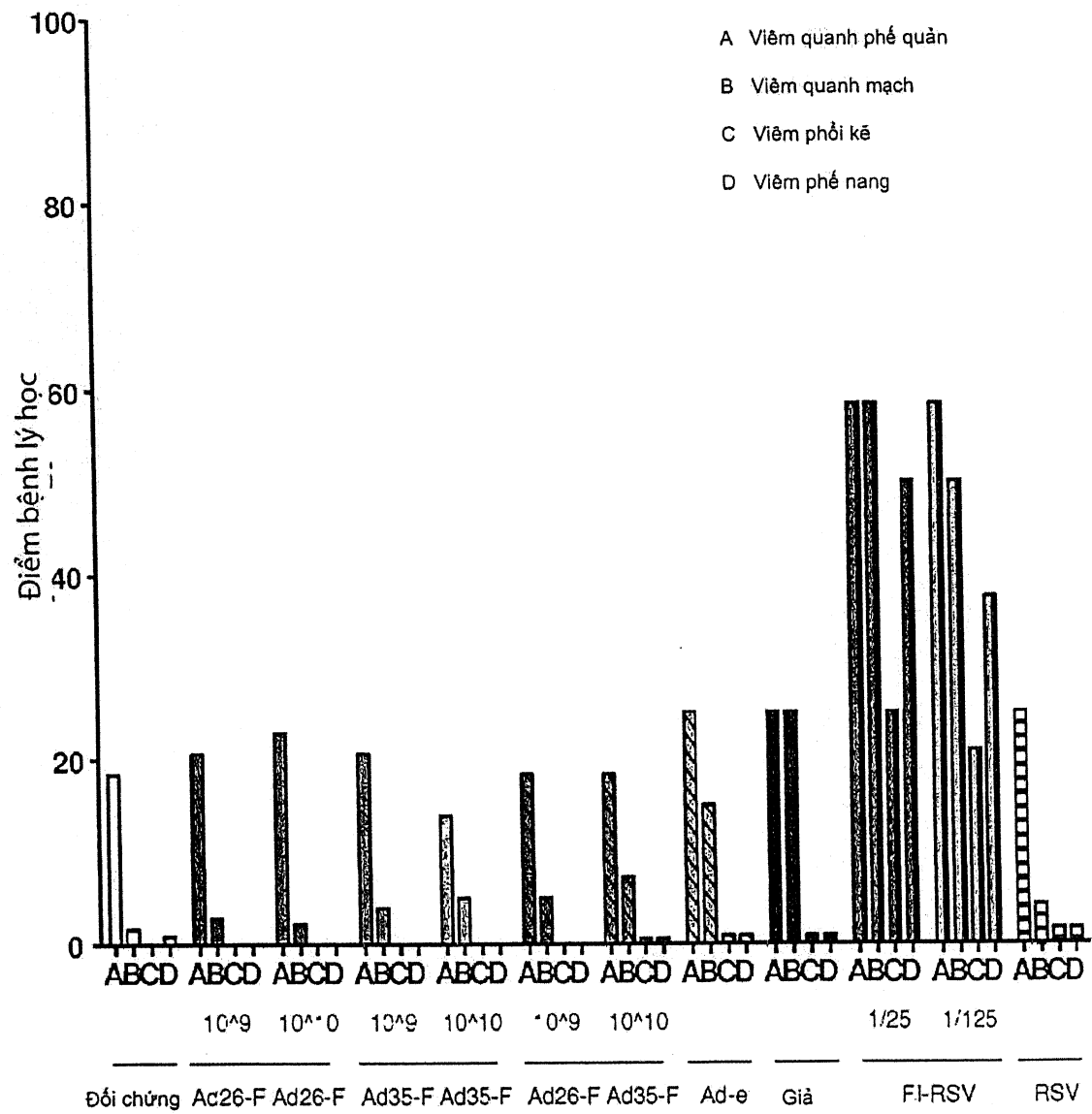


Fig. 11

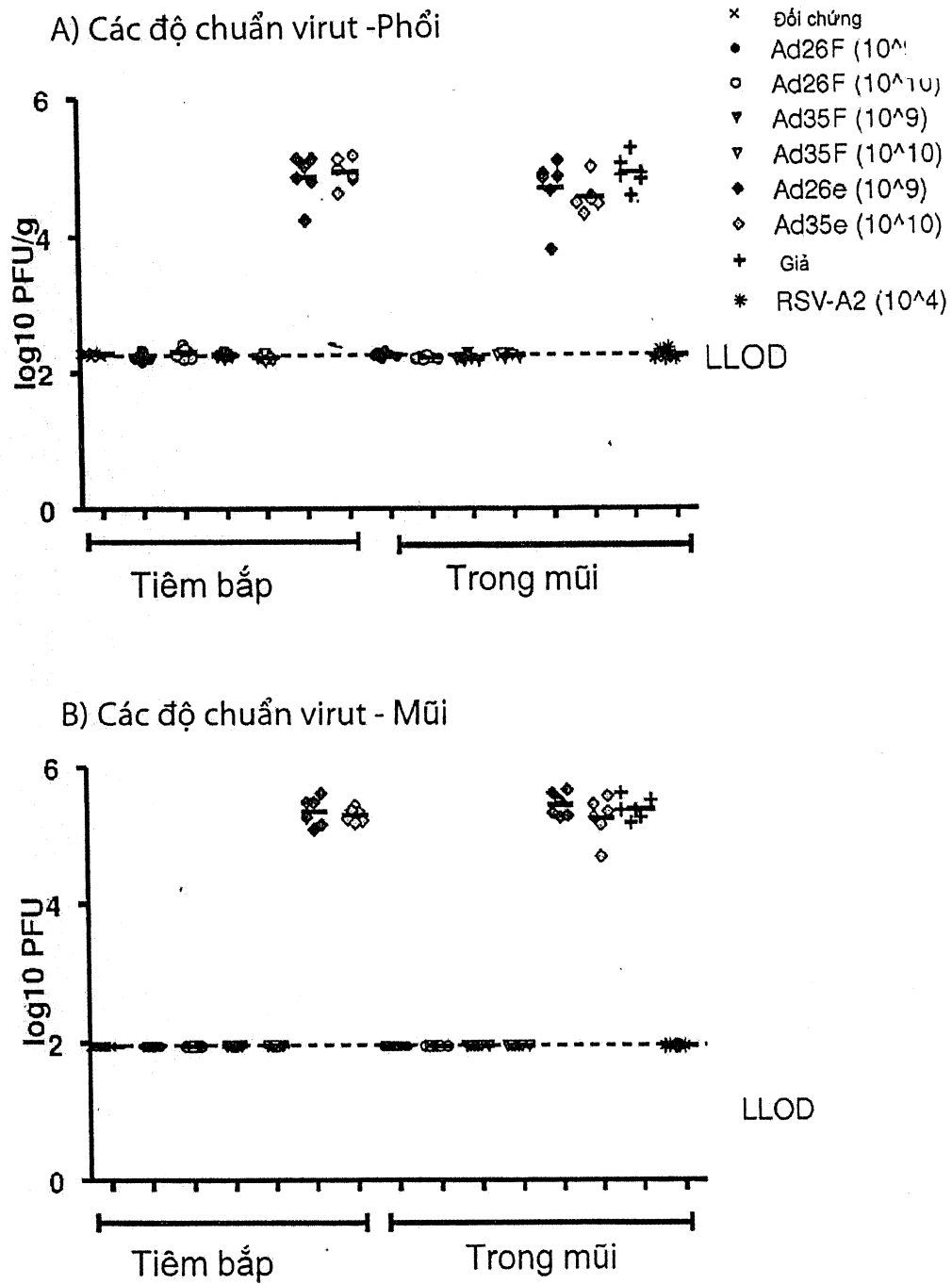


Fig. 12

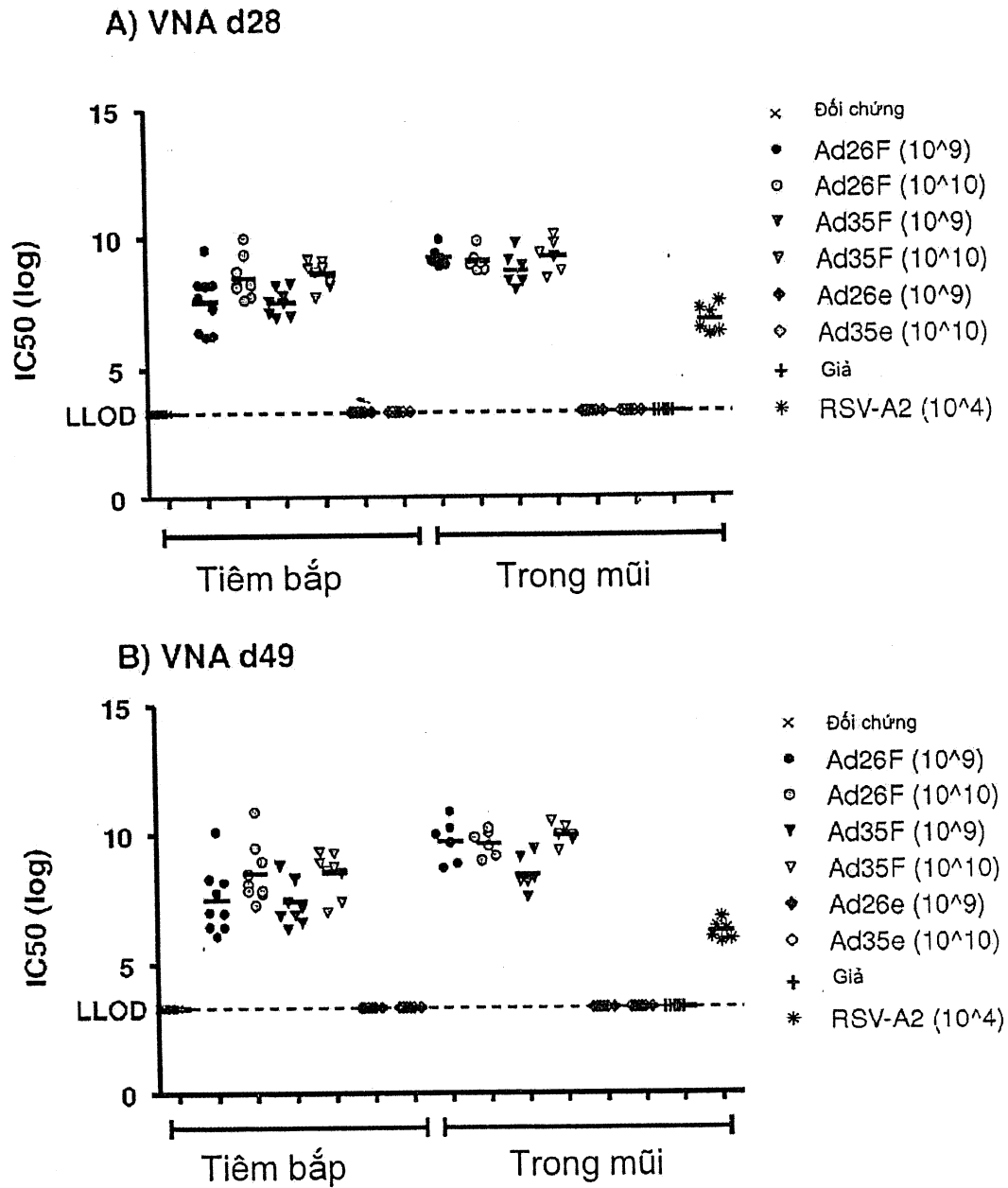


Fig. 13

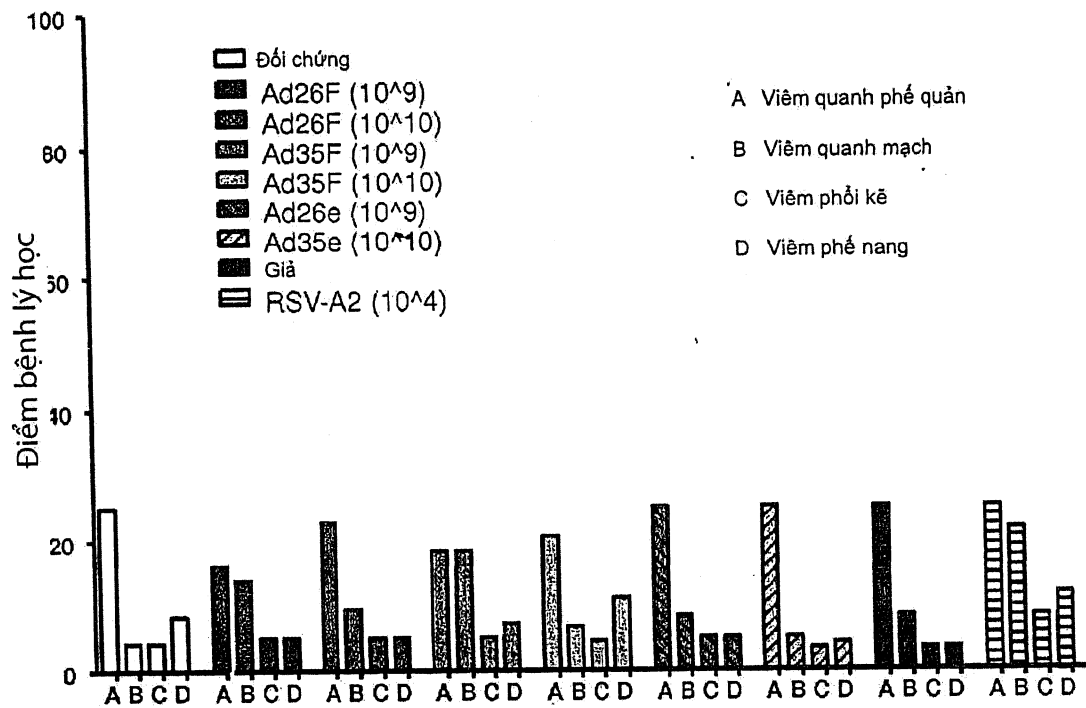


Fig. 14

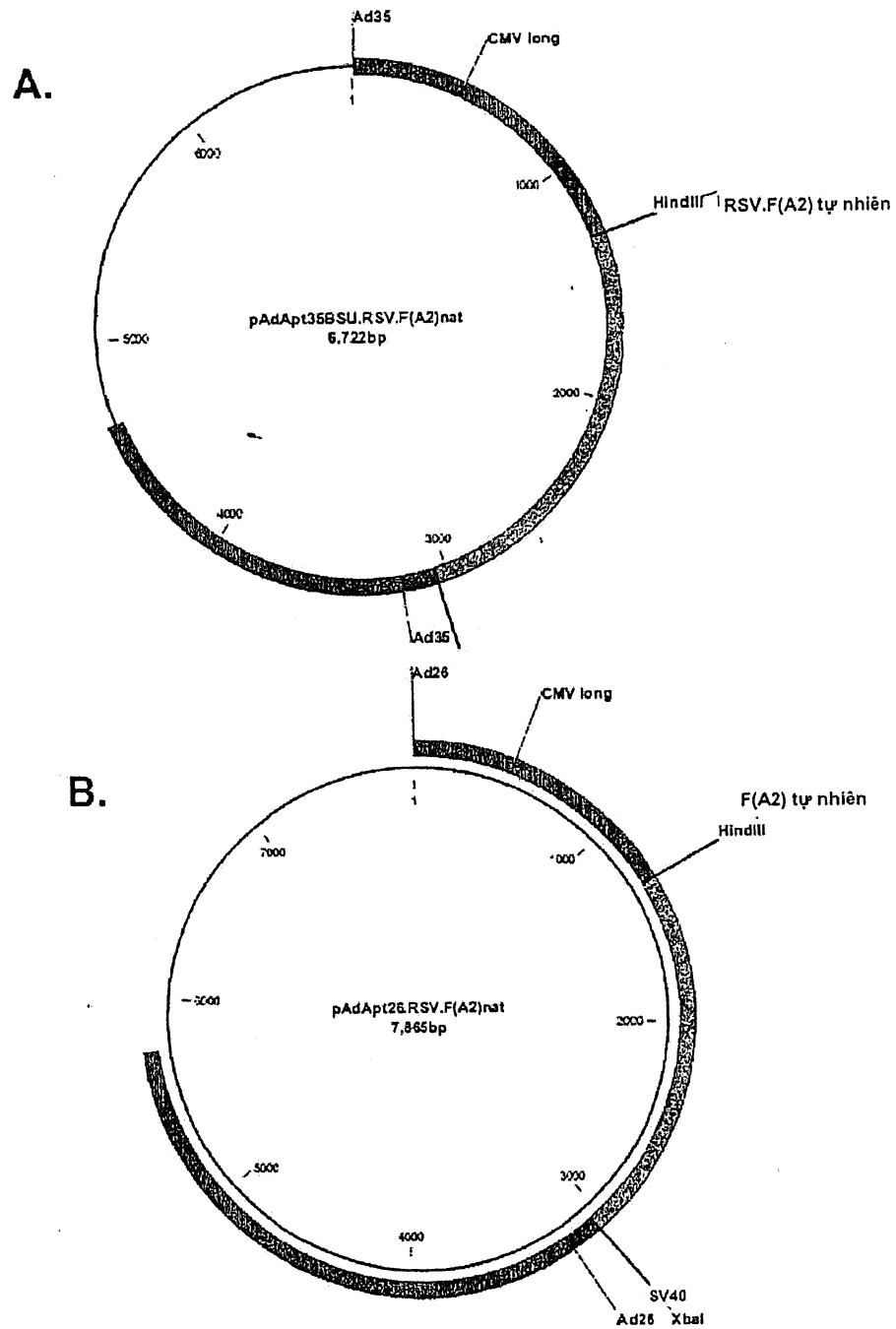
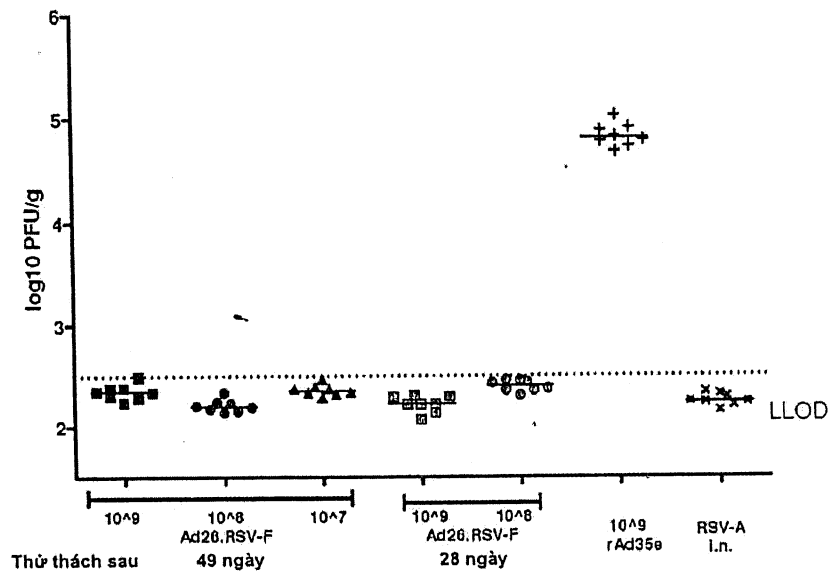


Fig. 15

A) Các độ chuẩn virut - Phổi



B) Các độ chuẩn virut - Mũi

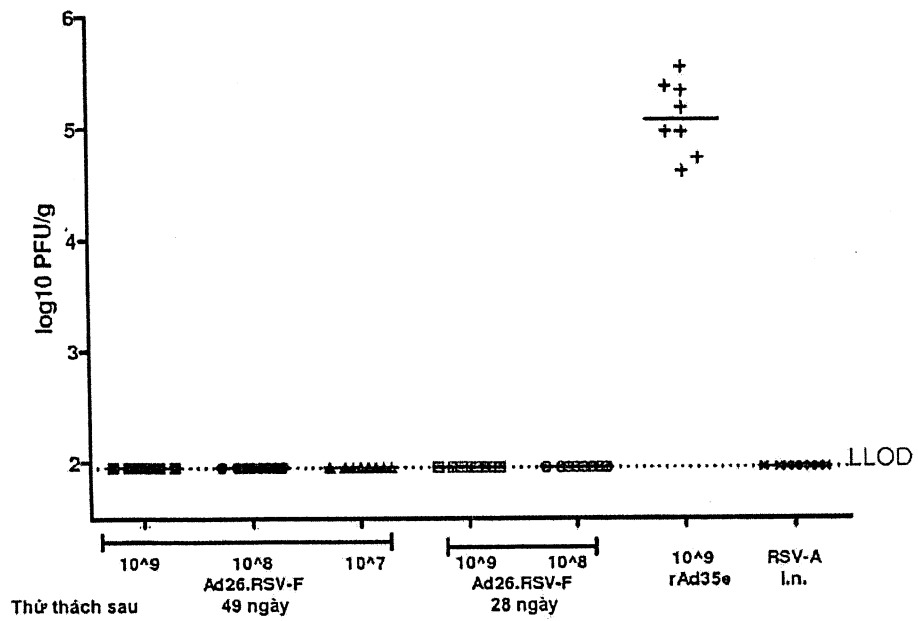


Fig. 16

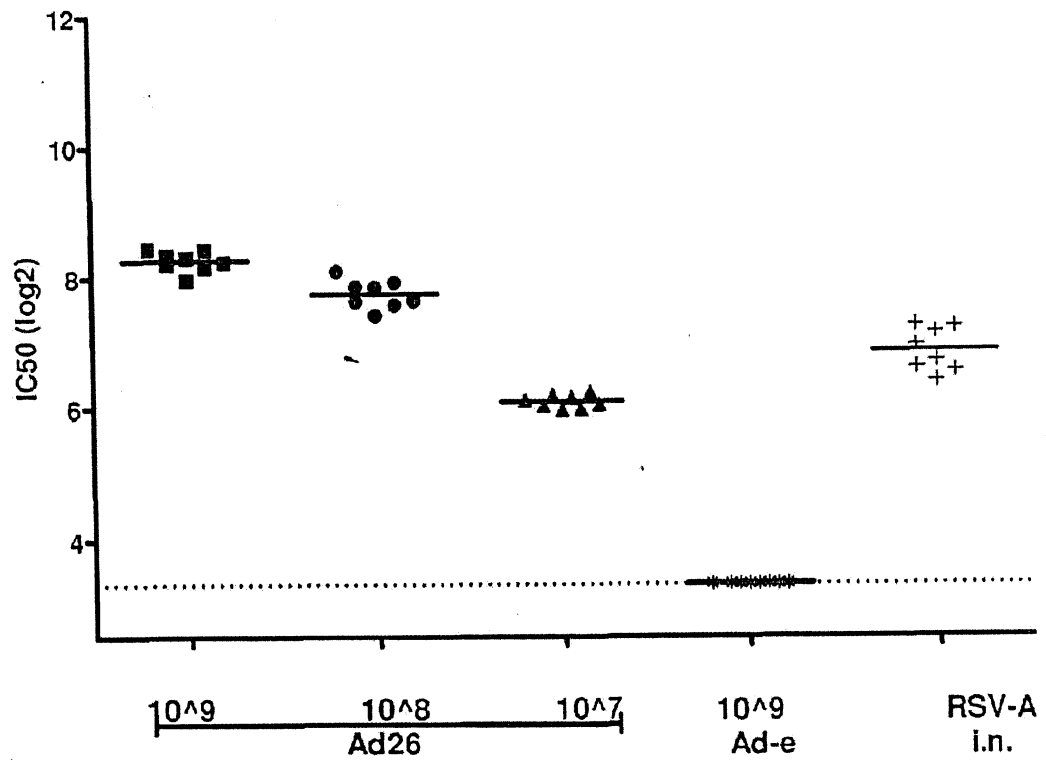


Fig. 17

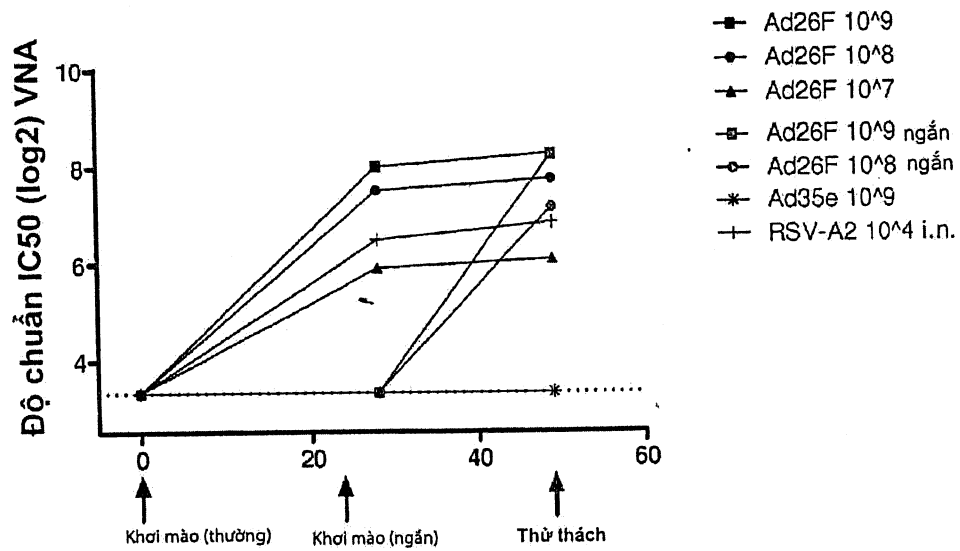


Fig. 18

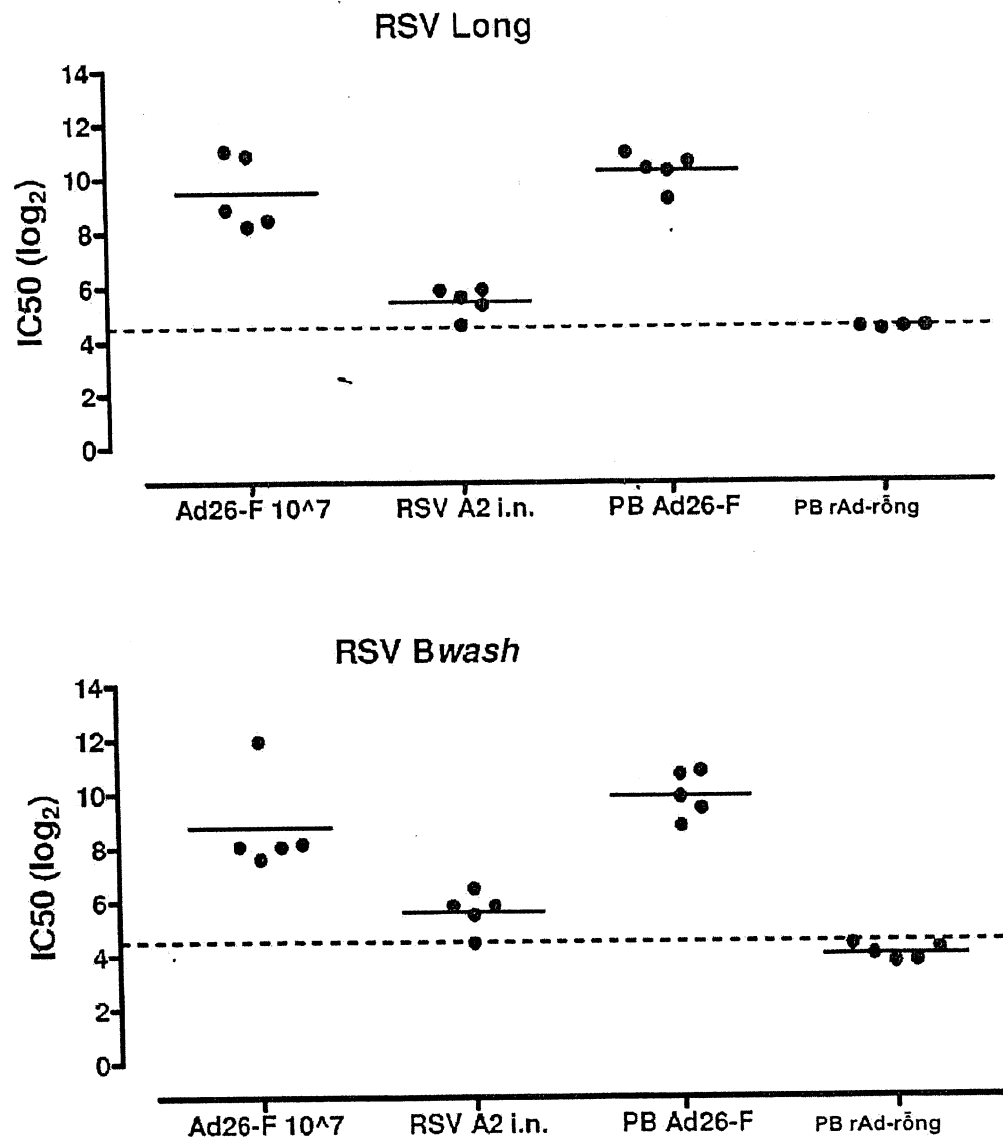
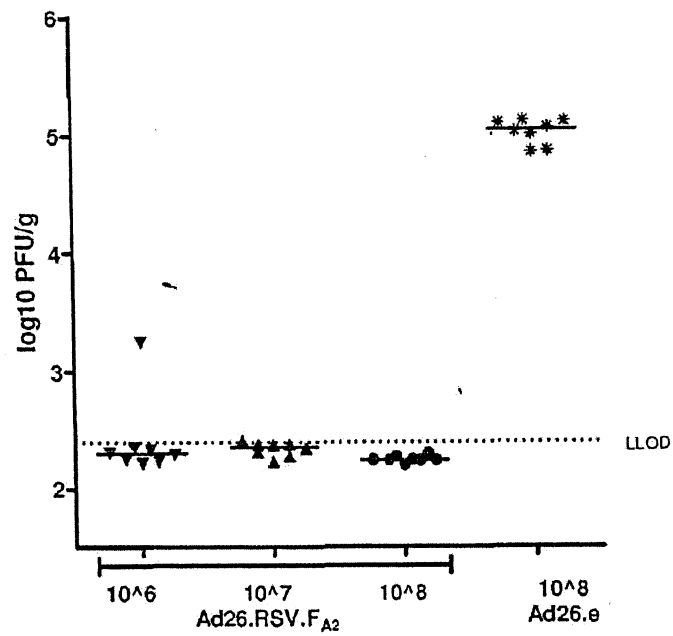


Fig. 19

Phổi tải virus, thử thách RSV-A2



Phổi tải virus, thử thách RSV-B15/97

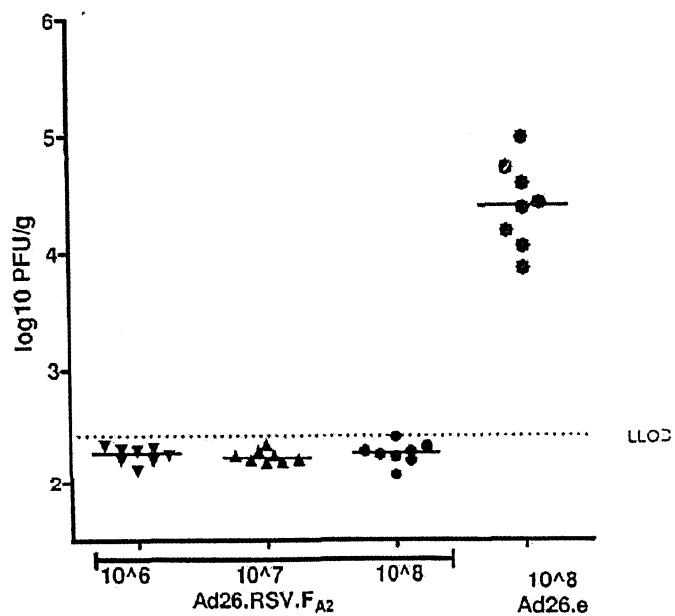
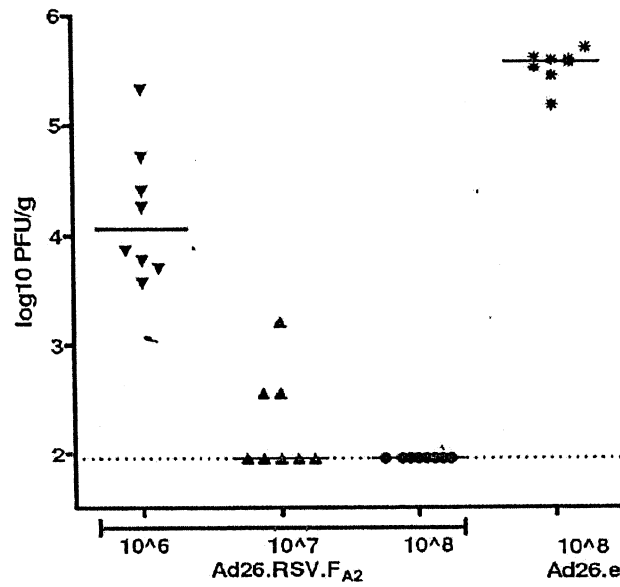


Fig. 20

Mũi tải virus, thử thách RSV-A2



Mũi tải virus, thử thách RSV-B15/97

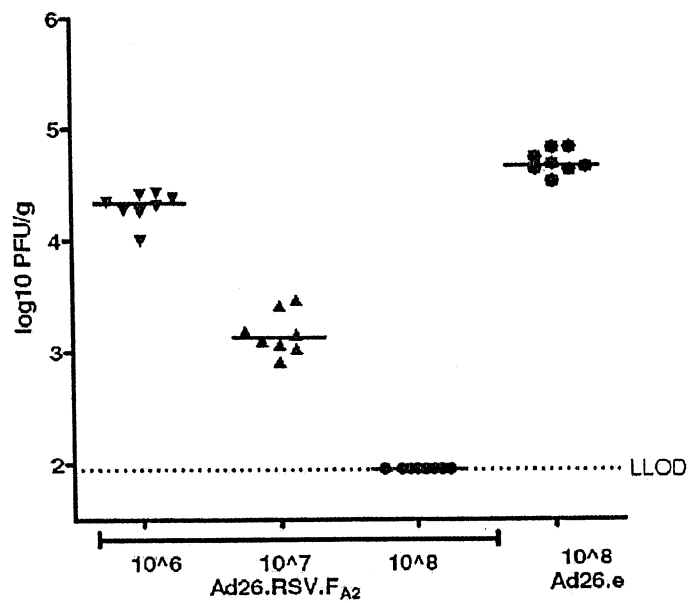


Fig. 21

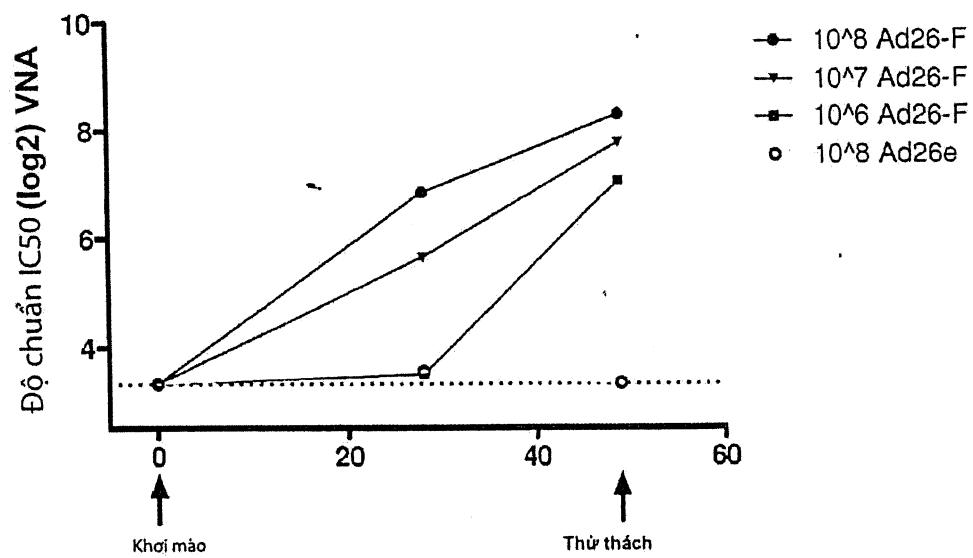


Fig. 22

Tải virus ở phổi

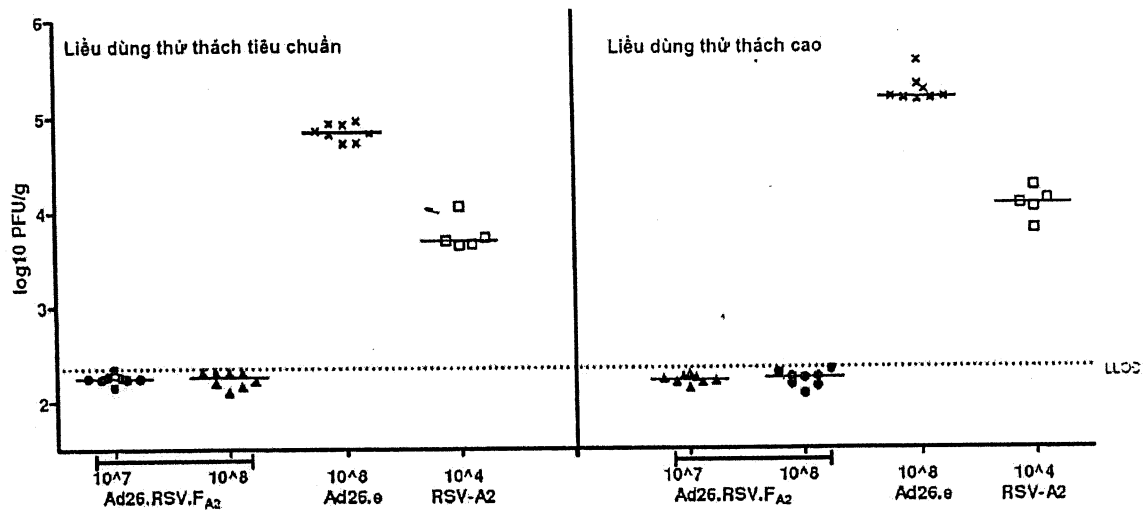


Fig. 23

Tải virus ở mũi

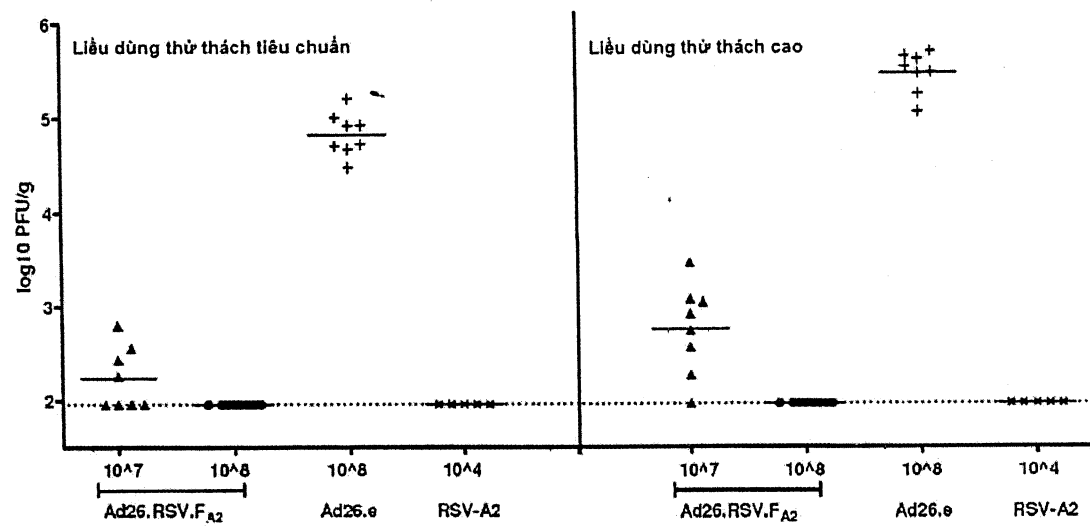
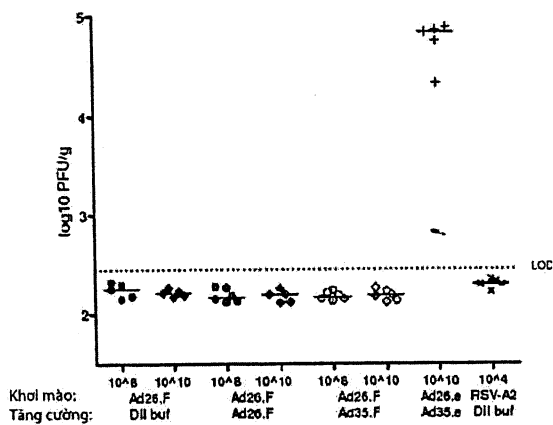


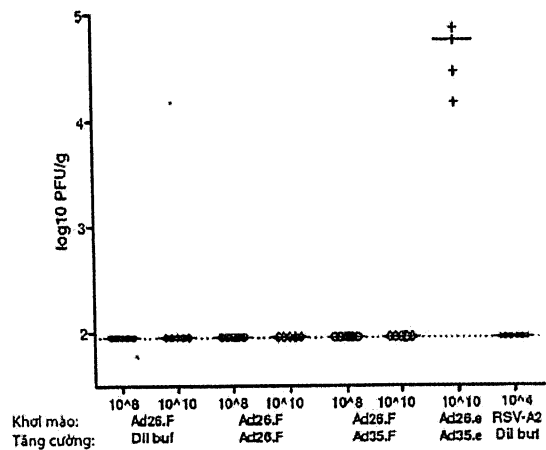
Fig. 24

Bảo vệ dài hạn - các độ chuẩn phổi & mũi

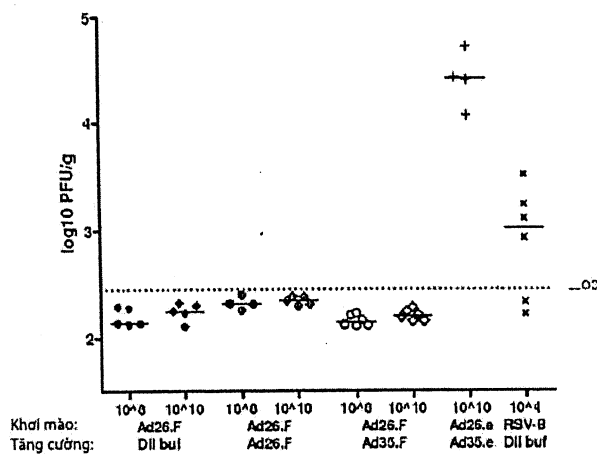
Các độ chuẩn virus - phổi
Thử thách RSV-A2
t = 31 tuần



Các độ chuẩn virut - mũi
Thử thách RSV-A2
t = 31 tuần



Các độ chuẩn virus - phổi
Thử thách RSV-B15/97
t = 31 tuần



Các độ chuẩn virus - mũi
Thử thách RSV-B15/97
t = 31 tuần

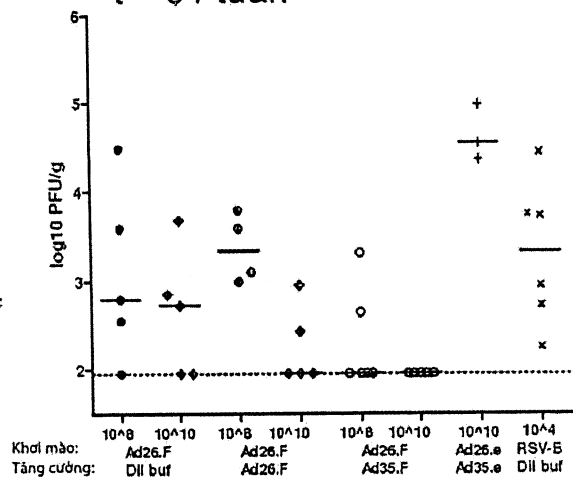


Fig. 25

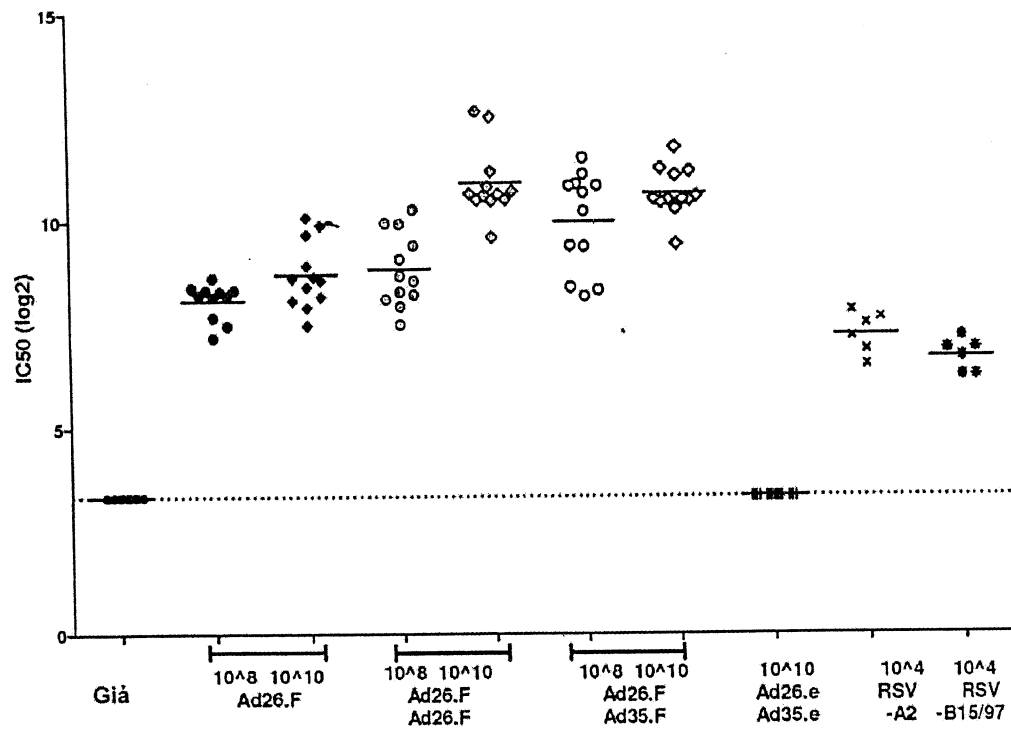


Fig. 26

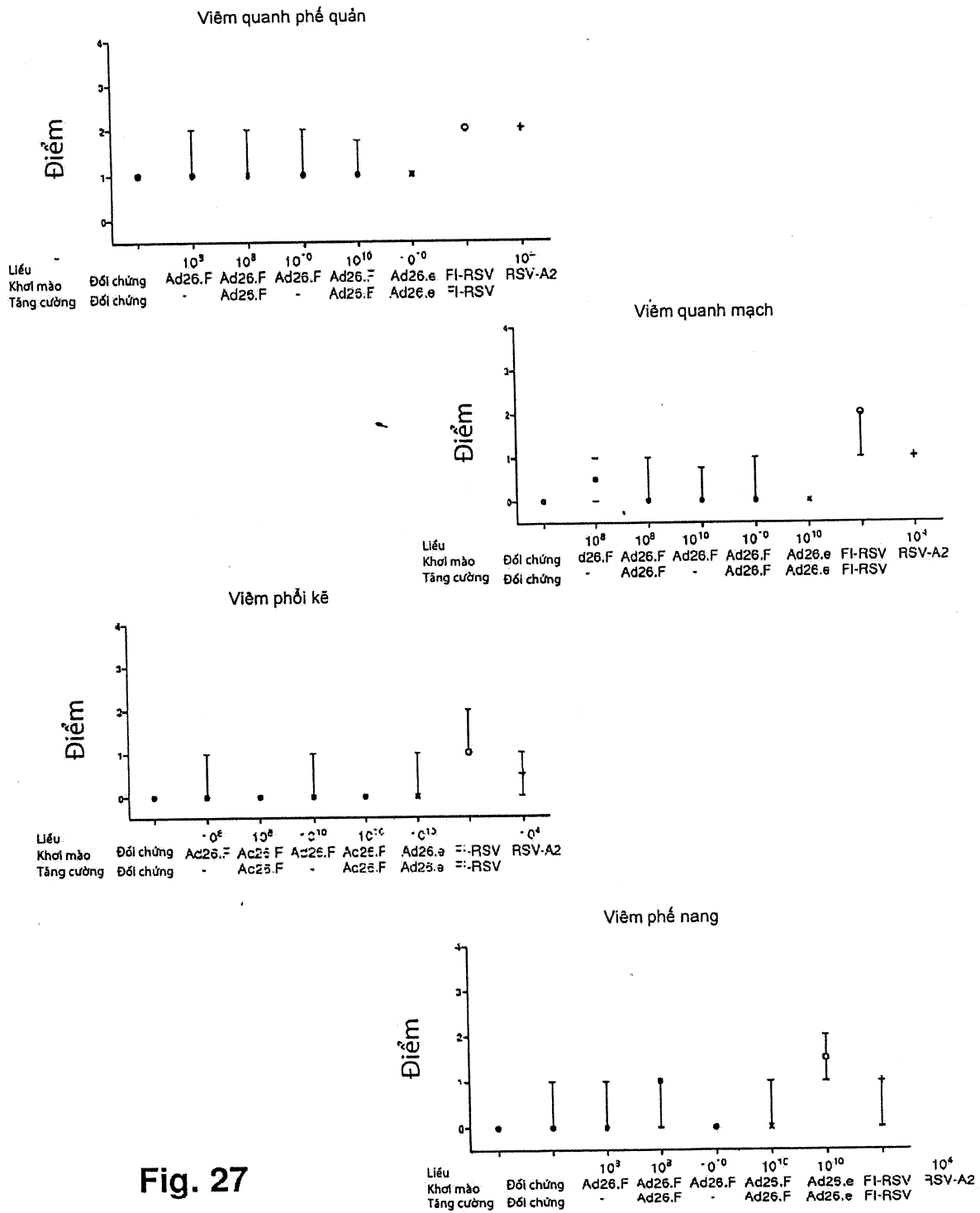


Fig. 27

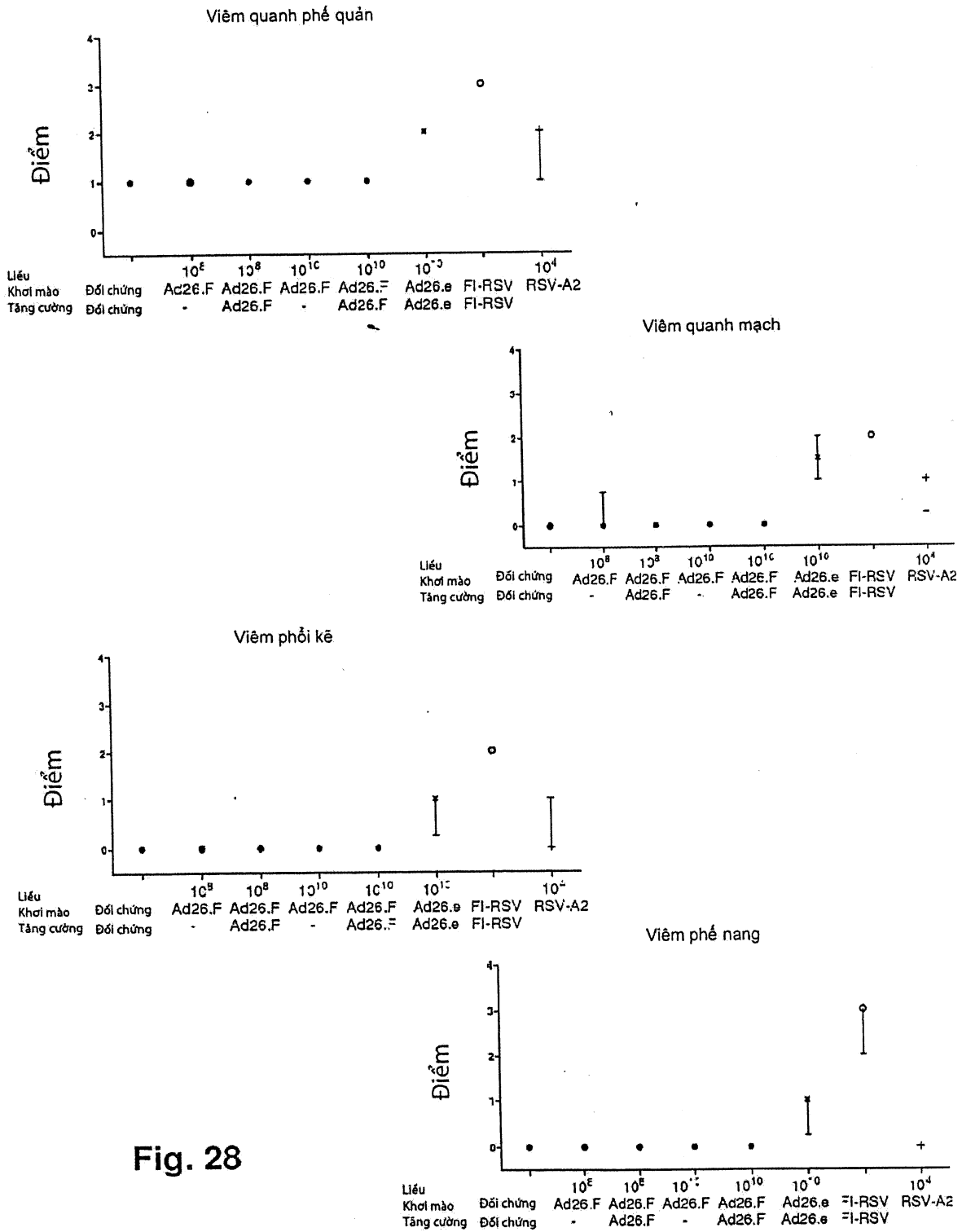


Fig. 28

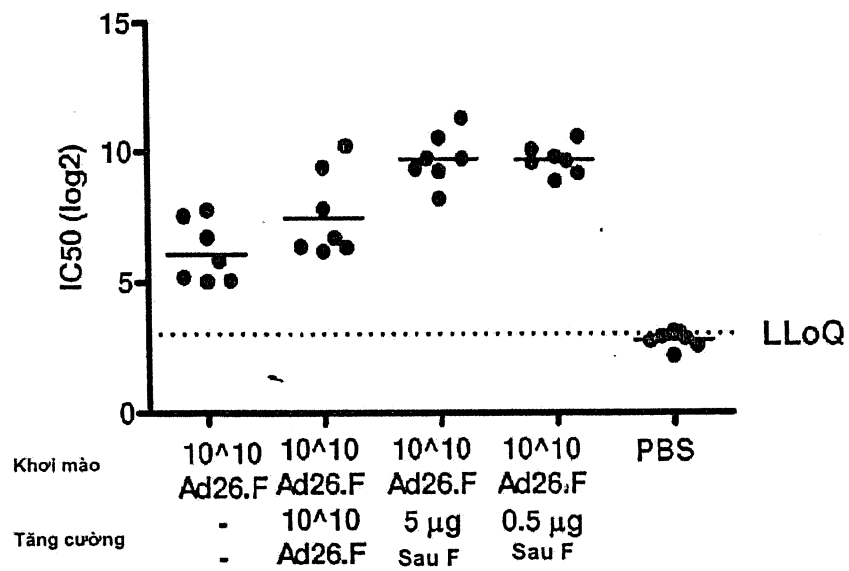


Fig. 29

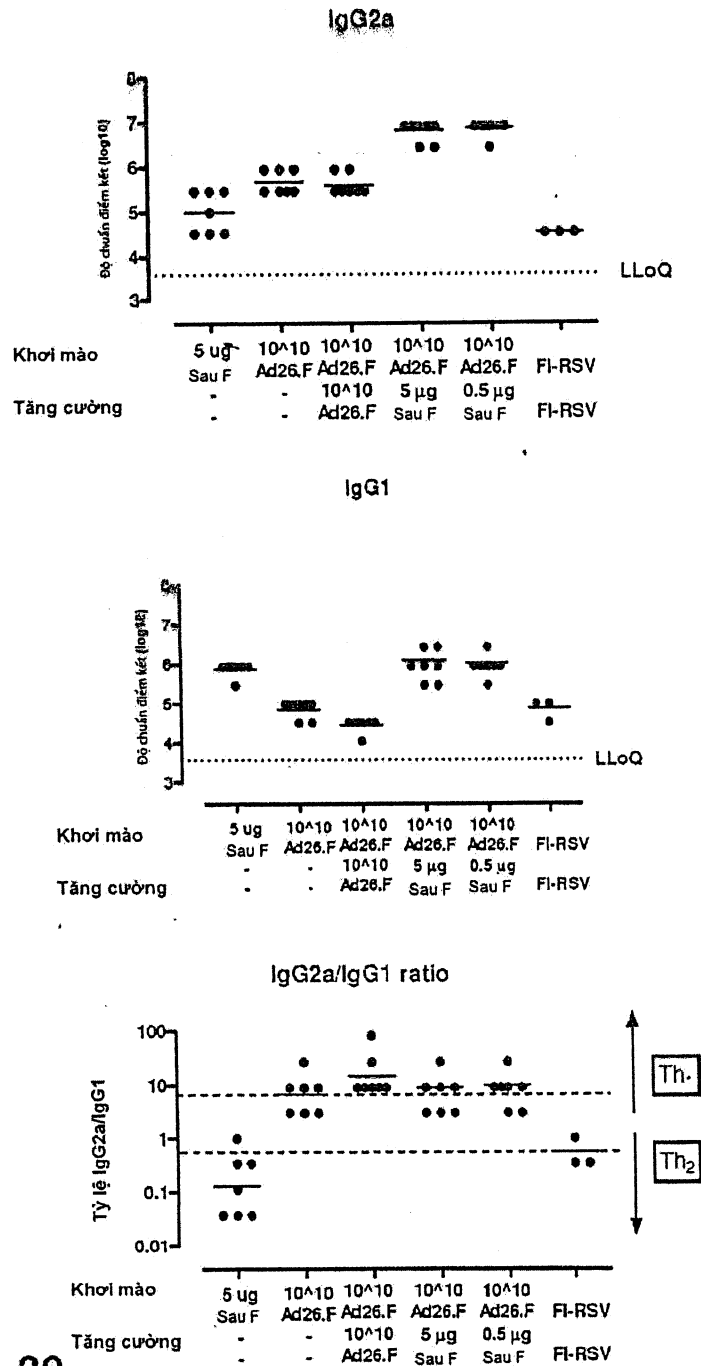


Fig. 30

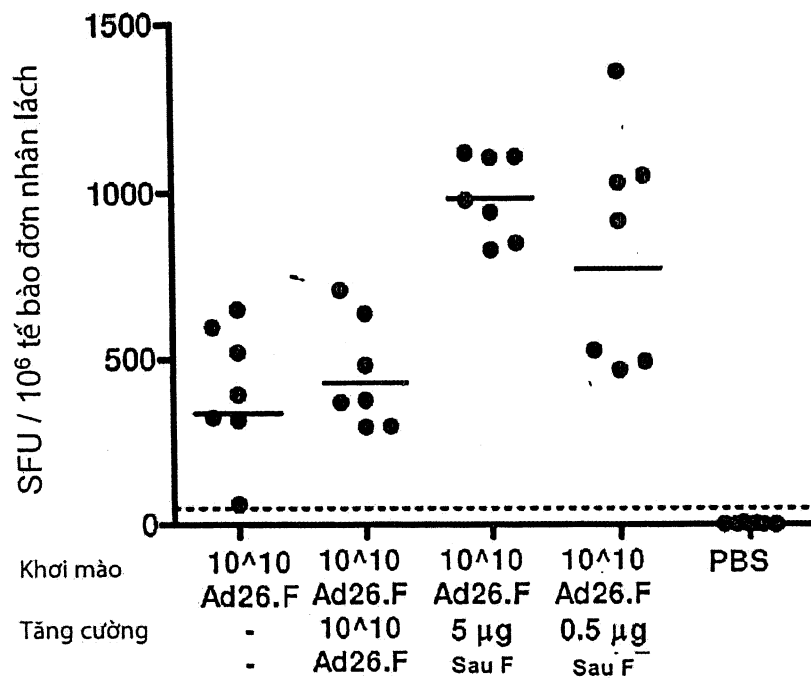


Fig. 31

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Crucell Holland B.V.
 Radosevic, Katarina
 Widjoatmodjo, Myra
 Custers, Jerome
 Vellinga, Jort

<120> VACCIN KHÁNG VIRUT HỢP BÀO HỒ HẤP VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT VACCIN NÀY

<130> 0200 EP P00 PRI

<160> 2

<170> PatentIn phiên bản 3.3

<210> 1

<211> 574

<212> PRT

<213> virut hợp bào hô hấp

<220>

<221> Protein F của RSV (chủng A2)

<222> (1)..(574)

<400> 1

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
 1 5 10 15

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
 20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
 35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
 50 55 60

Lys Lys Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Ile Lys Leu Ile Lys
 65 70 75 80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
 85 90 95

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro
 100 105 110

Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr
 115 120 125

Leu Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val
 130 135 140

Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
145 150 155 160

Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys
165 170 175

Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val
180 185 190

Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn
195 200 205

Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
210 215 220

Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn
225 230 235 240

Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu
245 250 255

Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys
260 265 270

Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile
275 280 285

Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro
290 295 300

Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro
305 310 315 320

Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg
325 330 335

Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe
340 345 350

Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp
355 360 365

Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val
370 375 380

Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr
385 390 395 400

Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys
405 410 415

Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile
420 425 430

Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp
435 440 445

Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly
450 455 460

Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro
465 470 475 480

Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn
485 490 495

Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu
500 505 510

Leu His Asn Val Asn Ala Val Lys Ser Thr Thr Asn Ile Met Ile Thr
515 520 525

Thr Ile Ile Ile Val Ile Ile Val Ile Leu Leu Ser Leu Ile Ala Val
530 535 540

Gly Leu Leu Leu Tyr Cys Lys Ala Arg Ser Thr Pro Val Thr Leu Ser
545 550 555 560

Lys Asp Gln Leu Ser Gly Ile Asn Asn Ile Ala Phe Ser Asn
565 570

<210> 2

<211> 1722

<212> ADN

<213> virus hợp bào hô hấp

<220>

<221> trình tự tối ưu codon mã hóa protein F của RSV (chủng A2)

<222> (1)..(1722)

<400> 2

atggaactgc tgatcctgaa ggccaacgcc atcaccacca tctgaccgc cgtgaccttc 60

tgcttcgcca ggcggccagaa catcaccgag gaattctacc agagcacctg tagcgccgtg 120

tccaagggt acctgagcgc cctgcggacc ggctggtaca ccagcgtgat caccatcgag 180