(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) **1-0031007**

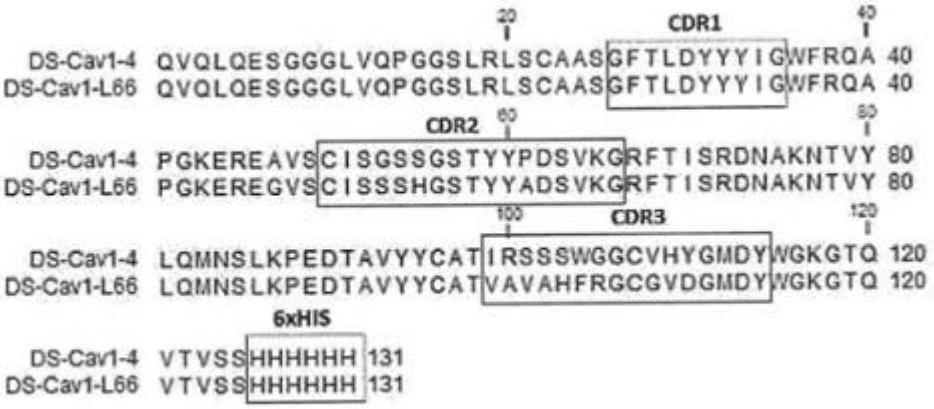
(51)[7] **A61K 39/00**; A61P 31/14; C07K 16/10; A61K 39/12

(13) **B**

(21) 1-2018-00144 (22) 20/06/2016
(86) PCT/EP2016/064218 20/06/2016 (87) WO 2016/203052 22/12/2016
(30) 62/181,522 18/06/2015 US; 15178653.0 28/07/2015 EP; 15191868.7 28/10/2015 EP
(45) 25/02/2022 407 (43) 27/08/2018 365A
(73) 1. VIB VZW (BE)
Rijvisschestraat 120, 9052 Gent, Belgium
2. UNIVERSITEIT GENT (BE)
Sint-Pietersnieuwstraat 25, 9000 Gent, Belgium
3. The United States of America, As Represented by the Secretary, Department of Health and Human Services (US)
6011 Executive Boulevard, Suite 325, MSC 7660 Bethesda, Maryland MD 20892-7660, United States of America
4. TRUSTEES OF DARTMOUTH COLLEGE (US)
11 Rope Ferry Road, Hanover, New Hampshire NH 03755, United States of America
(72) SAELENS, Xavier (BE); SCHEPENS, Bert (BE); ROSSEY, Iebe (BE); GRAHAM, Barney (US); MCLELLAN, Jason (US); GILMAN, Morgan (US).
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) MIỄN BIẾN ĐỔI ĐƠN CỦA GLOBULIN MIỄN DỊCH KHÁNG PROTEIN F TIỀN DUNG HỢP CỦA VIRUT HỢP BÀO HÔ HẤP (RSV), CẤU TRÚC GẮN KẾT RSV, AXIT NUCLEIC MÃ HÓA MIỄN BIẾN ĐỔI, TẾ BÀO CHỦ CHỨA AXIT NUCLEIC VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA MIỄN BIẾN ĐỔI NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến miễn biến đổi đơn của globulin miễn dịch (ISVD) nhằm kháng virut hợp bào hô hấp (RSV). Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến ISVD gắn kết với dạng tiền dung hợp của protein dung hợp (F) của RSV. Sáng chế còn đề cập đến các axit nucleic, tế bào chủ và dược phẩm chứa các ISVD này.



**Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Sáng chế đề cập đến miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch (immunoglobulin single variable domain - ISVD) nhằm kháng virut hợp bào hô hấp (respiratory syncytial virus - RSV). Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến ISVD gắn kết với dạng tiền dung hợp của protein dung hợp (F) của RSV. Sáng chế còn đề cập đến việc sử dụng các ISVD này để ngăn ngừa và/hoặc điều trị bệnh nhiễm RSV và dược phẩm chứa các ISVD này.

**Tình trạng kỹ thuật của sáng chế**

Virut hợp bào hô hấp là nguyên nhân quan trọng nhất gây bệnh nhiễm trùng đường hô hấp cấp tính ở trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ. Đến khi hai tuổi, hầu như tất cả trẻ em đều trải qua ít nhất một lần nhiễm virut hợp bào hô hấp. Mặc dù thường chỉ gây bệnh nhẹ, nhưng ở một số bệnh nhân (1-2%), việc nhiễm RSV dẫn đến bệnh viêm tiểu phế quản nghiêm trọng cần phải nằm viện. Ước tính mỗi năm có 160.000 trẻ em tử vong do nhiễm RSV. Không có vacxin phòng bệnh hiệu quả và không có phân tử nhỏ để điều trị đặc hiệu RSV được phát triển lâm sàng. Cách duy nhất mà trẻ sơ sinh có nguy cơ cao có thể được bảo vệ một phần khỏi bị bệnh nặng gây ra bởi sự nhiễm RSV đã được dự báo là bằng cách tiêm kháng thể đơn dòng của chuột đã được làm giống như của người (được nhân hóa) hằng tháng nhằm kháng cấu hình riêng tiền và hậu dung hợp của protein F của RSV (palivizumab). Tuy nhiên, việc điều trị bằng kháng thể này đắt và chỉ được sử dụng trong trường hợp phòng bệnh. Một số tác nhân gắn kết protein F của RSV khác đang được phát triển, bao gồm kháng thể đơn dòng đặc hiệu tiền dung hợp (Gilmans et al., 2015; McLellan et al., 2013), và ISVD gắn kết protein F của RSV. Tuy nhiên, ISVD được mô tả có hoạt tính trung hòa yếu đối với typ huyết thanh RSV B và/hoặc cần phải có dạng đa hóa trị để làm cho ISVD có hiệu lực (WO2009147248; WO2010139808; WO2011064382; Schepens et al., 2011; Hultberg et al., 2011).

Gần đây, các kháng thể thông thường mà gắn kết đặc hiệu với cấu hình riêng tiền dung hợp của protein F của RSV được cho thấy là chất làm trung hòa RSV in

vitro có hiệu lực hơn nhiều so với kháng thể gắn kết cả cấu hình riêng hậu dung hợp và cấu hình riêng tiền dung hợp của F (WO2008147196, US2012070446, McLellan et al., 2013). Tuy nhiên, các kháng thể thông thường có thể là khó sản xuất, và độ ổn định của chúng có thể bị hạn chế. Ngoài ra, do kích thước tương đối lớn của chúng, các kháng thể thông thường có thể bị cản trở trong việc nhận biết epitop cùng nguồn trong các mẫu phức tạp hoặc khi các kháng thể và phối tử khác chiếm giữ các vị trí trong vùng lân cận của các epitop của chúng.

Theo đó, và vì không có sẵn phương pháp điều trị được chấp nhận rộng rãi, nhu cầu về thuốc kháng RSV có hiệu lực mà có thể được sử dụng để điều trị và/hoặc ngăn ngừa hiệu quả bệnh nhiễm RSV chưa được đáp ứng.

**Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

Bất ngờ là, ISVD hóa trị một có thể có hoạt tính trung hòa mạnh đối với cả hai typ huyết thanh RSV (A và B). Điều này là bất ngờ, vì các tài liệu kỹ thuật gợi ý rằng cần phải có cấu trúc đa hóa trị để ức chế có hiệu lực cả hai typ huyết thanh của RSV. Do đó, mục đích của sáng chế là đề xuất ISVD nhằm kháng epitop của protein F của RSV mà là độc nhất đối với cấu hình riêng tiền dung hợp, và nhờ đó tạo ra ISVD có hiệu lực cao để điều trị và/hoặc ngăn ngừa bệnh nhiễm RSV.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất ISVD gắn kết đặc hiệu với dạng tiền dung hợp của protein F của RSV, khác biệt ở chỗ ISVD này, ở dạng hóa trị một, thể hiện hoạt tính trung hòa tương tự đối với các typ huyết thanh RSV A và B.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất ISVD chứa trình tự CDR1 được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 2, trình tự CDR2 được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 3 và SEQ ID NO: 4 và trình tự CDR3 được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 5 và SEQ ID NO: 6 và trong đó CDR1, CDR2 và/hoặc CDR3 khác biệt về 1, 2 hoặc 3 axit amin với SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO tương ứng nêu trên.

Theo khía cạnh khác, sáng chế cũng đề cập đến cấu trúc gắn kết RSV chứa ít nhất một ISVD như được mô tả ở trên.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất axit nucleic mã hóa ít nhất một ISVD như được mô tả ở trên.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề cập đến tế bào chủ được biến nạp hoặc chuyển nhiễm bằng axit nucleic như được mô tả ở trên. Sáng chế cũng đề cập đến việc sử dụng tế bào chủ được mô tả ở trên để sản xuất ISVD như được mô tả ở trên.

Sáng chế cũng đề cập đến ISVD như được mô tả ở trên hoặc cấu trúc gắn kết RSV như được mô tả ở trên, để dùng làm thuốc, cụ thể là để sử dụng trong điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh nhiễm RSV.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa ít nhất một ISVD như được mô tả ở trên. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến việc sử dụng dược phẩm này làm thuốc, cụ thể là trong điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh nhiễm RSV.

Các mục đích của sáng chế được làm rõ trong phần mô tả nêu dưới đây.

**Mô tả vắn tắt các hình vẽ**

Fig.1: Hoạt tính trung hòa trong huyết tương từ lạc đà không bướu được gây miễn dịch bằng DS-Cav1. Hoạt tính trung hòa kháng RSV A2 (A) và RSV B49 (B) được thử nghiệm trong huyết tương thu được sau các lần gây miễn dịch khác nhau bằng DS-Cav1. Lớp đơn của tế bào Vero được cấy vào đĩa loại 96 lỗ được gây nhiễm RSV A2 hoặc RSV B49 với sự có mặt của huyết tương lạc đà không bướu, được pha loãng 3 lần như được thể hiện trên trục X và bắt đầu với dịch pha loãng 8 lần. Số lượng vết tan trong mỗi lỗ được đếm và được thể hiện trên trục Y. Tiền DS-Cav 1 tương ứng với huyết thanh tiền miễn dịch của lạc đà không bướu được gây miễn dịch.

Fig.2: Chọn lọc VHH gắn kết với protein dung hợp (F) của RSV tái tổ hợp được tinh chế. Các đĩa ELISA được phủ bằng DS-Cav1 (thanh màu xám, F tiền dung hợp), F hậu dung hợp (thanh màu đen) hoặc BSA. Các đĩa này được ủ với chiết phẩm chu chất của vi khuẩn được điều chế từ tế bào TG1 E. coli được biến nạp bằng pHEN4-VHH thu được sau một vòng chọn lọc dựa vào DS-Cav1 với thư viện thể thực khuẩn biểu hiện VHH được tạo ra từ PBMC của lạc đà không bướu được gây miễn dịch bằng DS-Cav1. Trong biểu đồ này, sự gắn kết với protein F được thể hiện là tỷ số log2 của giá trị OD450 so với sự gắn kết với BSA.

Fig.3: Phát hiện hoạt tính trung hòa RSV trong dịch nổi của *Pichia pastoris*. Thể biến nạp pKai61-VHH *P. pastoris* được nuôi cấy sơ bộ trong 2 ml môi trường YPNG trong khay (đĩa) loại 24 lỗ trong 24 giờ. Sau đó, các tế bào được đặt trong môi

trường YPNM trong 48 giờ để cảm ứng sự biểu hiện VHH. Các dịch pha loãng 1/60, 1/600 và 1/6000 của dịch giống cấy nổi đã được làm trong được thử nghiệm về hoạt tính trung hòa bằng cách trộn với RSV A2 (30 PFU/lỗ), được sử dụng để cấy lớp đơn tế bào Vero. Các khung thể hiện các dòng vô tính *P. pastoris* có hoạt tính trung hòa. (**A**) Các dòng vô tính *P. pastoris* thu được sau khi biến nạp bằng tập hợp các plasmit pKai61-VHH độc nhất đã được chọn lọc, được gọi bằng các chữ số. (**B**) Các dòng vô tính *P. pastoris* thu được sau khi biến nạp bằng pKai61 trong đó thư viện gồm các VHH đặc hiệu F tiềm năng được tách dòng. L3, L13, v.v., dùng để chỉ các thể biến nạp *P. pastoris* riêng rẽ. Các lỗ được đóng khung thể hiện các mẫu có hoạt tính trung hòa RSV.

Fig.4: Tinh chế VHH được tạo ra ở *Pichia pastoris*. Môi trường nuôi cấy tế bào *P. pastoris* đã được biến nạp bằng pKai-VHH DS-Cav1-4, pKai-VHH DS-Cav1-L66, pKai-VHH-F2 hoặc pKai-VHH-F58 được thu lại sau khi cảm ứng bằng metanol trong 96 giờ. Sau đó, chất kết tủa amoni sulphat được tái hòa tan của môi trường không có tế bào được nạp lên cột HisTrap, và sau khi rửa, cột được rửa giải (giải hấp) bằng gradien nồng độ tăng của imidazol (bên trái). Phân đoạn đỉnh được rửa giải ra khỏi cột HisTrap sau đó được nạp lên cột lọc gel Superdex 75 (bên phải). Phổ sắc ký được thể hiện cho VHH DS-Cav1-4 (A), VHH DS-Cav1-L66 (B), VHH F2 (C) và VHH-F58 (D).

Fig.5: Trình tự nucleotit của VHH DS-Cav1-4 (A) và VHH DS-Cav1-L66 (B) và trình tự axit amin dự đoán của VHH DS-Cav1-4 và VHH DS-Cav1-L66 tái tổ hợp được tạo ra ở *P. pastoris* (C). Vùng xác định tính bổ trợ (CDR) và thẻ gắn His (6xHIS) được thể hiện bằng các khung được đánh dấu.

Fig.6: VHH DS-Cav1-4 và VHH DS-Cav1-L66 có hoạt tính trung hòa RSV có hiệu lực. Tế bào Vero được gây nhiễm RSV A2 (A) hoặc RSV B49 (B) với sự có mặt của VHH đã được tinh chế (VHH DS-Cav1-4, VHH DS-Cav1-L66 hoặc đối chứng âm NB 1.14), kháng thể đơn dòng D25 hoặc kháng thể đơn dòng AM22. VHH và kháng thể đơn dòng được sử dụng theo bậc pha loãng 3 lần bắt đầu với nồng độ là 3000 ng/ml. Nồng độ ức chế 50% (IC50) được tính dựa trên sự giảm vết tan được thể hiện trên A và B và được mô tả trên (C). Giá trị $IC_{50}$ đối với F-VHH-4 (DS-Cav1-4) và F-VHH–L66 (DS-Cav1-L66) so với Ctrl-VHH và mAb kháng HMPV-A1-GFP, hMPV-B1-GFP và RSV A2-GFP (D). Lượng đã định của virut tái tổ hợp hMPV biểu

hiện GFP (phân dòng A1 NL/1/00 hoặc phân dòng B1 NL/1/99, do Bernadette van den Hoogen và Ron Fouchier, Rotterdam, Hà Lan cung cấp) hoặc GFP-hRSV (chủng A2, do Mark Peeples, Columbus, Ohio, Hoa Kỳ cung cấp) (MOI 0,3 ffu/tế bào) được trộn với các dịch pha loãng theo bậc của VHH hoặc mAb và được bổ sung vào giống cấy của tế bào Vero-118 (hMPV) hoặc tế bào HEp-2, cho sinh trưởng trong đĩa loại 96 lỗ. 36 giờ sau đó, môi trường được loại bỏ, PBS được bổ sung và sự phát huỳnh quang GFP trong mỗi lỗ được đo bằng máy đọc đĩa đa lỗ Tecan M200. Giá trị phát huỳnh quang được dựng đồ thị dưới dạng tỷ lệ phần trăm của đối chứng virut không có kháng thể và được sử dụng để tính giá trị $IC_{50}$ tương ứng.

Fig.7: VHH DS-Cav1-4 và VHH-DS-Cav1-L66 gắn kết với DS-Cav1 nhưng không gắn kết với F hậu dung hợp. (A) Các đĩa ELISA được phủ bằng DS-Cav1 (hình bên trên) hoặc F hậu dung hợp (hình bên dưới). Các đĩa này được ủ với dãy pha loãng 1/3 của VHH DS-Cav1-4, VHH DS-Cav1-L66 và VHH-F58 đã được tinh chế bắt đầu từ 30.000 ng/ml. Giá trị OD450 được mô tả. (B) Đồ thị cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) của việc gắn kết VHH DS-Cav1-4 và VHH DS-Cav1-L66 với protein F tiền dung hợp hoặc hậu dung hợp đã được giữ cố định. Trong hình bên trên mô tả đồ thị SPR đối với F tiền dung hợp, mẫu chỉ chứa dung dịch đệm được tiêm vào DS-Cav1 (F tiền dung hợp) và tế bào dòng tham chiếu, sau đó dịch pha loãng theo bậc 2 lần của VHH DS-Cav1-4 hoặc VHH DS-Cav1-L66 nằm trong khoảng từ 5 nM đến 39,1 pM, bằng việc sao chép nồng độ 1,25 nM. Số liệu được trừ đi 2 lần giá trị tham chiếu và phù hợp với mẫu gắn kết 1:1 (đường kẻ màu đỏ). Hình bên dưới mô tả đồ thị SPR để gắn kết VHH DS-Cav1-4 và VHH DS-Cav1-L66 với F hậu dung hợp được giữ cố định. Mẫu chỉ có dung dịch đệm được tiêm bằng F hậu dung hợp và tế bào dòng tham chiếu, sau đó các nồng độ của DS-Cav1-4 hoặc DS-Cav1-L66 là 1 µM và 500 nM. Số liệu được trừ đi 2 lần giá trị tham chiếu, nhưng không phù hợp với mô hình gắn kết, vì không phát hiện thấy sự gắn kết với F hậu dung hợp.

Fig.8: VHH DS-Cav1-4 và VHH DS-Cav1-L66 gắn kết với F trên bề mặt của tế bào động vật có vú. Tế bào HEK-293T được chuyển nhiễm bằng vectơ biểu hiện protein F của RSV A2 (pCAGGS-Fsyn) kết hợp với vectơ biểu hiện GFP-NLS (peGFP-NLS) hoặc chỉ chuyển nhiễm bằng vectơ biểu hiện GFP-NLS. Đồ thị thể hiện giá trị trung vị cường độ huỳnh quang (FI) của VHH được chỉ ra và kháng thể đơn dòng của chuột đặc hiệu protein F của RSV (MAB858-1, Millipore) đối với tế

bào dương tính với GFP biểu hiện protein F của RSV (đồ thị bên trên) hoặc không biểu hiện protein F của RSV (đồ thị bên dưới).

Fig.9: Kháng thể cạnh tranh chéo về gắn kết DS-Cav1 được phân tích bằng cách sử dụng kỹ thuật giao thoa lớp sinh học. DS-Cav1 được giữ cố định trên bộ cảm biến sinh học AR2G thông qua phản ứng liên hợp amin trong dung dịch đệm axetat. Phản ứng được dừng bằng etanolamin 1M và sau đó bộ cảm biến sinh học DS-Cav1 được giữ cố định được làm cân bằng bằng dung dịch đệm thử nghiệm (PBS với BSA 1%). Bộ cảm biến sinh học được ngâm trong kháng thể cạnh tranh/VHH sau đó là kháng thể phân tích/VHH với bước cơ sở ngắn giữa hai bước kháng thể/VHH. Phần trăm ức chế được xác định bằng cách so sánh sự gắn kết tối đa của chất kháng thể phân tích/VHH với sự có mặt và vắng mặt của mỗi chất cạnh tranh. NB: không gắn kết.

Fig.10: Việc dùng dự phòng DS-Cav1-4 và DS-Cav1-L66 làm giảm sự sao chép RSV in vivo. 30 µg DS-Cav1-4, DS-Cav1-L66 hoặc F2, và 30 µg palivizumab được dùng trong mũi đối với chuột BALB/c 4 giờ trước khi dùng liều quyết định bằng RSV A2. 24 giờ sau khi gây nhiễm, toàn bộ con chuột được nhận 30 µg F2 trong mũi. Các con chuột bị làm chết ở ngày thứ 5 sau khi dùng liều quyết định và tải lượng virut ở phổi được xác định bằng thử nghiệm vết tan (A) và bằng qRT-PCR (B). Mỗi điểm số liệu đại diện cho một con chuột và các đường ngang mô tả trung tuyến. #: Chuột với độ chuẩn virut trong dịch phổi đồng nhất dưới ngưỡng phát hiện. Đồ thị (B) thể hiện mức biểu hiện tương đối của ARN của RSV, chuẩn hóa theo mức mARN mRPL13A có trong các mẫu của mỗi chuột trong các nhóm được chỉ định.

Fig.11: VHH DS-Cav1-4 và VHH DS-Cav1-L66 gắn kết cùng epitop trên RSV F, với sự bảo toàn cấu trúc cao. (A) Các gốc và diện tích bề mặt bị che phủ (chôn vùi) trên RSV F tiền dung hợp được làm ổn định (SEQ ID NO: 16) được tiếp xúc bởi VHH DS-Cav1-4 (được in đậm). (B) Các gốc và diện tích bề mặt bị che phủ trên RSV F tiền dung hợp được làm ổn định (SEQ ID NO: 16) được tiếp xúc bởi VHH DS-Cav1-L66 (được in đậm). (C) Các gốc axit amin của khung đọc mở đầy đủ của protein RSV F tiền dung hợp được làm ổn định, trước khi xử lý in vivo (SEQ ID NO: 17) được tiếp xúc bởi cả VHH DS-Cav1-4 và VHH DS-Cav1-L66, được gạch dưới. (D) Cấu trúc đồng tinh thể của cả hai ISVD với protein F tiền dung hợp của RSV chỉ ra sự bảo toàn cấu trúc cao của ISVD và việc gắn kết với cùng epitop.

Fig.12: Gắn kết đặc hiệu của VHH DS-Cav1-4. (A) Vòng CDR3 của VHH DS-Cav1-4 gắn kết với túi được tạo ra bởi hai vùng khởi đầu của RSV F. (B) Vòng CDR2 của VHH DS-Cav1-4 tương tác với vị trí II và được liên kết với CDR3 thông qua liên kết disulfua. P1 = vùng khởi đầu 1; P2 = vùng khởi đầu 2.

Fig.13: Gắn kết đặc hiệu của VHH DS-Cav1-L66. (A) Vòng CDR3 của VHH DS-Cav1-L66 gắn kết với túi được tạo ra bởi hai vùng khởi đầu của RSV F. (B) Vòng CDR2 của VHH DS-Cav1-L66 tương tác với vị trí II và được liên kết với CDR3 thông qua liên kết disulfua. P1 = vùng khởi đầu 1; P2 = vùng khởi đầu 2.

Fig.14. Cấu trúc của protein F ở cấu hình riêng tiền dung hợp trong phức hợp với motavizumab, AM14, 101F và DS-Cav1-4. Mô hình của protein F ở cấu hình riêng tiền dung hợp trong phức hợp với motavizumab, AM14, 101F và DS-Cav1-4. Cấu trúc AM14-Mota-F tiền dung hợp (4ZYP) và cấu trúc 101F Fab gắn kết peptit (3O41) được sắp hàng với F của cấu trúc F tiền dung hợp gắn kết DS-Cav1-4. Epitop của DS-Cav1-4, cũng như epitop của DS-Cav1-L66, được đặt giữa các epitop của AM14, motavizumab và 101F và chồng lặp một phần với mỗi epitop của AM14, motavizumab và 101F.

**Mô tả chi tiết sáng chế**

Định nghĩa

Sáng chế sẽ được mô tả về các phương án cụ thể và viện dẫn đến một số hình vẽ, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó mà chỉ bị giới hạn bởi các yêu cầu bảo hộ. Bất kỳ dấu hiệu chỉ dẫn nào trong yêu cầu bảo hộ cũng sẽ không được hiểu là làm giới hạn phạm vi của sáng chế. Các hình vẽ được mô tả chỉ là sơ đồ và không nhằm làm giới hạn. Trên các hình vẽ, kích thước của một số yếu tố có thể được phóng đại và không được vẽ theo tỷ lệ nhằm mục đích minh họa. Khi thuật ngữ "chứa" được sử dụng trong phần mô tả và yêu cầu bảo hộ, thì thuật ngữ này không loại trừ các yếu tố hoặc các bước khác. Khi mạo từ xác định hoặc không xác định được sử dụng để chỉ danh từ số ít, ví dụ "một", thì từ này bao gồm cả dạng số nhiều của danh từ đó, trừ khi có quy định cụ thể khác.

Ngoài ra, các thuật ngữ thứ nhất, thứ hai, thứ ba và tương tự trong phần mô tả và trong yêu cầu bảo hộ, được sử dụng để phân biệt giữa các yếu tố tương tự và không nhất thiết là để mô tả thứ tự theo tuần tự hoặc theo thời gian. Cần phải hiểu rằng các

thuật ngữ được sử dụng như vậy có thể thay thế được cho nhau trong các trường hợp thích hợp và các phương án của sáng chế được mô tả ở đây có thể hoạt động theo các trình tự khác so với được mô tả hoặc minh họa ở đây.

Các thuật ngữ hoặc định nghĩa dưới đây được cung cấp chỉ nhằm giúp hiểu rõ sáng chế. Trừ khi được quy định cụ thể trong bản mô tả này, tất cả các thuật ngữ được sử dụng ở đây đều có cùng ý nghĩa như đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật của sáng chế. Cụ thể, có thể tham khảo các tài liệu Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Press, Plainsview, New York (1989); và Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (Supplement 47), John Wiley & Sons, New York (1999), về các định nghĩa và thuật ngữ thuộc lĩnh vực kỹ thuật này. Các định nghĩa được nêu ở đây không được hiểu là có phạm vi hẹp hơn so với được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này.

"Miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch" hoặc "ISVD" là mảnh kháng thể chứa miền kháng thể biến đổi đơn. Giống như kháng thể đầy đủ, nó có thể gắn kết chọn lọc với kháng nguyên đặc hiệu. Với trọng lượng phân tử chỉ 12–18 kDa, ISVD nhỏ hơn nhiều so với kháng thể thông thường (150–160 kDa) bao gồm hai chuỗi protein nặng và hai chuỗi protein nhẹ, và thậm chí nhỏ hơn các mảnh Fab (~50 kDa, một chuỗi nhẹ và nửa chuỗi nặng) và mảnh biến đổi chuỗi đơn (~25 kDa, hai miền biến đổi, một từ chuỗi nhẹ và một từ chuỗi nặng). Thông thường, ISVD có trình tự axit amin chứa 4 vùng khung (FR1 đến FR4) và 3 vùng xác định tính bổ trợ (CDR1 đến CDR3), tốt hơn là theo công thức sau: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Trong bản mô tả này, thuật ngữ "ISVD" bao gồm – nhưng không giới hạn ở – miền biến đổi của kháng thể chuỗi nặng (VHH) của lạc đà, còn được gọi là Nanobodies™, kháng thể miền (dAb), và ISVD thu được từ cá mập (miền IgNAR).

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "gắn kết đặc hiệu với dạng tiền dung hợp của protein F của RSV" dùng để chỉ khả năng của polypeptit gắn kết RSV (ví dụ, kháng thể, ISVD) để gắn kết theo cách có thể đo được với dạng tiền dung hợp của protein F của RSV và không gắn kết với dạng hậu dung hợp của protein F của RSV.

"Dạng tiền dung hợp của protein F của RSV" dùng để chỉ cấu hình riêng tiền dung hợp nửa bền (chưa ổn định) của protein F của RSV mà được tạo ra trước khi

tương tác virut-tế bào, như được mô tả trong tài liệu của McLellan và cộng sự, 2013. Dạng này khác biệt với dạng hậu dung hợp hoặc cấu hình riêng hậu dung hợp rất ổn định mà được tạo ra sau khi dung hợp màng virut và màng tế bào.

Trong bản mô tả này, "dạng hóa trị một" của kháng thể dùng để chỉ dạng kháng thể mà có thể chỉ nhận biết được một yếu tố quyết định kháng nguyên. Thuật ngữ này không bao gồm các dạng kháng thể đa hóa trị mà có thể nhận biết được nhiều hơn một yếu tố quyết định kháng nguyên, như – nhưng không giới hạn ở – các dạng hóa trị hai, hóa trị ba hoặc hóa trị bốn.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "hoạt tính trung hòa" dùng để chỉ thực tế là ISVD có thể ức chế sự nhiễm virut như được đo trong thử nghiệm trung hòa virut in vitro, như – nhưng không giới hạn ở – thử nghiệm làm giảm vết tan. Trung hòa, còn được gọi là ức chế, có thể có nghĩa là trung hòa hoàn toàn (không quan sát thấy sự nhiễm virut ) hoặc có thể có nghĩa là trung hòa một phần. Ví dụ, việc trung hòa có thể có nghĩa là trung hòa 10%, trung hòa 20%, trung hòa 25%, trung hòa 30%, trung hòa 40% hoặc lớn hơn. Cụ thể là, việc trung hòa có thể ít nhất là 50%, ví dụ, trung hòa 50%, trung hòa 60%, trung hòa 70%, trung hòa 75%, trung hòa 80%, trung hòa 90%, trung hòa 95% hoặc lớn hơn. Hoạt tính trung hòa thường được đánh giá dựa trên đối chứng phù hợp (ví dụ, điều trị bằng ISVD không liên quan), được chọn dễ dàng bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này. Đối với ISVD với nồng độ đã biết, hoạt tính trung hòa có thể được thể hiện là nồng độ ức chế 50% (IC50). IC50 là nồng độ ISVD tại đó đạt được sự ức chế (hoặc trung hòa) 50%. Đây là đại lượng đo của khả năng ức chế, còn được gọi là hiệu lực, của ISVD.

Trong bản mô tả này, "hoạt tính trung hòa tương tự" dùng để chỉ hoạt tính trung hòa, được thể hiện bằng IC50, thường khác 10 lần hoặc nhỏ hơn so với hoạt tính trung hòa được so sánh. Cụ thể hơn là khác 5 lần hoặc nhỏ hơn, hoặc thậm chí là 2 lần hoặc nhỏ hơn.

Thuật ngữ "vùng xác định tính bổ trợ" hoặc "CDR" dùng để chỉ vòng biến đổi trong vùng biến đổi của chuỗi H (nặng) hoặc chuỗi L (nhẹ) của globulin miễn dịch và chứa trình tự axit amin có khả năng gắn kết đặc hiệu với đích có tính kháng nguyên. Các vùng CDR này chịu trách nhiệm cho tính đặc hiệu cơ bản của kháng thể hoặc mảnh kháng thể đối với cấu trúc quyết định kháng nguyên cụ thể.

Thuật ngữ "epitop" dùng để chỉ vị trí gắn kết đặc hiệu trên kháng nguyên hoặc trên cấu trúc có tính kháng nguyên mà polypeptit, như ISVD, có tính đặc hiệu và ái lực với nó.

Thuật ngữ "epitop cấu hình riêng" dùng để chỉ epitop có các đặc điểm bề mặt ba chiều của kháng nguyên, cho phép lắp khớp chính xác và gắn kết với polypeptit, như ISVD. Ngược lại, epitop thẳng được xác định bằng trình tự axit amin (cấu trúc bậc một) hơn là bằng hình dạng 3D (cấu trúc bậc ba) của protein.

Trong bản mô tả này, "điều trị bệnh nhiễm RSV" có nghĩa là hình thức điều trị bệnh nhiễm RSV bất kỳ được sử dụng cho đối tượng sau khi đối tượng này nhiễm RSV.

Trong bản mô tả này, "ngăn ngừa bệnh nhiễm RSV" có nghĩa là việc điều trị dự phòng bệnh nhiễm RSV được dùng cho đối tượng trước khi đối tượng này nhiễm RSV. Việc điều trị dự phòng này có thể bao gồm việc sử dụng theo sáng chế làm vacxin.

Trong bản mô tả này, "dược phẩm" có thể là dược phẩm bất kỳ đã biết đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, dược phẩm dùng để đưa vào cơ thể qua đường toàn thân, miệng và trong mũi.

Trong bản mô tả này, "cấu trúc gắn kết RSV chứa ít nhất một ISVD" dùng để chỉ cấu trúc gắn kết bất kỳ mà gắn kết với RSV và chứa một hoặc nhiều ISVD.

Trong bản mô tả này, "tế bào chủ" có thể là tế bào bất kỳ thích hợp để sản xuất ISVD hoặc cấu trúc gắn kết RSV.

Theo khía cạnh thứ nhất, mục đích của sáng chế là đề xuất ISVD nhằm kháng và/hoặc gắn kết đặc hiệu với dạng tiền dung hợp của protein F của RSV. Gắn kết đặc hiệu với dạng tiền dung hợp của protein F của RSV có nghĩa là ISVD gắn kết theo cách có thể đo được với dạng tiền dung hợp của protein F của RSV và không gắn kết với dạng hậu dung hợp của protein F của RSV. Sự gắn kết đặc hiệu có thể bị ảnh hưởng bởi, ví dụ, ái lực của ISVD và nồng độ của ISVD. Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này có thể xác định điều kiện thích hợp trong đó khả năng gắn kết của ISVD nêu trong bản mô tả này có thể được đánh giá, như chuẩn độ ISVD trong thử nghiệm gắn kết thích hợp, như – nhưng không giới hạn ở – thử nghiệm hấp

phụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA), hoặc thử nghiệm gắn kết dựa trên cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) hoặc giao thoa lớp sinh học (BLI). Thông thường, gắn kết với dạng tiền dung hợp của protein F của RSV có nghĩa là ISVD gắn kết với dạng kiểu dại của protein F cũng như với dạng đột biến bất kỳ của protein F, miễn là protein F này ở cấu hình riêng tiền dung hợp. Thuật ngữ này cũng bao gồm sự gắn kết với protein F thuộc cả hai phân typ (A và B) của RSV. Theo phương án cụ thể, ISVD được mô tả ở trên gắn kết với trình tự liên ứng của protein F của RSV A như được nêu trong SEQ ID NO: 18. Trình tự liên ứng được nêu trong SEQ ID NO: 18 được tính toán bằng các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này dựa trên 92 trình tự có chiều dài đầy đủ của protein F của RSV A được liệt kê trong cơ sở dữ liệu protein NCBI. Do đó, ISVD được mô tả ở trên gắn kết với trình tự bất kỳ trong số 92 trình tự protein F tiêu biểu của RSV A để suy ra trình tự liên ứng của SEQ ID NO: 18. Theo phương án cụ thể, ISVD được mô tả ở trên gắn kết với trình tự liên ứng protein F của RSV B như được nêu trong SEQ ID NO: 19. Trình tự liên ứng được nêu trong SEQ ID NO: 19 được tính bằng các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này dựa trên 114 trình tự có chiều dài đủ của protein F của RSV B được liệt kê trong cơ sở dữ liệu protein NCBI. Do đó, ISVD được mô tả ở trên gắn kết với trình tự bất kỳ trong số 114 trình tự có chiều dài đủ của protein F tiêu biểu của RSV B được bao gồm để suy ra trình tự liên ứng của SEQ ID NO: 19. Theo phương án cụ thể, ISVD được mô tả ở trên gắn kết với cả protein F của RSV A như được nêu trong SEQ ID NO: 18 và protein F của RSV B như được nêu trong SEQ ID NO: 19. Theo phương án cụ thể, các ISVD được mô tả ở trên gắn kết riêng với dạng tiền dung hợp của protein F. Theo phương án cụ thể khác, các ISVD được nhắc đến ở trên gắn kết riêng với dạng tiền dung hợp của protein F và không gắn kết với dạng hậu dung hợp của protein F. Theo phương án cụ thể, các ISVD được mô tả ở trên gắn kết với protein RSV F tiền dung hợp được làm ổn định của SEQ ID NO: 16. Theo phương án cụ thể, ISVD có thể được dung hợp với các gốc khác nữa.

Theo các phương án cụ thể, ISVD được mô tả ở trên gắn kết với epitop của protein RSV F tiền dung hợp. Cụ thể là, chúng gắn kết với epitop cấu hình riêng của protein RSV F tiền dung hợp. Theo phương án cụ thể, ISVD được mô tả ở trên gắn kết với epitop cấu hình riêng của RSV F tiền dung hợp chứa các gốc axit amin T50,

G51, W52, S180, G184, V185, P265, I266, T267, N268, D269, Q270, L305, G307, V308, N345, A346, G347, K421, S425, K427, N428, R429, G430, I431, S451, G453, N454, L456, Y458. Cụ thể là, chúng gắn kết với epitop cấu hình riêng của RSV F tiền dung hợp chứa các gốc axit amin T50, G51, W52, S180, G184, V185, P265, I266, T267, N268, D269, Q270, L305, G307, V308, N345, A346, G347, K421, S425, K427, N428, R429, G430, I431, S451, G453, N454, L456, Y458 của RSV F tiền dung hợp như được nêu trong SEQ ID NO: 17.

Theo các phương án cụ thể, ISVD, ở dạng hóa trị một, thể hiện hoạt tính trung hòa tương tự đối với các typ huyết thanh RSV A và B. Thông thường, điều này có nghĩa là ISVD cản trở/ức chế/ngăn chặn/đảo ngược hoặc làm chậm khả năng gây nhiễm tế bào của virut. Theo các phương án cụ thể này, ISVD cản trở/ức chế/ngăn chặn/đảo ngược hoặc làm chậm khả năng gây nhiễm tế bào của virut đến mức độ tương tự đối với cả hai typ huyết thanh RSV A và B.

Theo các phương án cụ thể, ISVD chứa trình tự CDR1 được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 2, trình tự CDR2 được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 3 và SEQ ID NO: 4 và trình tự CDR3 được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 5 và SEQ ID NO: 6, trong đó CDR1, CDR2 và/hoặc CDR3 khác biệt về 1, 2 hoặc 3 axit amin với SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO tương ứng nêu trên. Đối với ISVD DS-Cav1-4, trình tự của CDR là SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 và SEQ ID NO: 5. Đối với các ISVD DS-Cav1-L66, trình tự của CDR là SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 và SEQ ID NO: 6.

Theo khía cạnh khác, cấu trúc gắn kết RSV được đề xuất, khác biệt ở chỗ cấu trúc gắn kết RSV này chứa ít nhất một ISVD. Ít nhất một ISVD có nghĩa là cấu trúc gắn kết RSV có thể chứa nhiều hơn một ISVD. Tiếp theo một hoặc nhiều ISVD này, cấu trúc gắn kết RSV có thể chứa các gốc khác liên kết với ISVD. Các gốc khác này có thể gắn kết với RSV hoặc không. Theo các ví dụ không nhằm hạn chế sáng chế, cấu trúc gắn kết RSV này có thể chứa ISVD gắn kết với protein RSV F và có thể liên kết (hóa học hoặc theo cách khác) với một hoặc nhiều nhóm hoặc gốc mà giúp kéo dài thời gian bán hủy (như – nhưng không giới hạn ở – polyetylen glycol (PEG) hoặc VHH gắn kết albumin huyết thanh), để tạo ra dẫn xuất của ISVD theo sáng chế với thời gian bán hủy tăng. Thông thường, cấu trúc gắn kết RSV này gắn kết với protein RSV F tiền dung hợp. Theo phương án cụ thể, cấu trúc gắn kết RSV được mô tả ở

trên gắn kết với SEQ ID NO: 17 và/hoặc SEQ ID NO: 18 và/hoặc SEQ ID NO: 19. Cấu trúc gắn kết RSV này có thể là cấu trúc bất kỳ bao gồm một hoặc nhiều hơn một ISVD gắn kết RSV.

Theo khía cạnh khác, ISVD không được đề xuất ở nguyên dạng này, mà được đề xuất ở dạng axit nucleic, nghĩa là phân tử axit nucleic mã hóa ISVD kháng protein RSV F như được mô tả ở đây, cụ thể kháng dạng tiền dung hợp của protein F. Sáng chế cũng đề xuất vectơ chứa axit nucleic hoặc phân tử axit nucleic này. Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất tế bào chủ chứa axit nucleic này hoặc vectơ này. Thông thường, axit nucleic được đưa vào tế bào chủ bằng cách chuyển nhiễm hoặc biến nạp, mặc dù cách mà axit nucleic được đưa vào tế bào chủ không làm giới hạn sáng chế.

Theo các phương án khác nữa, sáng chế đề xuất tệ bào chủ chứa axit nucleic này. Thông thường, tế bào chủ này được biến nạp hoặc chuyển nhiễm bằng axit nucleic. Việc sử dụng cụ thể được dự định đối với các tế bào chủ này là việc sản xuất ISVD. Do đó, việc sử dụng để sản xuất này được đề cập rõ ràng trong bản mô tả này. Điều đó có nghĩa là tế bào chủ được biến nạp hoặc chuyển nhiễm bằng phân tử axit nucleic mã hóa ISVD có thể được sử dụng để sản xuất ISVD.

Theo khía cạnh khác, ISVD được đề xuất trong bản mô tả này được dùng trong y tế. Điều đó có nghĩa là, ISVD kháng protein RSV F được đề xuất để dùng làm thuốc. Điều này áp dụng cho cả axit nucleic mã hóa ISVD, hoặc cho cả vectơ chứa axit nucleic này, nghĩa là dự định rằng phân tử axit nucleic hoặc vectơ mã hóa ISVD được đề xuất để dùng làm thuốc. Cấu trúc gắn kết RSV chứa ít nhất một ISVD gắn kết với protein RSV F cũng được đề xuất để dùng làm thuốc. Theo các phương án cụ thể, ISVD (hoặc cấu trúc gắn kết RSV chứa chúng hoặc dược phẩm chứa chúng hoặc axit nucleic mã hóa chúng, hoặc vectơ chứa axit nucleic này) được đề xuất để sử dụng trong điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh nhiễm RSV. Điều này tương đương với việc nói rằng các phương pháp được đề xuất để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh nhiễm RSV cho đối tượng có nhu cầu, bao gồm việc dùng ISVD kháng protein RSV F cho đối tượng này. Tương tự, trong bản mô tả này, ISVD có thể được đề xuất ở dạng protein (ở dạng protein miền đơn, ở dạng một phần của cấu trúc gắn kết RSV hoặc dược phẩm) hoặc có thể được dùng ở dạng phân tử axit nucleic mã hóa ISVD kháng protein RSV F, hoặc ở dạng vectơ chứa phân tử axit nucleic này. Nếu ISVD (hoặc cấu trúc gắn kết

RSV) được dùng ở dạng protein, các đường dùng khác nhau có thể được dự định. Theo các ví dụ không nhằm hạn chế sáng chế, ISVD có thể được dùng qua đường toàn thân, miệng hoặc trong mũi, như, ví dụ, thông qua việc xông mũi. Trong trường hợp ISVD được đề xuất ở dạng axit nucleic hoặc vectơ, dự định cụ thể là ISVD được dùng thông qua liệu pháp gen.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất dược phẩm chứa ít nhất một ISVD nhằm kháng protein RSV F tiền dung hợp. Thông thường, dược phẩm này chứa ít nhất một ISVD nhằm kháng dạng tiền dung hợp của protein RSV F. Dược phẩm này có thể chứa các gốc khác. Các gốc khác này có thể gắn kết với RSV hoặc không. Trong bản mô tả này, dự định rằng dược phẩm được đề xuất để dùng làm thuốc. Cụ thể, dược phẩm được đề xuất để sử dụng trong điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh nhiễm RSV. Điều này tương đương với việc nói rằng các phương pháp được đề xuất để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh nhiễm RSV cho đối tượng có nhu cầu, bao gồm việc dùng dược phẩm như được mô tả ở đây cho đối tượng này.

Theo các phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa bệnh nhiễm RSV, phương pháp này bao gồm việc dùng cho đối tượng có nhu cầu ISVD như được mô tả ở trên, cấu trúc gắn kết RSV như được mô tả ở trên hoặc dược phẩm như được mô tả ở trên. Phương pháp này bao gồm việc dùng cho đối tượng này ISVD kháng protein RSV F tiền dung hợp. Các phương pháp này thường giúp cải thiện hoặc ngăn ngừa triệu chứng nhiễm bệnh ở đối tượng này. Tương tự, trong bản mô tả này, ISVD cũng có thể được đề xuất ở dạng protein (ở dạng protein miền đơn, ở dạng một phần của cấu trúc gắn kết RSV hoặc dược phẩm) hoặc có thể được dùng ở dạng phân tử axit nucleic mã hóa ISVD kháng protein RSV F, hoặc ở dạng vectơ chứa phân tử axit nucleic này, hoặc ở dạng dược phẩm chứa kháng thể này. Tương tự, cấu trúc gắn kết RSV như được mô tả ở đây cũng được dự định để dùng cho đối tượng có nhu cầu trong các phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh nhiễm RSV.

Cần phải hiểu rằng mặc dù các phương án cụ thể, các cấu hình cũng như các nguyên liệu và/hoặc phân tử cụ thể, được nêu ra trong bản mô tả này đối với tế bào và phương pháp theo sáng chế, nhưng các thay đổi hoặc cải biên khác về hình thức và chi tiết vẫn có thể được thực hiện mà không vượt ra ngoài phạm vi của sáng chế. Các ví dụ nêu dưới đây được đưa ra nhằm minh họa tốt hơn các phương án cụ thể, và

các ví dụ này không nên được xem là làm giới hạn sáng chế. Sáng chế chỉ bị giới hạn bởi các yêu cầu bảo hộ.

**Ví dụ thực hiện sáng chế**

Nguyên liệu và phương pháp dùng trong các ví dụ

Gây miễn dịch và tạo thư viện VHH

Lạc đà không bướu được tiêm dưới da vào các ngày 0, 7, 14, 21, 28 và 35, mỗi lần là 167 µg protein RSV F DS-Cav1 đã được tinh chế. DS-Cav1 là protein RSV F tái tổ hợp được làm ổn định ở cấu hình riêng tiền dung hợp (McLellan et al., 2013). Hai lần tiêm đầu tiên được thực hiện với poly-IC (375 µg mỗi lần tiêm) làm tá dược, trong khi Gerbu LQ # 3000 được sử dụng làm tá dược cho bốn lần tiêm cuối cùng. Trước mỗi lần gây miễn dịch, máu được lấy ra và huyết tương được chuẩn bị để đánh giá sự chuyển hóa huyết thanh. Vào ngày 40, 100 ml máu chống đông được thu lại để điều chế lympho bào.

Toàn bộ ARN từ lympho bào máu ngoại vi được sử dụng làm khuôn để tổng hợp cADN sợi thứ nhất với đoạn mồi oligodT. Với việc sử dụng cADN này, trình tự mã hóa VHH được khuếch đại bằng PCR, được cắt bằng PstI và NotI, và được tách dòng vào các vị trí PstI và NotI của vectơ phagemit pHEN4. Tế bào E. coli TG1 khả nạp điện được biến nạp bằng vectơ pHEN4 tái tổ hợp, tạo ra thư viện VHH gồm khoảng $5 \times 10^8$ thể biến nạp độc lập. 87% số thể biến nạp chứa vectơ này với kích thước đoạn xen đúng, như được chứng tỏ bằng phân tích PCR 95 thể biến nạp độc lập.

500 µl dung dịch gốc của thư viện được gây nhiễm thể thực khuẩn hỗ trợ VCS M13 để hiển thị trình tự VHH (ở dạng dung hợp với M13 PIII) trên bề mặt thể thực khuẩn được sử dụng để chọn lọc sinh học.

Tế bào

Tế bào Hep-2 (ATCC, CCL-23), tế bào Vero (ATCC, CCL-81) và tế bào HEK-293T (do Dr M. Hall cung cấp) được cho sinh trưởng trong môi trường DMEM có bổ sung huyết thanh thai bò (FCS) đã được làm bất hoạt bằng nhiệt 10%, L-glutamin 2 mM, axit amin không thiết yếu (Invitrogen, Carlsbad, California) và natri pyruvat 1 mM.

Virut

RSV A2 (VR-1540, ATCC, Rockville), phân typ A của RSV, và RSV B49, phân typ B của RSV (chủng lâm sàng BE/5649/08, nhận được từ Giáo sư M. Van Ranst, Tan và cộng sự, 2013) được nhân giống bằng cách gây nhiễm lớp đơn tế bào Hep-2 bằng 0,1 MOI với sự có mặt của môi trường sinh trưởng chứa FCS 1%. Năm ngày sau khi gây nhiễm, các tế bào và môi trường sinh trưởng được thu, gom lại và được lọc sạch bằng cách ly tâm (450 x g). Để cô đặc virut, dịch nổi đã lọc sạch được ủ trong 4 giờ ở nhiệt độ 4°C với sự có mặt của polyetylen glycol (PEG6000) 10%. Sau khi ly tâm (30 phút tại tốc độ 3000 x g), lớp lắng kết được tái tạo huyền phù trong dung dịch muối cân bằng Hank (HBSS), chứa sacaroza 20%, được phân thành cácphần mẫu, được làm lạnh nhanh trong nitơ lỏng và được bảo quản ở nhiệt độ -80°C.

Thử nghiệm về hoạt tính trung hòa RSV

Huyết tương của lạc đà không bướu được thử nghiệm về hoạt tính trung hòa đối với RSV A2 và RSV B49 bằng thử nghiệm vết tan. Tế bào Vero được cấy vào đĩa loại 96 lỗ (15000 tế bào/lỗ). Ngày tiếp theo, dãy pha loãng của các mẫu huyết tương được điều chế trong Opti-MEM (Gibco) có bổ sung penixilin 1% và streptomyxin 1% (dãy pha loãng 1/3, bắt đầu với dịch pha loãng 1/4). Một lượng tương đương của huyền phù RSV A2 (được pha loãng đến 1,4 PFU/µl) hoặc RSV B49 (được pha loãng đến 2,8 PFU/µl) được bổ sung vào mẫu huyết tương và hỗn hợp thu được được ủ trong 30 phút ở nhiệt độ 37°C. Sau đó, 50 µl hỗn hợp được bổ sung vào tế bào Vero đã được rửa bằng Opti-MEM, và các tế bào này được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 3 giờ. Tiếp theo, 50 µl avicel 1,2% trong môi trường DMEM có bổ sung FCS 2% đã được làm bất hoạt bằng nhiệt, L-glutamin 2mM, axit amin không thiết yếu và natri pyruvat 1 mM được bổ sung vào mỗi lỗ và tiếp tục để gây nhiễm ở nhiệt độ 37°C trong 3 ngày. Các tế bào được cố định trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng bằng cách bổ sung 50 µl dung dịch paraformaldehyt 2% vào các lỗ. Sau khi cố định, các tế bào được rửa 2 lần bằng nước muối đệm phosphat (PBS), được thấm bằng 50 µl PBS chứa Triton X-100 0,2% trong 10 phút và được phong bế bằng PBS chứa BSA 1%. Sau đó, huyết thanh đa dòng của dê kháng RSV (AB1125, Chemicon International) được bổ sung (1/2000 trong PBS chứa BSA 0,5% và Triton X-100 0,001% (PBS/BSA)). Sau khi rửa 3 lần bằng PBS/BSA, các tế bào được ủ với kháng

thể kháng IgG của dê được liên hợp với peroxidaza cải ngựa (SC2020, Santa Cruz) trong 30 phút. Các lỗ sau đó được rửa 4 lần bằng PBS/BSA và 1 lần bằng PBS. Cuối cùng, vết tan được làm hiện ảnh bằng cách sử dụng cơ chất peroxidaza TrueBlue (KPL, Gaithersburg). Hoạt tính trung hòa RSV trong dịch nổi *Pichia pastoris* thô và của VHH đã được tinh chế (xem dưới đây) cũng được xác định bằng thử nghiệm này.

Phân lập VHH gắn kết DS-Cav1

Các tác giả sáng chế thực hiện một vòng chọn lọc để làm giàu các thể thực khuẩn gắn kết F tiền dung hợp (DS-Cav1). Một lỗ (lỗ A1) trên đĩa chuẩn độ đa lỗ (loại II, F96 Maxisorp, Nunc) được phủ qua đêm bằng 20 µg DS-Cav1 trong PBS. Lỗ này, cùng với lỗ đối chứng âm không được phủ (lỗ A12), được phong bế bằng dung dịch đệm phong bế SEA BLOCK (Thermo Scientific) trong 1 giờ. Tiếp đó, 1012 thể thực khuẩn trong thể tích 100 µl dung dịch đệm phong bế SEA BLOCK được bổ sung vào hai lỗ này. Sau 1 giờ, các hạt thể thực khuẩn không gắn kết được loại bỏ và các lỗ được rửa 10 lần bằng PBST (PBS + Tween20 0,5%). Sau đó, các thể thực khuẩn được giữ lại được rửa giải bằng cách sử dụng dung dịch kiềm chứa 100 µl dung dịch TEA (trietylamin 14% (Sigma), độ pH=10) vào lỗ trong chính xác là 10 phút. Các thể thực khuẩn bị phân ly sau đó được chuyển vào ống vô trùng chứa 100 µl TRIS-HCl 1M, độ pH=8,0. Các dung dịch pha loãng theo bậc 10 lần trong PBS được điều chế với các thể thực khuẩn đã được rửa giải, và 10 µl dãy pha loãng này được sử dụng để gây nhiễm 90 µl tế bào TG1 (tế bào E. coli có khả năng hiển thị thể thực khuẩn). Quá trình gây nhiễm được để trong 30 phút ở nhiệt độ 37°C, sau đó vi khuẩn được ria cấy trên đĩa LB/thạch chứa ampixilin 100 µg/ml và glucoza 1%. Việc làm giàu thể thực khuẩn đặc hiệu kháng nguyên bằng quy trình chọn lọc này được đánh giá bằng cách so sánh lượng hạt phagemit được rửa giải từ lỗ được phủ kháng nguyên với lượng hạt phagemit được rửa giải từ lỗ đối chứng âm.

90 khuẩn lạc kháng ampixilin được lựa chọn ngẫu nhiên để phân tích thêm bằng ELISA về sự có mặt của VHH đặc hiệu F trong chu chất của chúng. Các khuẩn lạc này trước tiên được chuyển vào đĩa thạch LB mới chứa ampixilin và sau đó được sử dụng để cấy vào 1 ml môi trường Terrific Broth (TB) chứa ampixilin 100 µg/ml trong đĩa loại 24 lỗ sâu. Đĩa đã được cấy được ủ ở nhiệt độ 37°C trong điều kiện lắc trong 5 giờ. Sự biểu hiện VHH được cảm ứng bằng cách bổ sung isopropyl β-D-1-thiogalactopyranosit (IPTG) cho tới khi nồng độ bằng 1 mM. Đĩa sau đó được ủ qua

đêm ở nhiệt độ 37°C trong điều kiện lắc. Ngày tiếp theo, tế bào vi khuẩn được làm lắng kết bằng cách ly tâm (12 phút với tốc độ 3200 vòng/phút) và dịch nổi được loại bỏ. Lớp tế bào lắng kết được tái tạo huyền phù trong 200 µl dung dịch đệm TES (TRIS-HCl 0,2 M độ pH=8, EDTA 0,5 mM, sacaroza 0,5 M) và đĩa được lắc ở nhiệt độ 4°C trong 30 phút. Tiếp theo, nước được bổ sung vào các tế bào đã được tái tạo huyền phù để gây ra sốc thẩm thấu, dẫn đến việc giải phóng protein chu chất bao gồm các VHH. Đĩa có lỗ sâu được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ 4°C trong điều kiện lắc, được ly tâm, và dịch nổi, chứa chiết phẩm chu chất được thu hồi. 4 đĩa chuẩn độ đa lỗ được phủ qua đêm bằng 100 ng protein mỗi lỗ trong PBS, 2 đĩa được phủ bằng các hàng xen kẽ của F ở cấu hình riêng hậu dung hợp (McLellan et al., 2011) và BSA, 2 đĩa còn lại được phủ bằng các hàng xen kẽ của DS-Cav1 và BSA. Đĩa chuẩn độ đa lỗ được phủ sau đó được rửa và được phong bế bằng bột sữa 1% trong PBS. Sau khi rửa các đĩa chuẩn độ đa lỗ, 100 µl chiết phẩm chu chất được bổ sung vào các đĩa và sau đó ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ 4°C. Đĩa được rửa và 50 µl dịch pha loãng 1/2000 của kháng thể đơn dòng kháng HA (MMS-101P Biolegend) trong PBS được bổ sung vào đĩa trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi rửa, dịch pha loãng 1/2000 trong PBS của kháng thể kháng IgG của chuột được liên kết với peroxidaza cải ngựa (HRP) (NXA931, GE Healthcare) được bổ sung và đĩa được ủ trong 1 giờ. Tiếp theo, đĩa được rửa và 50 µl cơ chất TMB (Tetrametylbenzidin, BD OptEIA™) được bổ sung vào mỗi lỗ. Phản ứng được dừng bằng cách bổ sung 50 µl $H_2SO_4$ 1M, sau đó độ hấp thụ tại bước sóng 450 nm được đo bằng thiết bị đọc độ hấp thụ đĩa đa lỗ iMark (iMark Microplate Absorbance Reader) (Bio Rad). Toàn bộ các phân đoạn chu chất, mà thu được giá trị OD450 đối với DS-Cav1 hoặc F hậu dung hợp là cao hơn ít nhất 2 lần so với giá trị OD450 thu được đối với BSA, được lựa chọn để phân tích thêm. Vi khuẩn tương ứng được cho sinh trưởng trong 3 ml môi trường LB chứa 1/2000 ampixilin để phân lập plasmit bằng cách sử dụng kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen). Trình tự cADN của VHH đã được tách dòng được xác định bằng kỹ thuật giải trình tự Sanger bằng cách sử dụng đoạn mồi M13RS (5'CAGGAAACAGCTATGACC3' (SEQ ID NO:11)).

Tách dòng VHH vào vectơ biểu hiện *Pichia pastoris* và biến nạp *Pichia pastoris*

Các trình tự VHH, cũng như các trình tự VHH được giữ lại sau khi chọn lọc, được khuếch đại bằng PCR từ plasmit pHEN4 tương ứng bằng cách sử dụng đoạn mồi xuôi và đoạn mồi ngược sau đây

(5'GGCGGGTATCTCTCG GAAAAGGCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGG3 (SEQ ID NO: 12);
5'CTAACTAGTCTAGTGATGGGATGGTGGTGGCTGGAGACGGTGACCTGG 3' (SEQ ID NO: 13)).

Sản phẩm PCR thu được được cắt bằng XhoI và SpeI và được nối vào khung chính pKai61 đã cắt bằng XhoI/SpeI. Nguồn gốc của vectơ pKai61 được mô tả trong tài liệu của Schoonooghe và cộng sự, 2009. Trình tự VHH được tách dòng trong khung đọc với phiên bản được cải biến đôi chút của trình tự tín hiệu yếu tố kết cặp a của *S. cerevisiae*. Trình tự tín hiệu này định hướng các protein đến hệ bài tiết của nấm men, được tiếp tục xử lý trong ER và golgi và được loại bỏ hoàn toàn trước khi tiết vào môi trường ngoại bào. Trái ngược với tín hiệu prepro kiểu dại, phiên bản được cải biến này không chứa các trình tự mã hóa đoạn lặp GluAla (ở đây peptit tín hiệu được phân cắt hiệu quả bằng endopeptidaza Kex2 mà không cần đến đoạn lặp này). Gen được mã hóa chứa thẻ gắn 6xHis đầu cuối C và được kiểm soát bởi vùng khởi đầu AOX1 cảm ứng bằng metanol. Plasmit chứa gen đánh dấu kháng Zeocin để chọn lọc ở vi khuẩn cũng như ở tế bào nấm men. Vectơ được sắp xếp tuyến tính trong vùng khởi đầu AOX1 (bằng PmeI) trước khi biến nạp *P. pastoris* để xúc tiến sự tái tổ hợp tương đồng ở vị trí gen AOX1 nội sinh để tích hợp ổn định vào hệ gen. Các vectơ thu được được đặt tên là pKai-DS-Cav1-4, pKai-DS-Cav1-L66, pKai-VHH-F2 và pKai-VHH-F58 và được sử dụng để biến nạp chủng *Pichia pastoris* sGS115 bằng cách sử dụng quy trình biến nạp ngưng tụ được mô tả bởi Lin-Cereghino và cộng sự, 2005.

Tinh chế VHH được sản xuất bởi *Pichia pastoris*

Sự biểu hiện của VHH bởi các dòng vô tính *Pichia pastoris* biến nạp được phân tích trước tiên trong 2 ml giống cấy. Vào ngày 1, các thể biến nạp riêng rẽ được sử dụng để cấy vào 2 ml môi trường YPNG (pepton 2%, chiết phẩm nấm men Bacto 1%, YNB 1,34%, kali phosphat 0,1M độ pH=6, biotin 0,00004%, glyxerol 1%) chứa Zeocin 100 µg/ml (Life Technologies) và được ủ trong điều kiện lắc ở nhiệt độ 28°C trong 24 giờ. Ngày tiếp theo, tế bào được làm lắng kết bằng cách ly tâm (8 phút với tốc độ 500 g) và môi trường YPNG được thay thế bằng môi trường YPNM (pepton 2%, chiết phẩm nấm men Bacto 1%, YNB 1,34%, kali phosphat 0,1M độ pH=6, biotin

0,00004%, metanol 1%) để cảm ứng sự biểu hiện của VHH và giống cấy được ủ ở nhiệt độ 28°C trong điều kiện lắc trong 72 giờ. 50 µl metanol 50% được bổ sung vào giống cấy tại thời điểm 72 giờ, 80 giờ và 96 giờ. 100 giờ sau khi chuyển vào môi trường chứa metanol, tế bào nấm men được làm lắng kết bằng cách ly tâm (8 phút với tốc độ 500 g) và dịch nổi được giữ lại để đánh giá sự có mặt của VHH. Môi trường thô (25 µl) được nạp lên gel SDS-PAGE 15%, sau đó sự có mặt của protein được phân tích bằng cách nhuộm màu Coomassie Brilliant Blue. Để chọn lọc VHH có hoạt tính trung hòa RSV, các tác giả sáng chế xác định hoạt tính này trong dịch nổi YPNM thô từ các thể biến nạp *Pichia pastoris* riêng rẽ bằng cách sử dụng dịch pha loãng theo bậc của dịch nổi trong thử nghiệm vết tan như được mô tả ở trên.

Thể biến nạp *Pichia pastoris* đạt được mức VHH cao trong môi trường hoặc có hoạt tính trung hòa RSV cao được chọn để tăng quy mô bằng cách sử dụng 100 hoặc 300 ml giống cấy *Pichia*. Điều kiện sinh trưởng và cảm ứng metanol và việc thu môi trường là tương tự như nêu trên đối với giống cấy 2 ml. Môi trường đã được lọc trong được đưa vào bước kết tủa amoni sulphat (bão hòa 80%) trong 4 giờ ở nhiệt độ 4°C. Phần không hòa tan được làm lắng kết bằng cách ly tâm với tốc độ 20.000 g và được hòa tan trong 10 ml dung dịch đệm gắn kết HisTrap (natri phosphat 20 mM, NaCl 0,5 M, imidazol 20 mM, độ pH=7,4), được ly tâm trong 10 phút ở nhiệt độ 4°C, sau đó dịch nổi được nạp lên cột HisTrap HP 1 ml (GE Healthcare), được làm cân bằng trước với dung dịch đệm gắn kết HisTrap. Sau khi rửa cột bằng ít nhất 10 lần thể tích cột của dung dịch đệm gắn kết HisTrap (cho tới khi độ hấp thụ đạt đến đường nền ổn định), protein đã gắn kết được rửa giải bằng građien imidazol tuyến tính bắt đầu từ 20 mM và kết thúc ở 500 mM imidazol trong dung dịch đệm gắn kết HisTrap trên tổng thể tích là 20 ml. Các phần chứa VHH, được xác định bằng cách phân tích SDS-PAGE, được gom lại, và được cô đến 2 ml bằng cột Vivaspin (ngưỡng 5kDa, GE Healthcare). Sau đó, các phân đoạn cô này được nạp lên cột Superdex 75 (160 ml, 0,8 ml/phút) trong PBS và các phân đoạn đỉnh được gom lại và được cô trên cột Vivaspin với ngưỡng 5kDa. Nồng độ protein của phân đoạn gom lại được xác định bằng phép đo A280 bởi NanoDrop 1000 với phần trăm hằng số tắt của dung dịch được tùy chỉnh đối với mỗi VHH. Các phân đoạn đã gom và đã cô được phân thành các phần mẫu và được bảo quản ở nhiệt độ -80°C trước khi sử dụng tiếp.

Tính nồng độ ức chế 50% (IC50) của VHH đã được tinh chế

Để xác định IC50 của các VHH đã được tinh chế được sản xuất bởi *Pichia pastoris*, các dịch pha loãng theo bậc 3 lần được điều chế trong Opti-Mem của các VHH này được đánh giá trong thử nghiệm trung hòa RSV như được mô tả ở trên. Các IgG đơn dòng D25 và AM22 (Beaumont et al., 2012, Spits et al., 2013), cả 2 đều nhằm kháng đặc hiệu cấu hình riêng tiền dung hợp của F, được sử dụng làm đối chứng dương. NB 1.12, VHH nhằm kháng đại globulin α, được sử dụng làm đối chứng âm. Giá trị IC50 được tính toán một cách thủ công.

Gắn kết in vitro của VHH với DS-Cav1 và F hậu dung hợp

Sự gắn kết của VHH đã được tinh chế với DS-Cav1 và F hậu dung hợp được thử nghiệm trong ELISA trực tiếp. Đĩa chuẩn độ đa lỗ (kiểu II, F96 Maxisorp, Nunc) được phủ bằng 100 µl dung dịch DS-Cav1 1 µg/ml hoặc dung dịch F hậu dung hợp 1 µg/ml trong PBS. Sau khi rửa, đĩa được phong bế trong 1 giờ bằng 200 µl sữa 4% trong PBS, sau đó được rửa lại 1 lần bằng PBS. Dãy pha loãng 1/3 của VHH (bắt đầu từ 30 µg/ml) sau đó được cho vào các lỗ đã được phủ bằng protein. Sau 1 giờ, đĩa được rửa và dịch pha loãng 1/2000 của kháng thể kháng thẻ gắn histidin (AD1.1.10 AbD Serotec) trong PBS được bổ sung trong 1 giờ. Sau khi rửa và bổ sung kháng thể kháng IgG của chuột liên kết với HRP trong 1 giờ (trong dịch pha loãng 1/2000), ELISA được phát triển theo cùng cách giống như PE-ELISA được mô tả ở trên. Để xác định ái lực, DS-Cav1 đã được tinh chế cùng với StrepTag II và 6X HisTag được bắt giữ trên chíp cảm biến NTA đến khoảng 537 đơn vị đáp ứng (RU) cho mỗi vòng bằng cách sử dụng Biacore X100 (GE). Chíp cảm biến NTA được tái tạo giữa các vòng bằng cách sử dụng EDTA 0,25M sau đó sử dụng $NiCl_2$ 0,5 mM. Mẫu chỉ chứa dung dịch đệm được tiêm vào DS-Cav1 và tế bào dòng tham chiếu, sau đó pha loãng theo bậc 2 lần Nb4 hoặc Nb66 từ 5 nM đến 39,1 pM trong HBS-P+, bằng cách sao chép nồng độ 1,25 nM. Số liệu được trừ đi 2 lần giá trị tham chiếu và phù hợp với mô hình gắn kết 1:1 sử dụng Scrubber.

Sự gắn kết của VHH với F được biểu hiện lên bề mặt của tế bào đã chuyển nhiễm bằng vectơ biểu hiện cADN protein F của RSV được đánh giá bằng cách phân tích tế bào theo dòng chảy. Tế bào HEK293T được cấy tại 4.000.000 tế bào mỗi đĩa nuôi cấy mô 150 mm và chuyển nhiễm bằng 6,4 µg pCAGGS-Fsyn, mã hóa cADN

protein F của RSV được tối ưu hóa codon, bằng thuốc thử chuyển nhiễm FuGENE HD (Promega). Để chỉ ra tế bào được chuyển nhiễm, quá trình chuyển nhiễm được thực hiện với sự có mặt của 6,4 µg peGFP-NLS. Quá trình chuyển nhiễm đối chứng được thực hiện chỉ bằng peGFP-NLS. 18 giờ sau khi chuyển nhiễm, các tế bào được tách rời bằng 15 ml dung dịch trypsin-EDTA (trypsin 0,05%, EDTA 0,5 mM (độ pH=8,0)) được rửa 1 lần trong PBS và được ủ trong 30 phút trong PBS chứa BSA 1% (PBS/BSA). Sau đó, các tế bào này được ủ với VHH được chỉ định hoặc với kháng thể đơn dòng của chuột đặc hiệu protein F của RSV (MAB858-1, Chemicon International) tại các nồng độ khác nhau như được chỉ ra trên Fig.8). Một giờ sau, các tế bào được rửa 1 lần bằng PBS/BSA và được ủ bằng kháng thể kháng thẻ gắn Histidin được pha loãng 1/3000 trong PBS/BSA trong suốt 1 giờ. Tiếp theo, các tế bào này được rửa 1 lần bằng PBS/BSA và kháng thể Alexa 633 kháng IgG chuột được bổ sung trong suốt 30 phút. Sau khi rửa các tế bào 3 lần bằng PBS, các tế bào được phân tích bằng cách sử dụng thiết bị phân tích tế bào theo dòng chảy FACSCalibur. Các tế bào đơn biểu hiện GFP được chọn dựa trên bề mặt đỉnh của tín hiệu tán xạ bên, bề mặt đỉnh và chiều cao đỉnh của tín hiệu tán xạ góc hẹp và bề mặt đỉnh của tín hiệu phát huỳnh quang xanh. Cuối cùng, đo được tín hiệu cường độ phát huỳnh quang Alexa 633 của các tế bào đơn dương tính với GFP này.

Chuột nhắt

Chuột nhắt BALB/c cái, không có mầm bệnh cụ thể, được thu từ Charles River (Charles River Wiga, Sulzfeld, Germany). Các con chuột được nuôi nhốt trong môi trường được kiểm soát nhiệt độ với chu kỳ 12 giờ sáng/tối; thức ăn và nước được cung cấp tùy ý. Điều kiện để nuôi động vật hoạt động theo Giấy phép của chính phủ Bỉ (the Flemish Government License Number) số LA1400536. Toàn bộ thử nghiệm được thực hiện theo các điều kiện được luật pháp chỉ định và được ủy quyền bởi Hội đồng đạo đức về động vật thử nghiệm (The Institutional Ethical Committee on Experimental Animals) (Ethical application EC2015-019).

Sử dụng VHH và kháng thể đơn dòng và liều quyết định RSV cho chuột nhắt

Chuột được gây mê nhẹ bằng isofluran trước khi dùng VHH, palivizumab hoặc virut RSV liều quyết định trong mũi. VHH, palivizumab (Synagis, Medimmune) và virut RSV được dùng trong tổng thể tích 50 µl được bào chế trong PBS, được phân

bố đều qua 2 lỗ mũi. Mỗi nhóm 5 con chuột được nhận 30 µg DS-Cav1-4, 30 µg VHH DS-Cav1-L66, 30 µg VHH F2 (làm đối chứng âm) hoặc 30 µg palivizumab (làm đối chứng dương) 4 giờ trước khi gây nhiễm bằng 1.000.000 PFU của RSV A2. Tất cả các nhóm cũng được nhận 30 µg đối chứng âm VHH F2 24 giờ sau khi gây nhiễm.

Xác định độ chuẩn virut trong phổi bằng thử nghiệm vết tan

5 ngày sau khi dùng liều quyết định, các con chuột bị làm chết bằng cách làm trật khớp cổ. Phổi của các con chuột được lấy ra trong điều kiện vô trùng và được làm đồng nhất bằng cách lắc mạnh bằng thiết bị Mixer Mill MM 2000 (Retsch) với sự có mặt của hạt kim loại vô trùng trong 1 ml HBSS chứa sacaroza 20% và có bổ sung penixilin 1% và streptomyxin 1%. Sản phẩm phổi đồng nhất sau đó được lọc trong bằng cách ly tâm (10 phút tại tốc độ 2500 vòng/phút) ở nhiệt độ 4°C và được sử dụng lặp lại hai lần để chuẩn độ virut trên tế bào Vero. Lớp đơn tế bào Vero được gây nhiễm 50 µl dịch pha loãng theo bậc 1:3 của sản phẩm phổi đồng nhất trong đĩa loại 96 lỗ trong môi trường Opti-MEM không có huyết thanh (Invitrogen) có bổ sung penixilin và streptomyxin. Thử nghiệm vết tan được tiến hành tiếp như được mô tả ở trên. Vết tan trong mỗi lỗ được đếm, và đối với mỗi dịch pha loãng, số lượng PFU trong mỗi phổi (1ml) được tính như sau: số lượng vết tan có trong dịch pha loãng x dịch pha loãng x 20 (= 1000 µl tổng thể tích dịch nổi / 50 µl dịch nổi được sử dụng để gây nhiễm lỗ đầu tiên của dãy pha loãng). Sau đó, số lượng PFU trong mỗi phổi được tính dưới dạng giá trị trung bình của hai lần lặp lại.

Xác định độ chuẩn virut trong phổi bằng qRT-PCR

Để xác định tải lượng RSV trong phổi bằng qRT-PCR, toàn bộ ARN từ sản phẩm phổi đồng nhất đã được lọc trong được chuẩn bị bằng cách sử dụng kit mô ARN độ tinh khiết cao (Roche, Mannheim) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. cADN được chuẩn bị bằng cách sử dụng các đoạn mồi hexame ngẫu nhiên và kit tổng hợp cADN sợi đầu tiên của yếu tố phiên mã (Roche, Mannheim). Mức tương đối của cADN gen M của hệ gen RSV được xác định bằng qRT-PCR bằng cách sử dụng đoạn mồi đặc hiệu với gen M của RSV A2 (5'TCACGAAGGCTCCACATACA3' (SEQ ID NO: 14) và 5'GCAGGGTCATCGTCTTTTTC3' (SEQ ID NO: 15)) và đoạn dò nucleotit (#150 Universal Probe Library, Roche) được đánh dấu bằng floresxein (FAM) tại đầu

5'và bằng thuốc nhuộm dập tắt đen gần đầu 3'. Số liệu qRT-PCR được chuẩn hóa theo mức mARN mRPL13A có trong các mẫu của mỗi chuột.

Tính cạnh tranh chéo của kháng thể khi gắn kết DS-Cav1

Protein DS-Cav1 (10 µg/ml) được giữ cố định trên bộ cảm biến sinh học AR2G thông qua phản ứng liên hợp amin trong dung dịch đệm axetat (độ pH=5,0). Phản ứng được dừng bằng etanolamin 1M và bộ cảm biến sinh học DS-Cav1 được giữ cố định sau đó được làm cân bằng bằng dung dịch đệm thử nghiệm (PBS với BSA 1%). Bộ cảm biến sinh học được ngâm trong kháng thể cạnh tranh (35 µg/ml trong dung dịch đệm thử nghiệm) sau đó kháng thể phân tích (35 µg/ml trong dung dịch đệm thử nghiệm) có bước cơ sở ngắn giữa hai bước kháng thể.

Ví dụ 1: Hoạt tính trung hòa RSV trong huyết tương của lạc đà không bướu

Để đánh giá việc cảm ứng các đáp ứng thể dịch kháng RSV ở lạc đà không bướu sau khi gây miễn dịch bằng DS-Cav1, các mẫu huyết tương thu được trước và sau mỗi bước gây miễn dịch được thử nghiệm trong thử nghiệm trung hòa RSV. Các mẫu được thử nghiệm về hoạt tính trung hòa của chúng kháng RSV A2 và các chủng lâm sàng của B RSV, RSV B49. Fig.1 minh họa toàn bộ mẫu huyết tương thu được sau khi gây miễn dịch lần thứ 4 có hoạt tính trung hòa cao kháng RSV A2 và RSV B49.

Ví dụ 2: Phân lập VHH đặc hiệu DS-Cav1

Thư viện thể thực khuẩn VHH được chọn lọc một vòng trên protein DS-Cav1. Việc làm giàu các thể thực khuẩn đặc hiệu DS-Cav1 được đánh giá bằng cách so sánh số lượng thể thực khuẩn được rửa giải từ các lỗ được phủ DS-Cav1 với số lượng thể thực khuẩn được rửa giải từ các lỗ không được phủ. Số lượng thể thực khuẩn được rửa giải được ước lượng gián tiếp bằng cách xác định các đơn vị tải nạp kháng ampixilin, nghĩa là số lượng khuẩn lạc TG1 được tải nạp bằng thể thực khuẩn được rửa giải trong bước chọn lọc. Thử nghiệm này gợi ý rằng quần thể thể thực khuẩn được làm giàu khoảng 140 lần đối với thể thực khuẩn đặc hiệu DS-Cav1. 90 khuẩn lạc được chọn ngẫu nhiên và phân tích bằng ELISA với sự có mặt của các VHH đặc hiệu với cấu hình riêng tiền dung hợp của F (DS-Cav1) so với cấu hình riêng hậu dung hợp của F trong chiết phẩm chu chất của chúng. Kết quả của ELISA này được thể hiện trên Fig.2. Trong số 90 khuẩn lạc, 37 khuẩn lạc được cho điểm dương (10

khuẩn lạc được cho điểm dương về việc gắn kết với cả F tiền dung hợp và F hậu dung hợp, 19 khuẩn lạc được cho điểm dương về việc gắn kết chỉ với F tiền dung hợp và 8 khuẩn lạc được cho điểm dương về việc gắn kết chỉ với F hậu dung hợp). Trình tự VHH của tất cả các khuẩn lạc được gợi ý gắn kết với F tiền dung hợp và/hoặc F hậu dung hợp được xác định. 28 dòng vô tính trong số 37 dòng có trình tự VHH độc nhất và được chọn để sử dụng tiếp. Trình tự VHH của các dòng vô tính này được tách dòng vào vectơ biểu hiện *Pichia pastoris* và plasmit thu được sau đó được sử dụng để biến nạp *Pichia pastoris*.

Ví dụ 3: Thử nghiệm hoạt tính trung hòa trong dịch nổi *Pichia pastoris*

Các tác giả sáng chế cũng cố gắng tách dòng thư viện VHH cADN thu được sau một vòng chọn lọc trên DS-Cav1 vào vectơ biểu hiện *Pichia pastoris* pKai61. Các tác giả sáng chế sử dụng chiến lược này để cố gắng chọn lọc các VHH có liên quan về mặt sinh học dựa trên hoạt tính trung hòa RSV trong dịch nổi của các thể biến nạp *Pichia pastoris* riêng rẽ. Từ 20 thể biến nạp *Pichia pastoris* riêng rẽ được chọn lọc dựa trên sự gắn kết với F, 5 thể biến nạp có hoạt tính trung hòa đối với RSV A2 (trong đó DS-Cav1-4 có hiệu lực nhất), trong khi đó từ 18 dòng vô tính thu được từ thư viện tách dòng vào pKai61, chỉ có một dòng vô tính (VHH DS-Cav1-L66) thể hiện hoạt tính trung hòa (Fig.3).

Trình tự cADN của DS-Cav1-4 và DS-Cav1-L66 được xác định bằng kỹ thuật giải trình tự Sanger và trình tự nucleotit cũng như trình tự axit amin suy luận được được thể hiện trên Fig.5.

Ví dụ 4: Sản xuất và xác định IC50 của VHH đã được tinh chế

Trước khi tinh chế, VHH DS-Cav1-4 và VHH DS-Cav1-L66 có các VHH trung hòa RSV có hiệu lực nhất và hai VHH này cũng như các VHH đối chứng âm F2 và VHH-F58 được tạo ra trong 300 ml giống cấy *Pichia pastoris* và được tinh chế bằng kỹ thuật tinh chế HisTrap, sau đó bằng kỹ thuật sắc ký phân tách theo kích cỡ Superdex 75 (Fig.4). VHH F2 và VHH-F58 là các VHH đối chứng không liên quan thu được từ thư viện VHH có nguồn gốc từ lạc đà không bướu khác đã được gây miễn dịch bằng virut Junin đã được làm bất hoạt. VHH DS-Cav1-4 và VHH DS-Cav1-L66 làm trung hòa in vitro RSV A2 với IC50 lần lượt là 0,021 nM và 0,032 nM. Đối với việc trung hòa RSV B49, VHH DS-Cav1-4 và VHH DS-Cav1-L66 thể hiện IC50 lần

lượt là 0,015 nM và 0,032 nM. Để đánh giá xem liệu VHH DS-Cav1-4 và VHH DS-Cav1-L66 có thể trung hòa typ huyết thanh A và/hoặc B Metapneumovirut của người, lượng đã định của virut tái tổ hợp hMPV biểu hiện GFP (phân dòng A1 NL/1/00 hoặc phân dòng B1 NL/1/99, do Bernadette van den Hoogen và Ron Fouchier, Rotterdam, Hà Lan cung cấp) hoặc GFP-hRSV (chủng A2, do Mark Peeples, Columbus, Ohio, Hoa Kỳ cung cấp) (MOI 0,3 ffu/tế bào) được trộn với các dịch pha loãng theo bậc của VHH hoặc mAb và được bổ sung vào giống cấy của tế bào Vero-118 (hMPV) hoặc tế bào HEp-2, cho sinh trưởng trong đĩa loại 96 lỗ. 36 giờ sau đó, môi trường được loại bỏ, PBS được bổ sung và cường độ phát huỳnh quang của GFP trong mỗi lỗ được đo bằng máy đọc đĩa đa lỗ Tecan M200. Giá trị phát huỳnh quang được dựng đồ thị dưới dạng tỷ lệ phần trăm của đối chứng virut không có kháng thể và được sử dụng để tính giá trị IC50 tương ứng.

Ví dụ 5: DS-Cav1-4 và DS-Cav1-L66 gắn kết với RSV F ở trạng thái tiền dung hợp nhưng không gắn kết với RSV F ở trạng thái hậu dung hợp.

Để đánh giá khả năng gắn kết của DS-Cav1-4 và DS-Cav1-L66 với F tiền dung hợp và F hậu dung hợp, các tác giả sáng chế đã thực hiện ELISA trong đó F ở một trong hai cấu hình riêng được phủ trực tiếp lên đĩa chuẩn độ đa lỗ và dãy pha loãng 3 lần của VHH được bổ sung vào đĩa này (Fig.7A). Các tác giả sáng chế thấy rằng VHH DS-Cav1-4 và VHH DS-Cav1-L66 liên kết đặc hiệu với F tiền dung hợp được phủ và không liên kết với F được phủ ở cấu hình riêng hậu dung hợp. Để mô tả tiếp ái lực gắn kết với protein F tiền dung hợp, các tác giả sáng chế đã thực hiện các thử nghiệm gắn kết dựa trên SPR. Các tác giả sáng chế thấy rằng ISVD gắn kết với RSV F tiền dung hợp bằng ái lực picomol. Ngạc nhiên là ISVD thể hiện ái lực cao này với đích của nó, vì chúng là hóa trị một, trái với kháng thể đơn dòng thông thường như palivizumab hoặc AM14 (Gilman et al., 2015) là hóa trị hai về bản chất. Cụ thể là, tỷ lệ phân ly của DS-Cav1-4 là rất thấp.

Sự gắn kết của VHH DS-Cav1-4 và VHH DS-Cav1-L66 với F được biểu hiện bởi tế bào động vật có vú cũng được đánh giá. Tế bào HEK293T được đồng chuyển nhiễm bằng pCAGGS-Fsyn, mã hóa cADN F được tối ưu hóa codon và peGFP-NLS. Tế bào được thu 18 giờ sau khi chuyển nhiễm và được nhuộm với VHH DS-Cav1-4, VHH DS-Cav1-L66, VHH đối chứng âm F58 và F2 và kháng thể IgG đơn dòng của chuột nhắt đặc hiệu với protein F của RSV. Sự gắn kết của VHH đối với tế bào dương

tính với GFP trong việc sắp đặt quá trình đồng chuyển nhiễm được so với việc gắn kết với tế bào dương tính với GFP đã được chuyển nhiễm chỉ bằng vectơ biểu hiện GFP. Quan sát thấy sự gắn kết hoàn toàn đối với toàn bộ dịch pha loãng của VHH DS-Cav1-4 và VHH DS-Cav1-L66 và đối với 3 nồng độ cao nhất của kháng thể đơn dòng đối chứng dương nhằm kháng protein F của RSV (Fig.8).

Ví dụ 6: DS-Cav1-4 và DS-Cav1-L66 gắn kết với epitop mới của RSV F

Để nghiên cứu xem liệu DS-Cav1-4 và DS-Cav1-L66 có gắn kết với epitop Ø đặc hiệu F tiền dung hợp vừa được mô tả hay không, các tác giả sáng chế đã nghiên cứu xem liệu các VHH này có thể cạnh tranh với kháng thể D25 đặc hiệu epitop Ø để gắn kết với protein RSV F tiền dung hợp bằng kỹ thuật giao thoa lớp sinh học hay không (Fig.9). Thử nghiệm cạnh tranh chỉ ra rằng các VHH này không cạnh tranh với D25. Ngược lại, hai VHH này cạnh tranh với nhau. Các kết quả này cho thấy rằng cả hai VHH đều gắn kết với các epitop chồng lặp, nhưng các epitop này khác với epitop Ø của D25.

Việc tiếp tục xác định đặc điểm của epitop ISVD xác nhận rằng DS-Cav1-4 và DS-Cav1-L66 gắn kết cùng một epitop trên RSV F, với sự bảo toàn cấu trúc cao (Fig.11A-D). Trên Fig.11C, các gốc của protein RSV F tiền dung hợp được làm ổn định (khung đọc mở đầy đủ, trước khi xử lý in vivo, SEQ ID NO: 17) được tiếp xúc bởi cả DS-Cav1-4 và DS-Cav1-L66 được gạch dưới. Cụ thể là, các gốc axit amin sau đây của protein RSV F tạo thành một phần của epitop của DS-Cav1-4 và DS-Cav1-L66: T50, G51, W52, S180, G184, V185, P265, I266, T267, N268, D269, Q270, L305, G307, V308, N345, A346, G347, K421, S425, K427, N428, R429, G430, I431, S451, G453, N454, L456, Y458. Các gốc này là epitop của cả DS-Cav1-4 và DS-Cav1-L66. Các chi tiết khác về sự gắn kết của các vòng CDR2 và CDR3 được thể hiện trên Fig.12 (đối với DS-Cav1-4) và Fig.13 (đối với DS-Cav1-L66).

Cấu trúc của protein F ở cấu hình riêng tiền dung hợp trong phức hợp với motavizumab, AM14, 101F và DS-Cav1-4 bộc lộ epitop gắn kết mới (Fig.14). Toàn bộ các kháng thể khác, mà đã biết cấu trúc đồng tinh thể với RSV F, gắn kết với epitop mà khác với epitop được liên kết bởi DS-Cav1-4 và DS-Cav1-L66. Thậm chí các kháng thể mà cạnh tranh với DS-Cav1-4 (nghĩa là AM14 và palivizumab) và DS-Cav1-L66 (nghĩa là AM14, palivizumab và 101F) để gắn kết với RSV F tiền dung

hợp được làm ổn định, và epitop gắn kết đã được xác định rõ ràng cho chúng bằng phân tích cấu trúc đồng tinh thể, gắn kết với epitop khác trong RSV F. Điều này được thể hiện trên Fig.14. Các tác giả sáng chế lưu ý rằng palivizumab và motavizumab gắn kết cùng một epitop trong RSV F, và epitop này có mặt ở trạng thái tiền dung hợp và hậu dung hợp của RSV F.

Ví dụ 7: Thử nghiệm hoạt tính kháng RSV dự phòng của VHH in vivo

Để thử nghiệm xem liệu việc dùng dự phòng VHH DS-Cav1-4 hoặc DS-Cav1-L66 có thể bảo vệ kháng lại liều quyết định RSV in vivo hay không, chuột nhắt BALB/c cái (5 con chuột mỗi nhóm) nhận 30 µg VHH DS-Cav1-4, VHH DS-Cav1-L66, VHH F2 hoặc palivizumab trong mũi 4 giờ trước khi gây nhiễm bằng 1,106 PFU RSV A2). 24 giờ sau khi dùng liều quyết định, toàn bộ chuột nhận 30 µg VHH F2 trong mũi. 5 ngày sau khi dùng liều quyết định, các con chuột bị làm chết và phổi được làm đồng nhất trong 1 ml HBSS có bổ sung sacaroza 20%, penixilin và streptomyxin. Các con chuột được xử lý bằng DS-Cav1-4, DS-Cav1-L66 hoặc palivizumab không có virut đang sao chép đến mức có thể phát hiện được trong phổi của chúng (ngoài trừ một con chuột được xử lý bằng palivizumab) (Fig.10 A), ngược lại với nhóm được xử lý bằng VHH F2 mà thể hiện mức virut đang sao chép cao trong phổi của chúng (khoảng $1x10^5$ PFU). Khi thử nghiệm vết tan được sử dụng để định mức virut sao chép trong phổi có thể bị ảnh hưởng bởi sự có mặt của kháng thể hoặc VHH trung hòa, các tác giả sáng chế định mức thêm ARN RSV trong sản phẩm phổi đồng nhất bằng qRT-PCR. Các con chuột được xử lý bằng DS-Cav1-4 và DS-Cav1-L66 có mức ARN virut trung bình ít hơn trên 3000 lần so với chuột đối chứng được xử lý bằng F2. Các con chuột được xử lý bằng palivizumab có mức ARN virut trung bình ít hơn khoảng 100 lần so với chuột đối chứng được xử lý bằng F2.

Tài liệu tham khảo

1. Gilman, M.S.A., et al. Characterization of a prefusion-specific antibody that recognizes a quaternary, cleavage-dependent epitope on the RSV fusion glycoprotein. PLoS Pathog, 11, 1-17 (2015).
2. Hultberg, A., et al. Llama-derived single domain antibodies to build multivalent, superpotent and broadened neutralizing anti-viral molecules. PLoS One, 6, e17665 (2011).

3. Lin-Cereghino, J., et al. Condensed protocol for competent cell preparation and transformation of the methylotrophic yeast Pichia pastoris. Biotechniques, 38, 44, 46, 48 (2005).
4. McLellan, J.S., et al. Structure of respiratory syncytial virus fusion glycoprotein in the postfusion conformation reveals preservation of neutralizing epitopes. J Virol, 85, 7788-96 (2011).
5. McLellan, J.S., et al. Structure of RSV fusion glycoprotein trimer bound to a prefusion-specific neutralizing antibody. Science 340, 1113-1117 (2013).
6. McLellan, J.S., et al. Structure-based design of a fusion glycoprotein vaccine for respiratory syncytial virus. Science 342, 592-598 (2013).
7. Scheppens, B., et al. Nanobodies specific for respiratory syncytial virus fusion protein protect against infection by inhibition of fusion. J. Infect Dis., 11, 1692-701(2011).
8. Schoonooghe, S., et al. Efficient production of human bivalent and trivalent anti-MUC1 Fab-scFv antibodies in Pichia pastoris. BMC Biotechnol., 9, 70 (2009).
9. Tan, L., et al. The comparative genomics of human respiratory syncytial virus subgroups A and B: genetic variability and molecular evolutionary dynamics. J Virol. 87, 8213-26 (2013).

## YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch (ISVD) gắn kết đặc hiệu với dạng tiền dung hợp của protein dung hợp (F) của virut hợp bào hô hấp (RSV), khác biệt ở chỗ ISVD này, ở dạng hóa trị một, thể hiện hoạt tính trung hòa các typ huyết thanh RSV A và B tại đó giá trị $IC_{50}$ khác 10 lần hoặc ít hơn, và khác biệt ở chỗ ISVD gắn kết với epitop cấu hình riêng của protein RSV F tiền dung hợp chứa các axit amin 50-52, 180, 184, 185, 265-270, 305, 307, 308, 345-347, 421, 425, 427-431, 451, 453, 454, 456 và 458 như được mô tả trong SEQ ID NO: 17, khác biệt ở chỗ ISVD này chứa trình tự CDR1 SEQ ID NO: 1, trình tự CDR2 được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 3 và SEQ ID NO: 4, và trình tự CDR3 được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 5 và SEQ ID NO: 6.

2. Cấu trúc gắn kết RSV, khác biệt ở chỗ cấu trúc gắn kết RSV này chứa ISVD theo điểm 1.

3. Axit nucleic được tinh chế, khác biệt ở chỗ axit nucleic này mã hóa ISVD theo điểm 1.

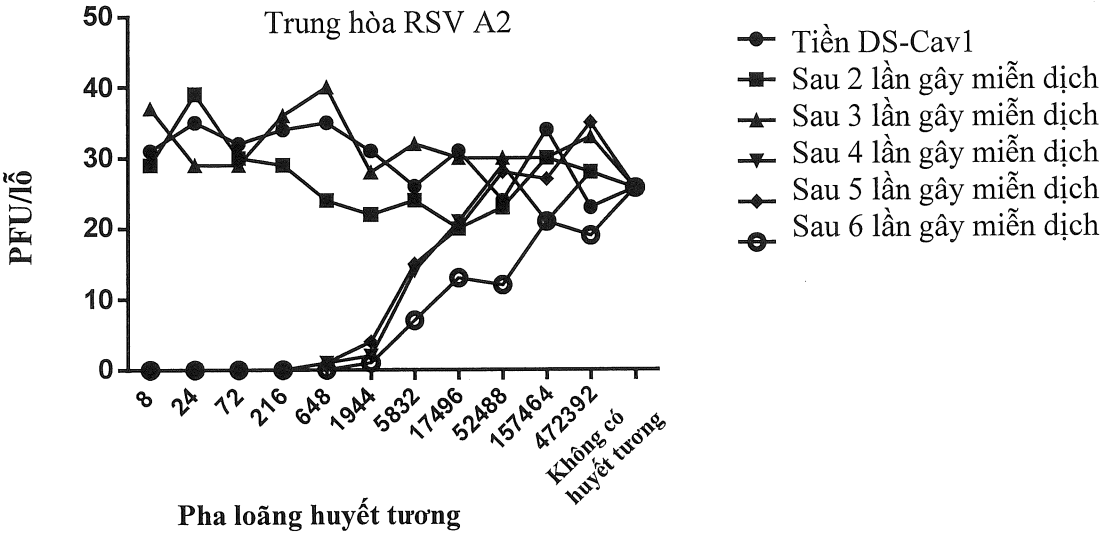
4. Tế bào chủ được nuôi cấy, khác biệt ở chỗ tế bào chủ này được biến nạp hoặc chuyển nhiễm bằng axit nucleic theo điểm 3.

5. Phương pháp sản xuất ISVD bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ theo điểm 4.

6. Dược phẩm, khác biệt ở chỗ dược phẩm này chứa ít nhất một ISVD theo điểm 1.

**Fig.1**

A


Trung hòa RSV A2
PFU/lỗ
50
40
30
20
10
0
8
24
72
216
648
1944
5832
17496
52488
157464
472392
Không có huyết tương
Pha loãng huyết tương
Tiền DS-Cav1
Sau 2 lần gây miễn dịch
Sau 3 lần gây miễn dịch
Sau 4 lần gây miễn dịch
Sau 5 lần gây miễn dịch
Sau 6 lần gây miễn dịch

B

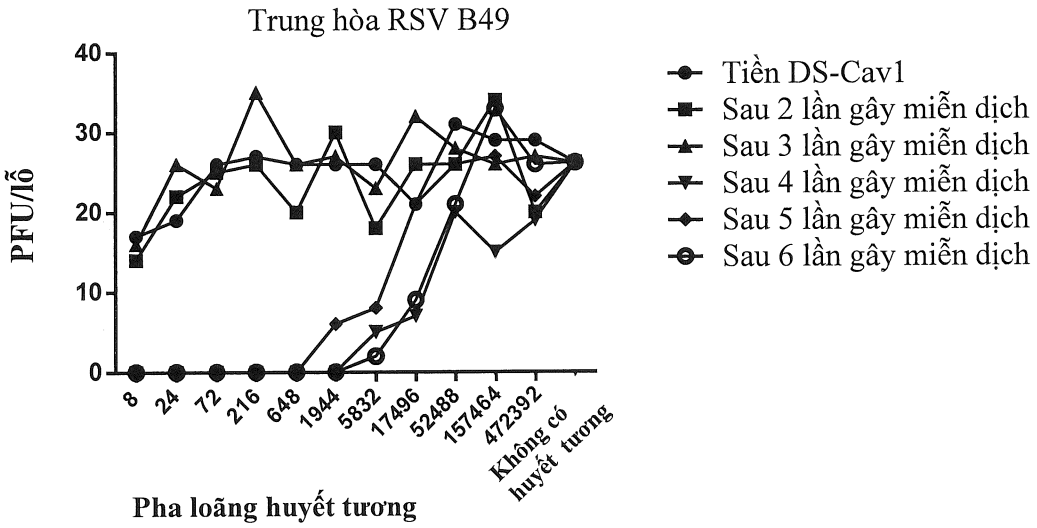

Trung hòa RSV B49
PFU/lỗ
40
30
20
10
0
8
24
72
216
648
1944
5832
17496
52488
157464
472392
Không có huyết tương
Pha loãng huyết tương
Tiền DS-Cav1
Sau 2 lần gây miễn dịch
Sau 3 lần gây miễn dịch
Sau 4 lần gây miễn dịch
Sau 5 lần gây miễn dịch
Sau 6 lần gây miễn dịch

**Fig.2**

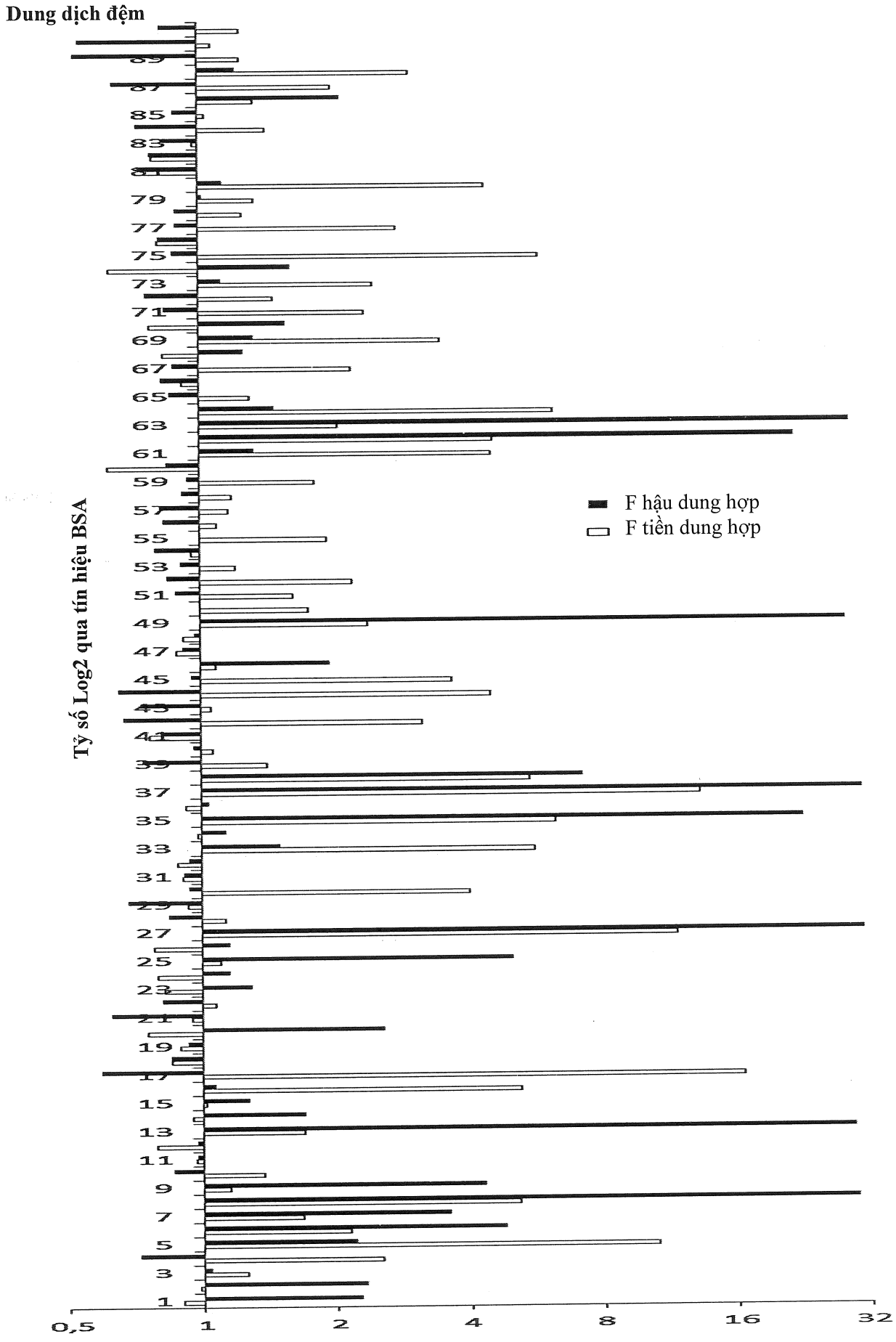

Dung dịch đệm
Tỷ số Log2 qua tín hiệu BSA
F hậu dung hợp
F tiền dung hợp
89
87
85
83
81
79
77
75
73
71
69
67
65
63
61
59
57
55
53
51
49
47
45
43
41
39
37
35
33
31
29
27
25
23
21
19
17
15
13
11
9
7
5
3
1
0,5
1
2
4
8
16
32

**Fig.3**

**A**

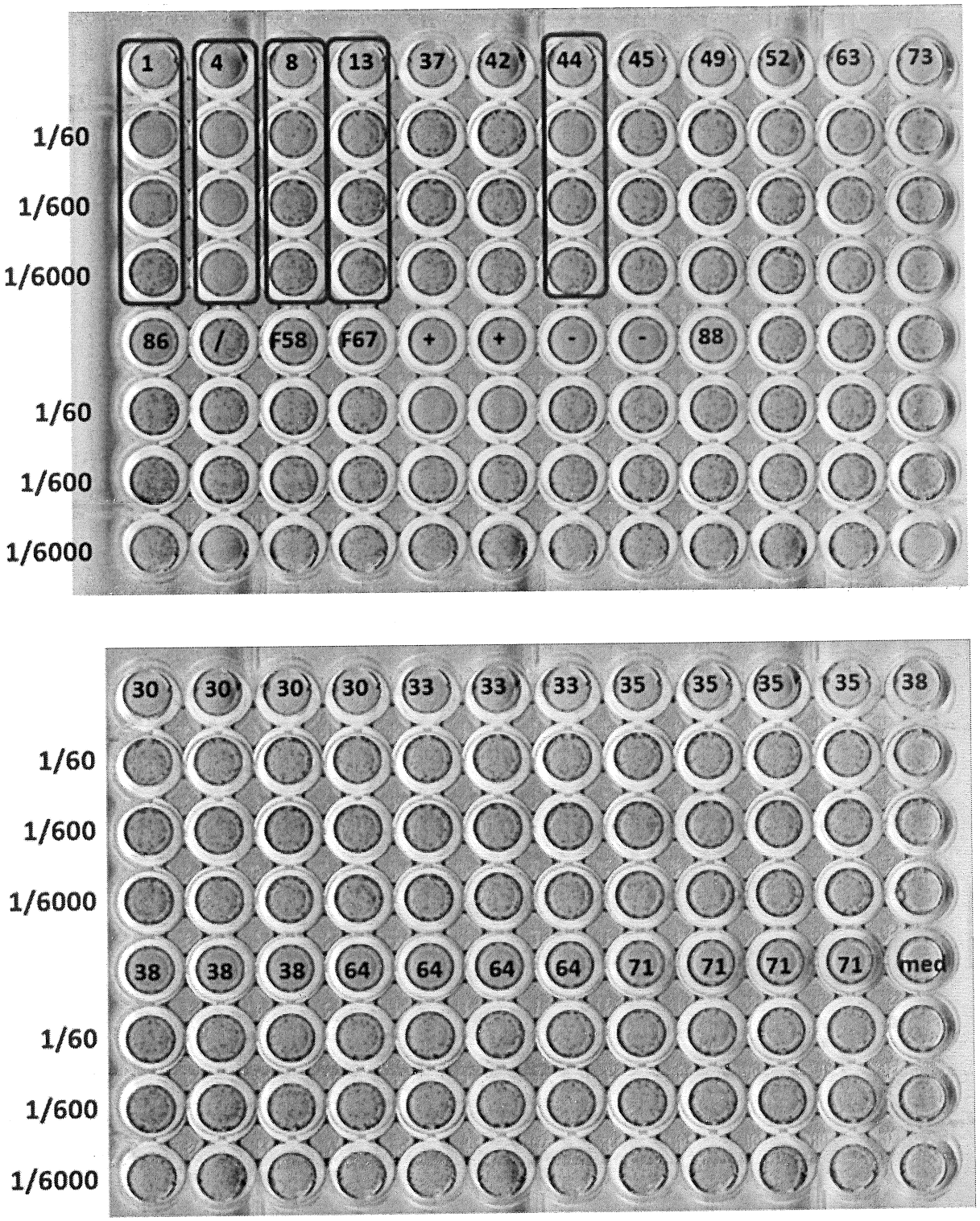

1
4
8
13
37
42
44
45
49
52
63
73
1/60
1/600
1/6000
86
/
F58
F67
+
+
-
-
88
1/60
1/600
1/6000
30
30
30
30
33
33
33
35
35
35
35
38
1/60
1/600
1/6000
38
38
38
64
64
64
64
71
71
71
71
med
1/60
1/600
1/6000

**Fig.3 tiếp**

**B**

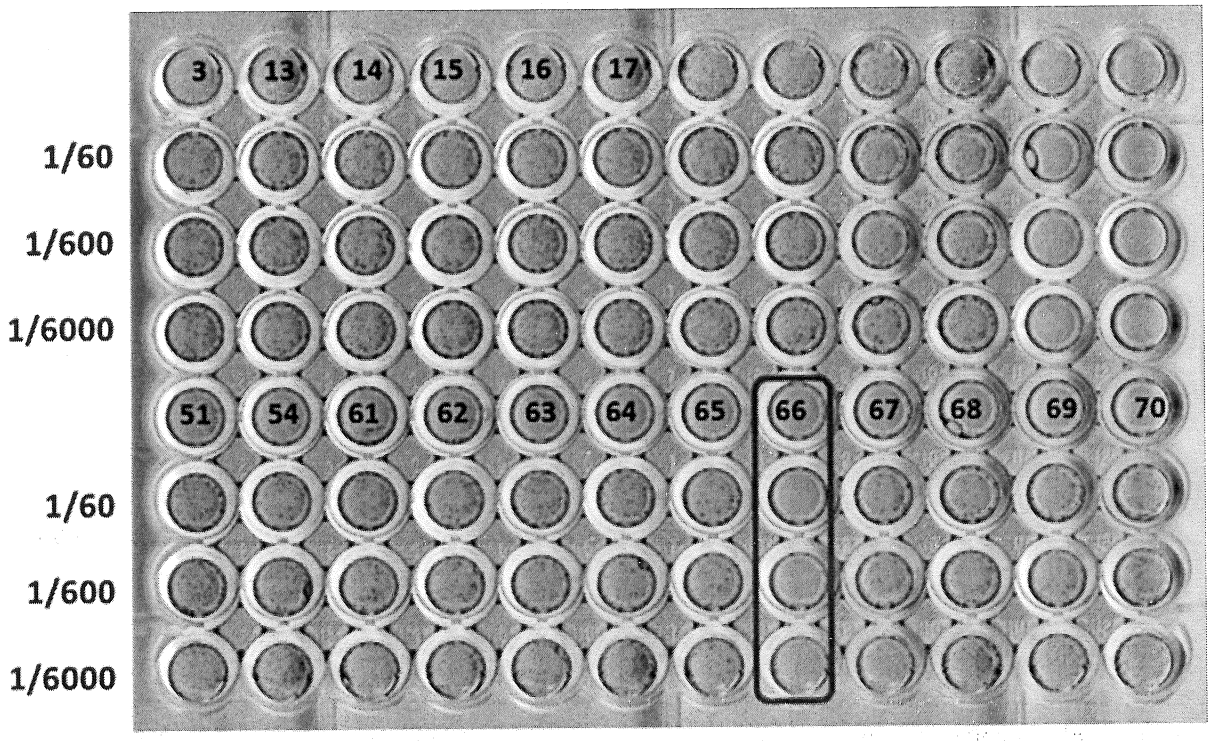
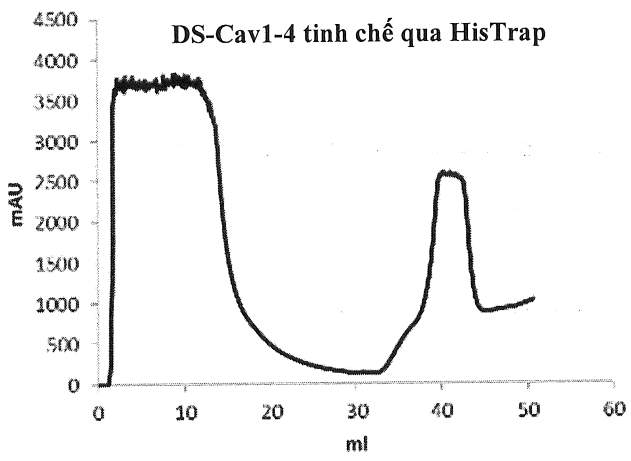



**Fig.4**

**A**



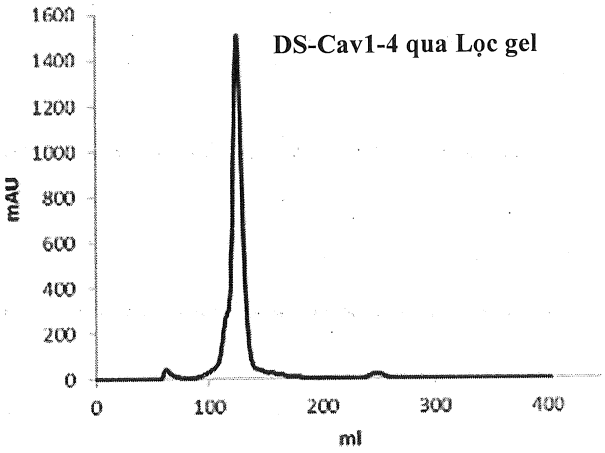
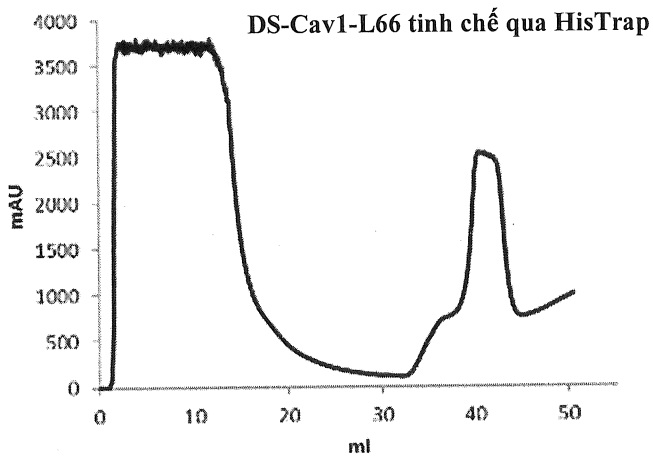
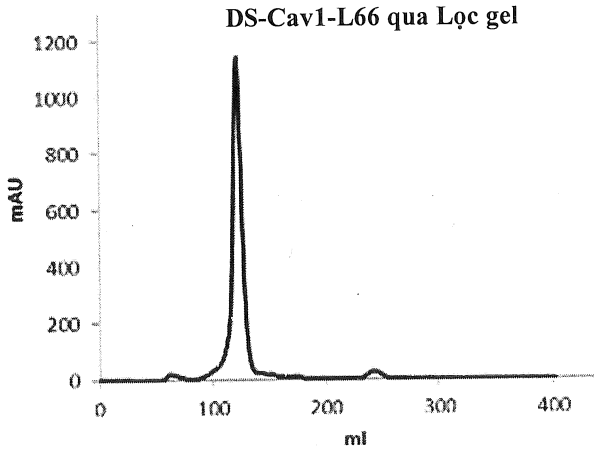



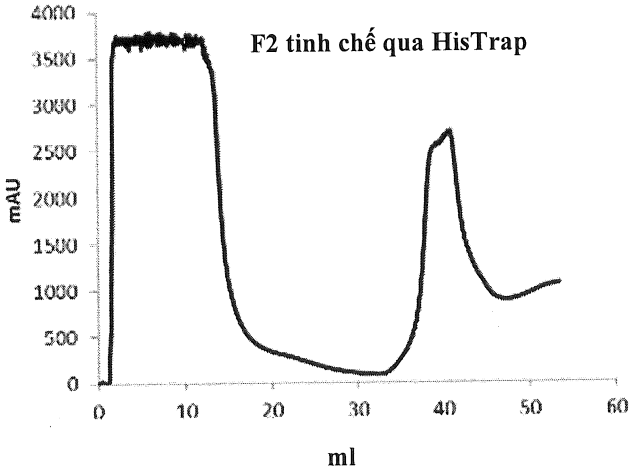
**Fig.4 tiếp**

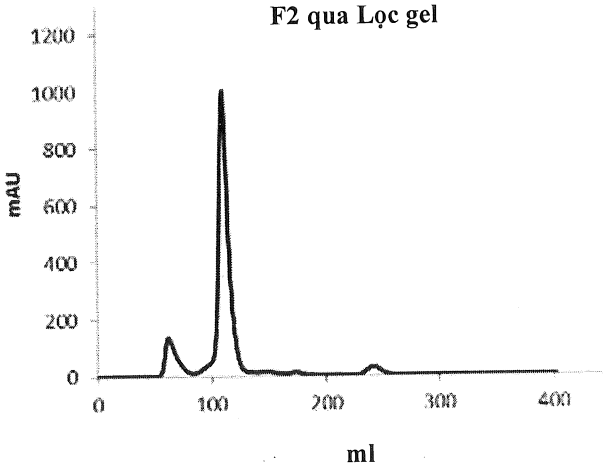
**B**



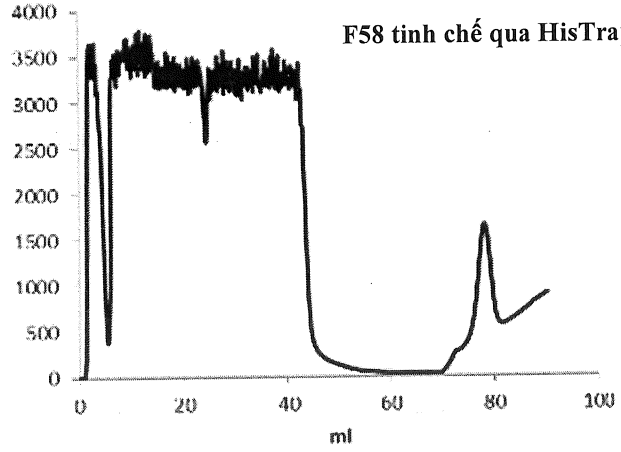




**C**




**D**



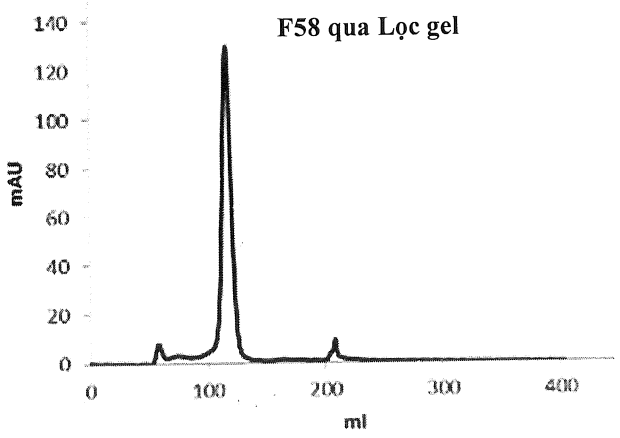



**Fig.5**

**A**

DS-Cav1-4

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGT

GCAGCCTCTGGATTCACTTTGGATTATTATTACATAGGCTGGTTCCGCCAGGCCCCAGGGAAGGAGCG

CGAGGCAGTCTCATGTATTAGTGGTAGTAGTGGTAGCACATACTATCCAGACTCCGTGAAGGGCCGAT

TCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGAC

ACGGCCGTTTATTACTGTGCGACAATTCGTAGTAGTAGCTGGGGGGGTTGCGTGCACTACGGCATGG

ACTACTGGGGCAAAGGGACCCAGGTCACCGTCTCCAGCCACCACCATCACCATCACTAG

**B**

DS-Cav1-L66

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGT

GCAGCCTCTGGATTCACTTTGGATTATTATTACATAGGCTGGTTCCGCCAGGCCCCAGGGAAGGAGCG

CGAGGGGGTCTCATGTATTAGTAGTAGTCATGGTAGCACATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGAT

TCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACGGTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAAACCTGAGGAC

ACGGCCGTTTATTACTGTGCGACAGTAGCTGTAGCACATTTCCGGGGGTTGCGGAGTCGACGGCATGG

ACTACTGGGGCAAAGGGACCCAGGTCACCGTCTCCAGCCACCACCATCACCATCACTAG

**C**

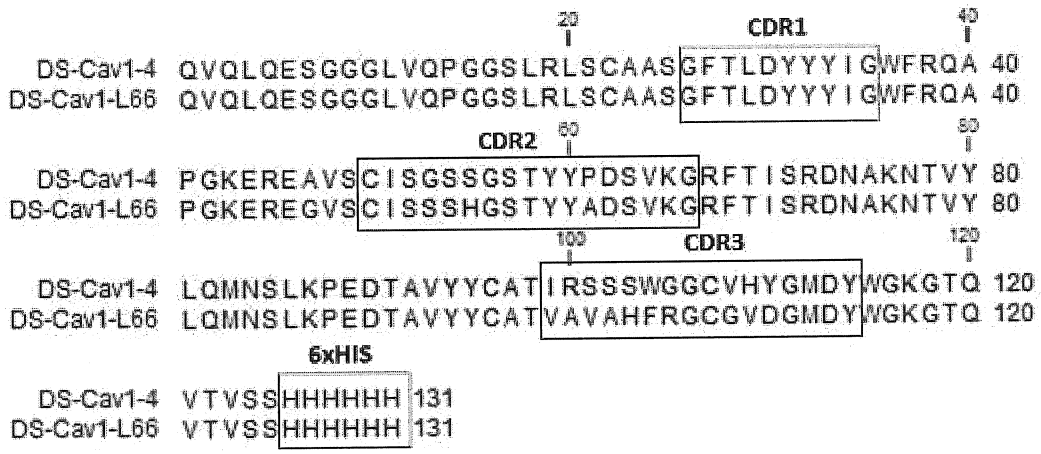
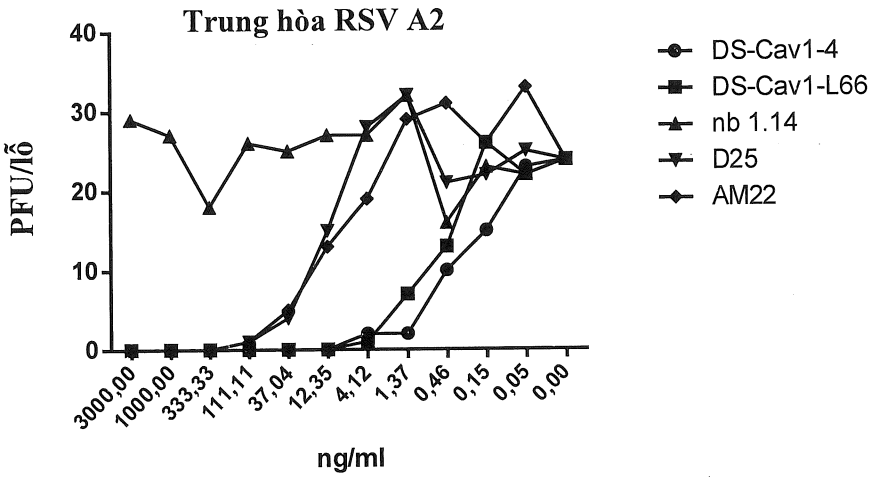


**Fig.6**

**A**


Trung hòa RSV A2
PFU/lỗ
40
30
20
10
0
3000,00
1000,00
333,33
111,11
37,04
12,35
4,12
1,37
0,46
0,15
0,05
0,00
ng/ml
DS-Cav1-4
DS-Cav1-L66
nb 1.14
D25
AM22

**B**

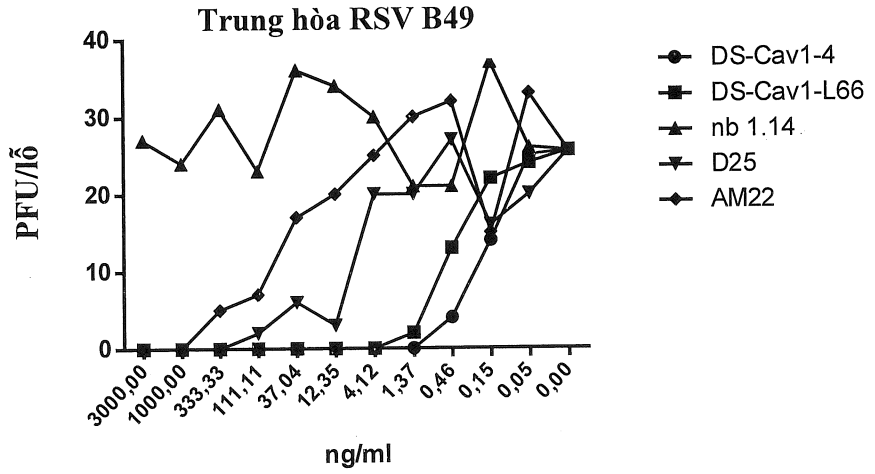

Trung hòa RSV B49
PFU/lỗ
40
30
20
10
0
3000,00
1000,00
333,33
111,11
37,04
12,35
4,12
1,37
0,46
0,15
0,05
0,00
ng/ml
DS-Cav1-4
DS-Cav1-L66
nb 1.14
D25
AM22

**Fig.6 tiếp**

**C**

| | RSV A2 $IC_{50}$ | | RSV B49 $IC_{50}$ | |
|---|---|---|---|---|
| | ng/ml | nM | ng/ml | nM |
| DS-Cav1-4 | 0,31 | 0,021 | 0,23 | 0,015 |
| DS-Cav1-L66 | 0,46 | 0,032 | 0,46 | 0,032 |
| D25 | 18,5 | 0,123 | 8,24 | 0,055 |
| AM22 | 12,35 | 0,082 | 74,08 | 0,494 |

**D**

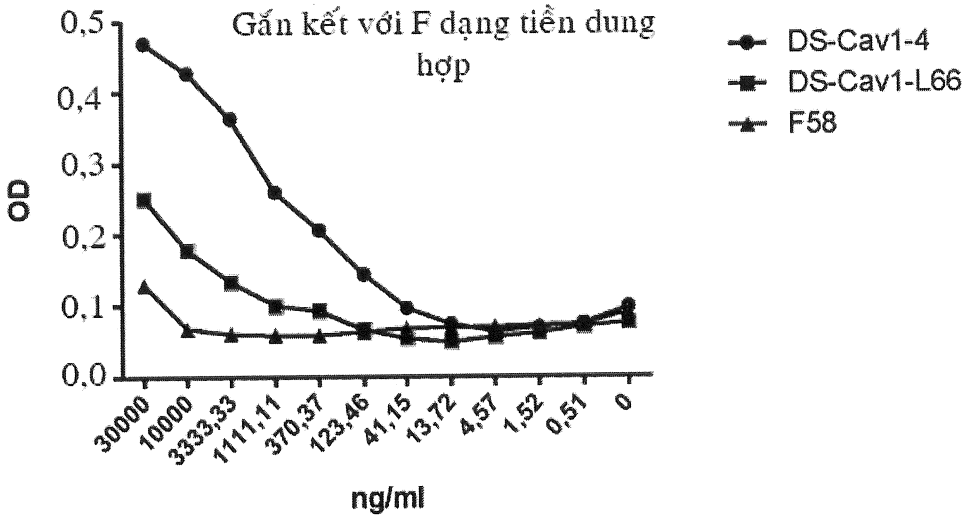
| $IC_{50}$ (ng/ml) | hMPV-A1-GFP | hMPV-B1-GFP | hRSV-A2-GFP |
|---|---|---|---|
| F-VHH-4 | >30.000 | >30.000 | 0,47 |
| F-VHH-L66 | >30.000 | >30.000 | 0,59 |
| Crtl-VHH | ND* | >30.000 | >30.000 |
| MPE8 | ND | 108 | 47 |
| 101F | 216 | 783 | 124 |
| MF14** | 249 | 319 | ND |
| Motavizumab | ND | ND | 33 |

*ND, không xác định

**MF14 là kháng thể đơn dòng đặc hiệu với glycoprotein F hMPV

**Fig.7**

A


Gắn kết với F dạng tiền dung hợp
DS-Cav1-4
DS-Cav1-L66
F58
OD
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0,0
30000
10000
3333,33
1111,11
370,37
123,46
41,15
13,72
4,57
1,52
0,51
0
ng/ml

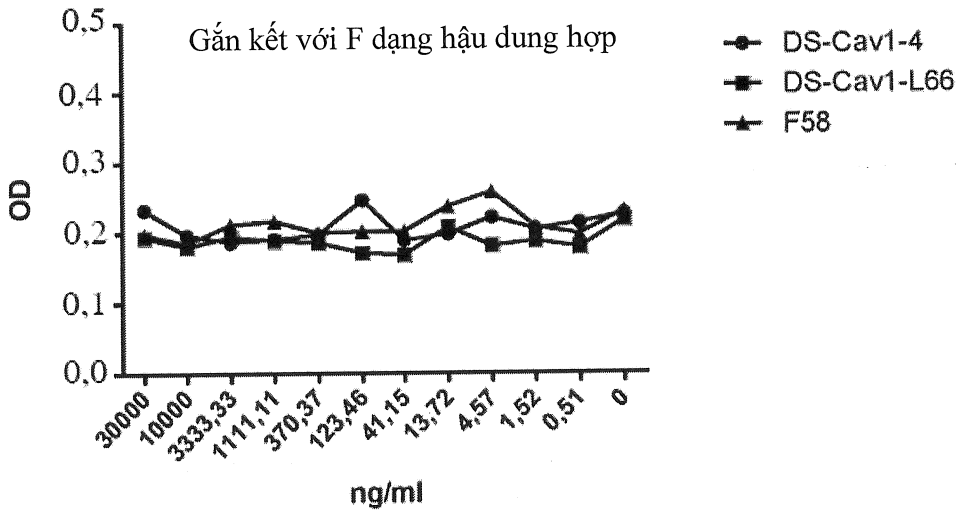
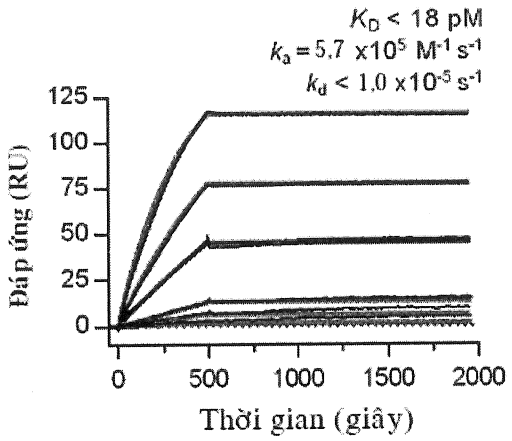

Gắn kết với F dạng hậu dung hợp
DS-Cav1-4
DS-Cav1-L66
F58
OD
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0,0
30000
10000
3333,33
1111,11
370,37
123,46
41,15
13,72
4,57
1,52
0,51
0
ng/ml

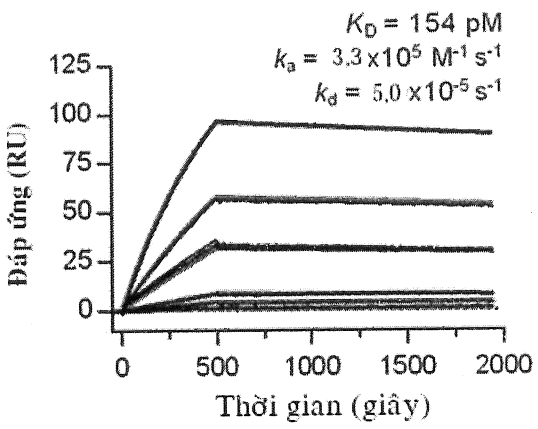
**Fig.7 tiếp**

B

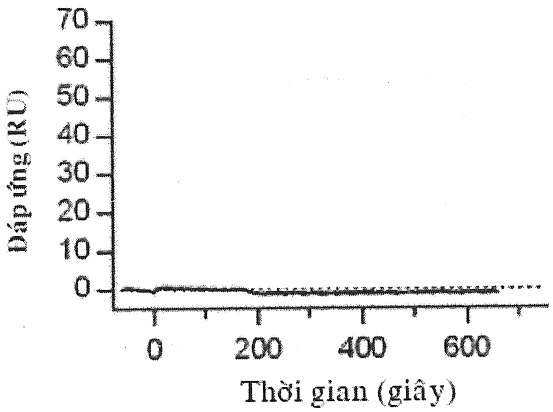
Gắn kết của DS-Cav1-4 với F
dạng tiền dung hợp




Gắn kết của DS-Cav1-L66 với F
dạng tiền dung hợp




Gắn kết của DS-Cav1-4 với F
dạng hậu dung hợp




Gắn kết của DS-Cav1-L66 với F
dạng hậu dung hợp

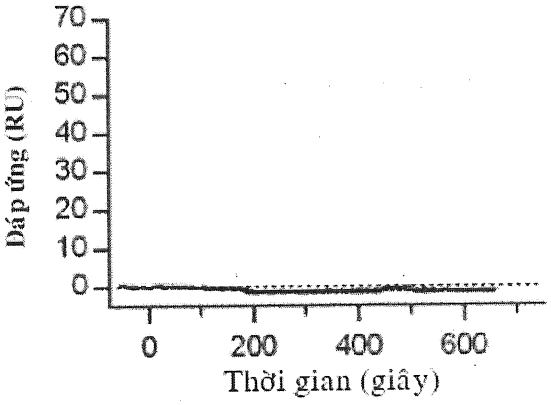


**Fig.8**

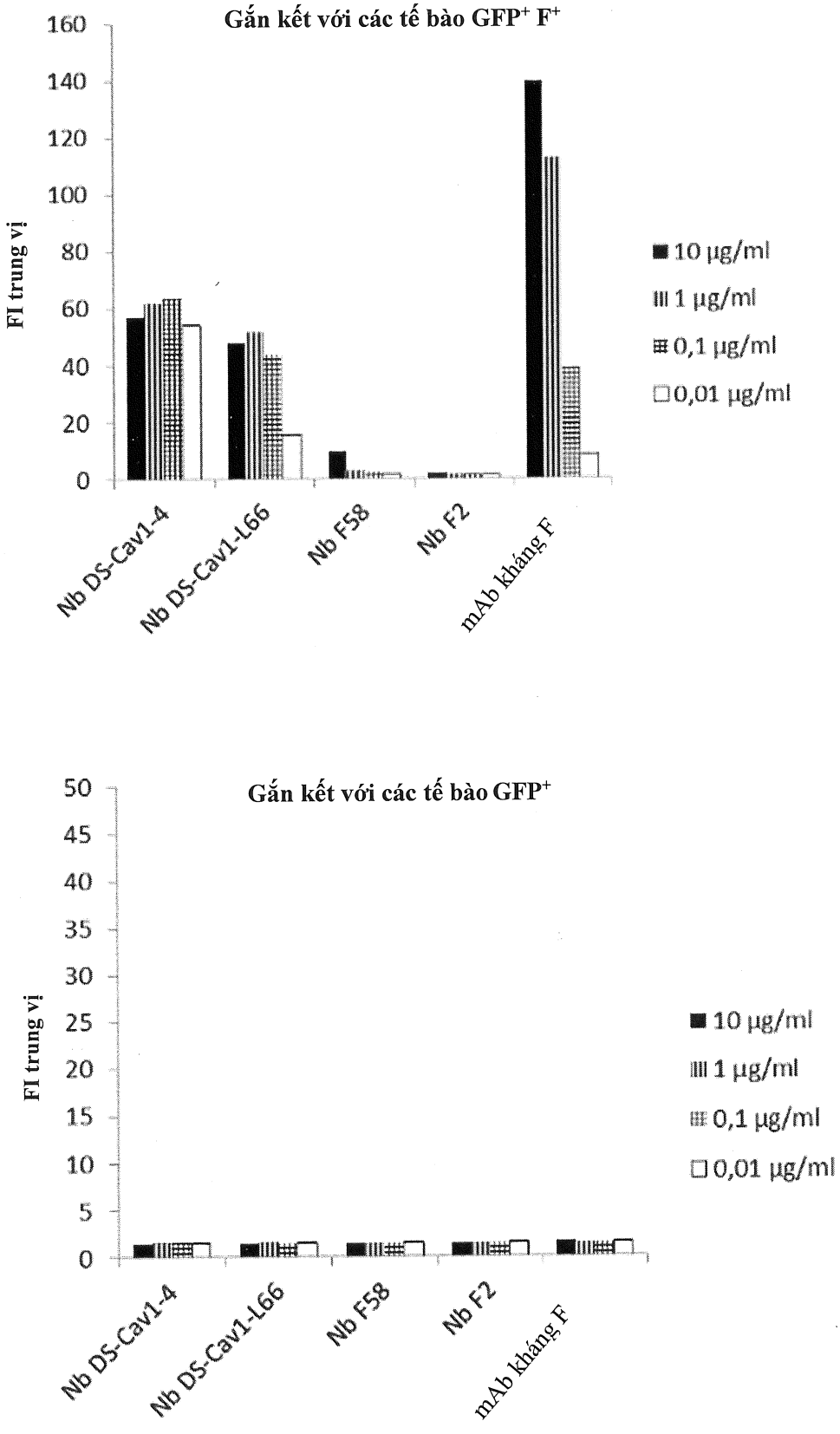

Gắn kết với các tế bào GFP+ F+
FI trung vị
160
140
120
100
80
60
40
20
0
10 µg/ml
1 µg/ml
0,1 µg/ml
0,01 µg/ml
Nb DS-Cav1-4
Nb DS-Cav1-L66
Nb F58
Nb F2
mAb kháng F
Gắn kết với các tế bào GFP+
FI trung vị
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
10 µg/ml
1 µg/ml
0,1 µg/ml
0,01 µg/ml
Nb DS-Cav1-4
Nb DS-Cav1-L66
Nb F58
Nb F2
mAb kháng F

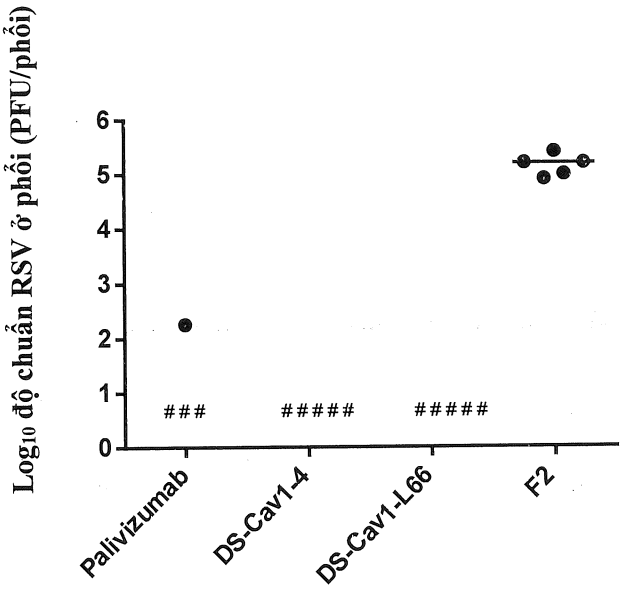
**Fig.9**

Chất phân tích

| Chất cạnh tranh | F2 | DS-Cav1-L66 | DS-Cav1-4 | D25 |
|---|---|---|---|---|
| F2 | NB | 17,5 | 12,8 | 5,4 |
| DS-Cav1-L66 | NB | 82,1 | 58,3 | 11,7 |
| DS-Cav1-4 | NB | 105,0 | 81,7 | 18,3 |
| D25 | NB | 27,1 | 8,3 | 88,4 |

**Fig.10**

**A**




**B**

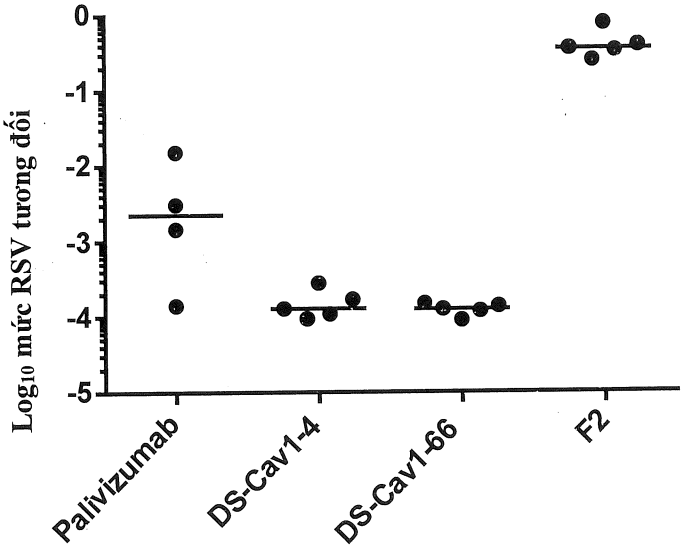


**Fig.11**

A

Vùng tự do/vùng làm việc: 27,7/19,4%

Diện tích bề mặt bị chôn vùi
Trên vùng khởi đầu 1 $F_2$: 116 Å²
Trên vùng khởi đầu 1 $F_1$: 640 Å²
Trên vùng khởi đầu 2 $F_1$: 400 Å²
Tổng :1156 Å²

**Các gốc trên F RSV được tiếp xúc bằng nanobody**

QNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCNGTDAKVK
LIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARR

FLGFLLGVGSAIASGVAVCKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVL
TFKVLDLKNYIDKQLLPILNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVN
AGVTTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMCII
KEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCD
NAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIM
TSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIIKTFSNGCDYVSNKGVD
TVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEFDASISQVNEKIN
QSLAFIRKSDELL

B

Vùng tự do/vùng làm việc: 30,21/27,06%

Diện tích bề mặt bị chôn vùi
Trên vùng khởi đầu 1 $F_2$: 116 Å²
Trên vùng khởi đầu 1 $F_1$: 640 Å²
Trên vùng khởi đầu 2 $F_1$: 400 Å²
Tổng :1156 Å²

**Các gốc trên F RSV được tiếp xúc bằng nanobody**

QNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCNGTDAKVK
LIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARR

FLGFLLGVGSAIASGVAVCKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVL
TFKVLDLKNYIDKQLLPILNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVN
AGVTTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMCII
KEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCD
NAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIM
TSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIIKTFSNGCDYVSNKGVD
TVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEFDASISQVNEKIN
QSLAFIRKSDELL

**Fig.11 tiếp**

**C**

SEQ ID NO: 17:

```
1   MELLILKANA ITTILTAVTF CFASGQNITE EFYQSTCSAV SKGYLSALRT GWYTSVITIE
61  LSNIKENKCN GTDAKVKLIK QELDKYKNAV TELQLLMQST PATNNRARRE LPRFMNYTLN
121 NAKKTNVTLS KKRKRRFLGF LLGVGSAIAS GVAVCKVLHL EGEVNKIKSA LLSTNKAVVS
181 LSNGVSVLTF KVLDLKNYID KQLLPILNKQ SCSISNIETV IEFQQKNNRL LEITREFSVN
241 AGVTTPVSTY MLTNSELLSL INDMPITNDQ KKLMSNNVQI VRQQSYSIMC IIKEEVLAYV
301 VQLPLYGVID TPCWKLHTSP LCTTNTKEGS NICLTRTDRG WYCDNAGSVS FFPQAETCKV
361 QSNRVFCDTM NSLTLPSEVN LCNVDIFNPK YDCKIMTSKT DVSSSVITSL GAIVSCYGKT
421 KCTASNKNRG IIKTFSNGCD YVSNKGVDTV SVGNTLYYVN KQEGKSLYVK GEPIINFYDP
481 LVFPSDEFDA SISQVNEKIN QSLAFIRKSD ELLSAIGGYI PEAPRDGQAY VRKDGEWVLL
541 STFLGGLVPR GSHHHHHHSA WSHPQFEK
```

**D**

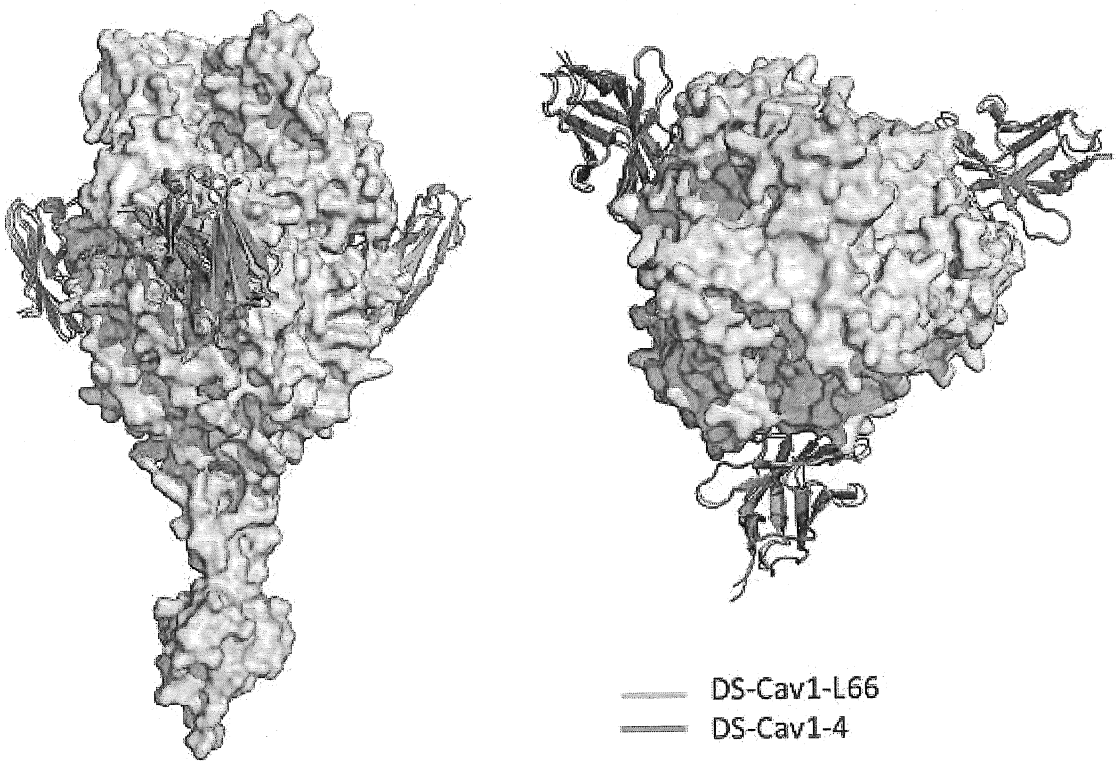
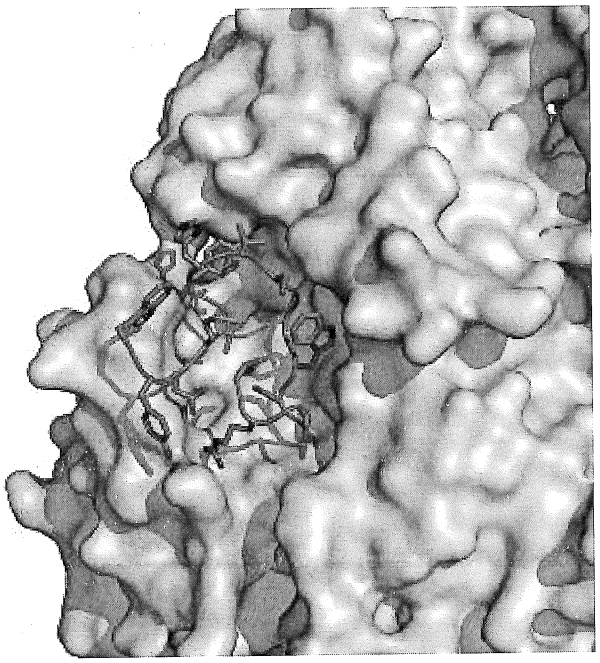


**Fig.12**

**A**



**B**

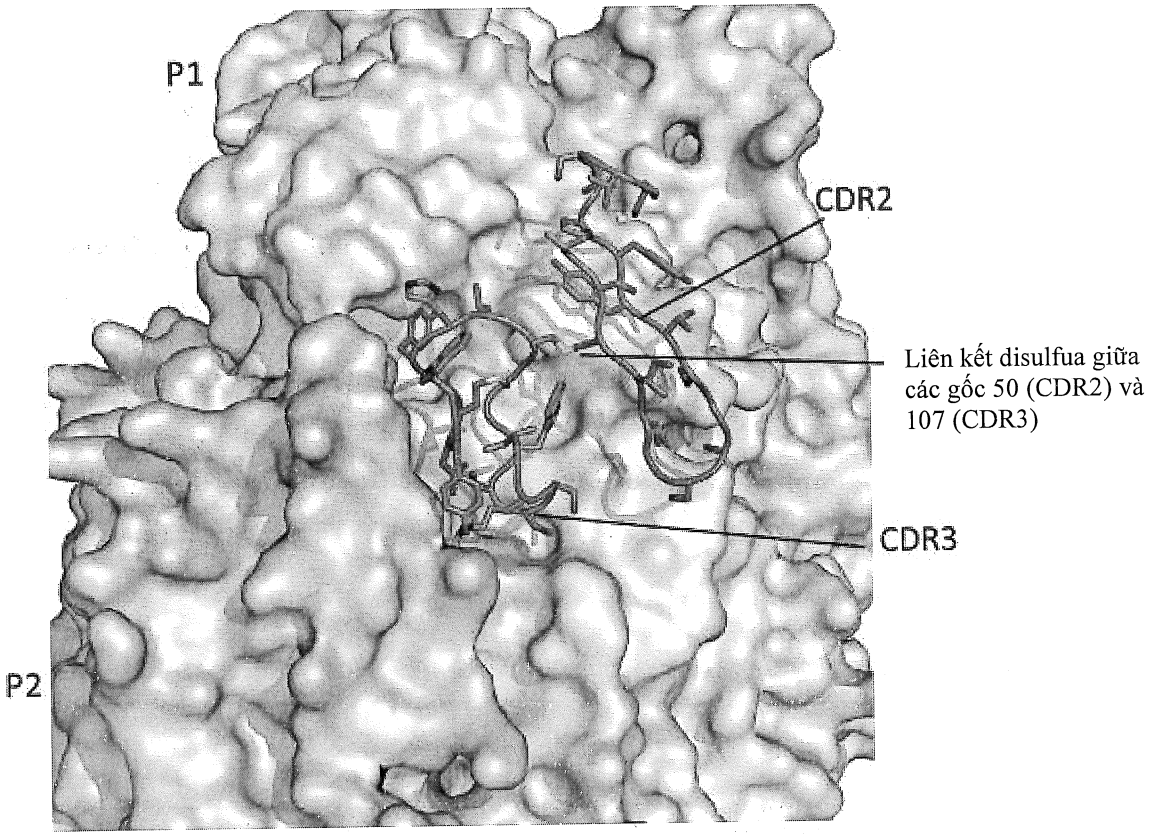

P1
CDR2
Liên kết disulfua giữa các gốc 50 (CDR2) và 107 (CDR3)
CDR3
P2

**Fig.13**

**A**

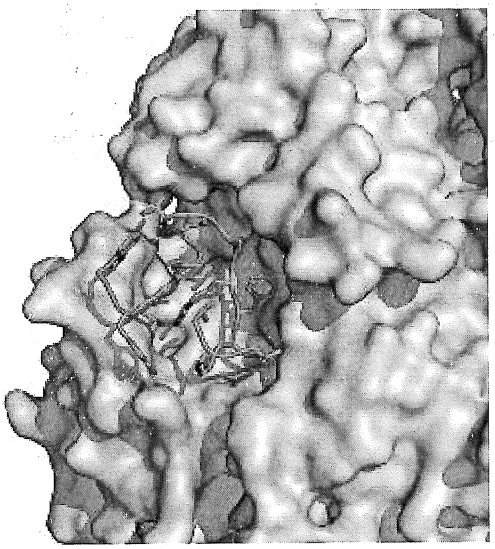


**Fig.13**

**B**

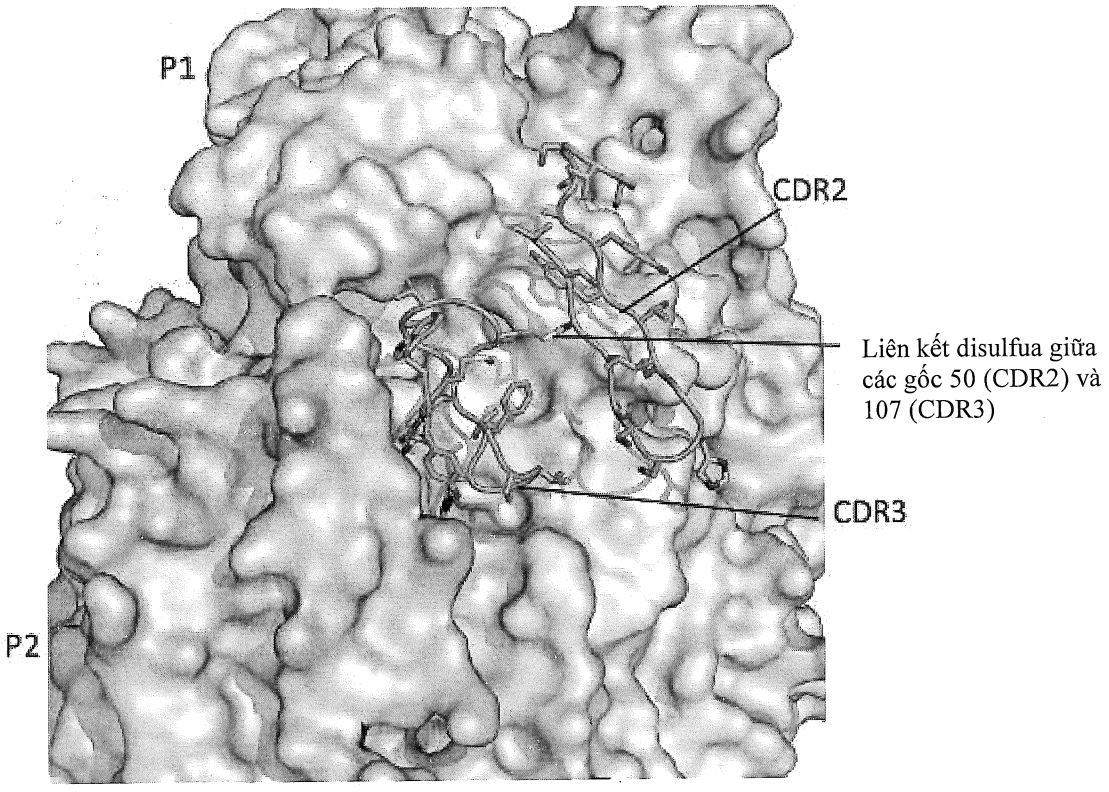
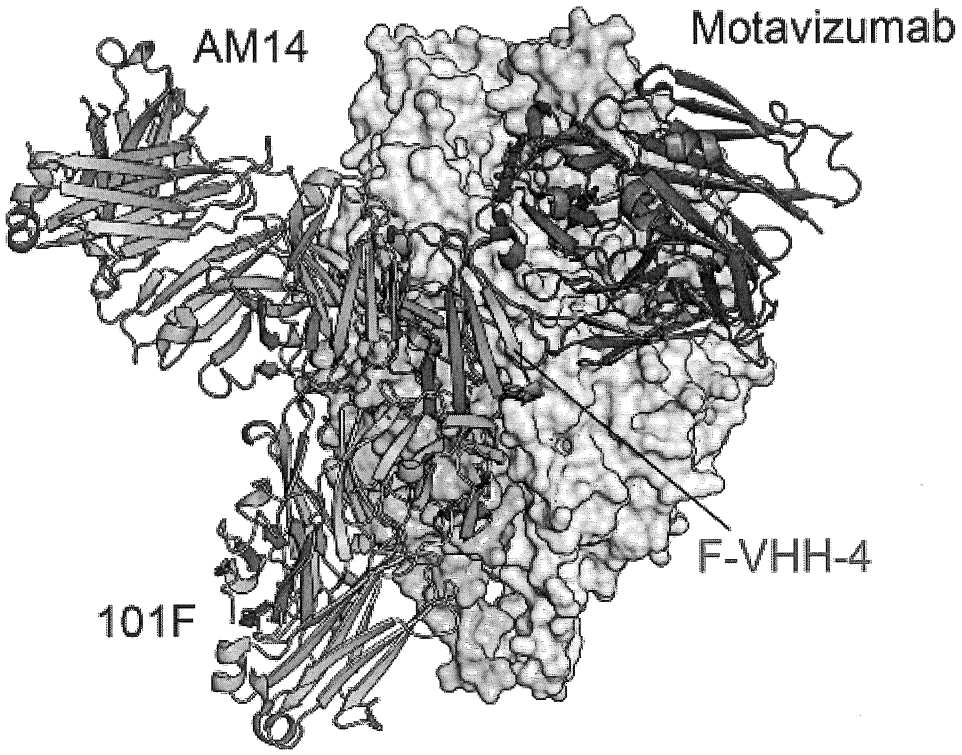


**Fig.14**



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> VIB VZW
UNIVERSITEIT GENT
THE UNITED STATES OF AMERICA, as represented by the Secretary, Department of Health and Human Services,
TRUSTEES OF DARTMOUTH COLLEGE

<120> Miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch kháng protein F tiền dung hợp của virut hợp bào hô hấp (RSV), cấu trúc gắn kết RSV, axit nucleic mã hóa miền biến đổi, tế bào chủ chứa axit nucleic và dược phẩm chứa miền biến đổi này

<130> XS/RSVNb/521

<150> US 62/181,522
<151> 2015-06-18

<150> EP 15178653.0
<151> 2015-07-28

<150> EP 15191868.7
<151> 2015-10-28

<160> 19

<170> PatentIn version 3.5

<210> SEQ ID NO: 1
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự CDR1

<400> 1

Gly Phe Thr Leu Asp Tyr Tyr Tyr Ile Gly
1 5 10

<210> SEQ ID NO: 2
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự CDR1

<400> 2

Gly Phe Thr Leu Asp Tyr Tyr Tyr Ile Gly
1 5 10

<210> SEQ ID NO:3
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự CDR2

<400> 3

Cys Ile Ser Gly Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> SEQ ID NO: 4
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự CDR2

<400> 4

Cys Ile Ser Ser Ser His Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> SEQ ID NO: 5
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự CDR3

<400> 5

Ile Arg Ser Ser Ser Trp Gly Gly Cys Val His Tyr Gly Met Asp Tyr
1 5 10 15

<210> SEQ ID NO: 6
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự CDR3

<400> 6

Val Ala Val Ala His Phe Arg Gly Cys Gly Val Asp Gly Met Asp Tyr
1 5 10 15

<210> SEQ ID NO: 7
<211> 396
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Kháng thể miền đơn DS-Cav1-4

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(396)

<400> 7
cag gtg cag ctg cag gag tct ggg gga ggc ttg gtg cag cct ggg ggg 48
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

tct ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc act ttg gat tat tat 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp Tyr Tyr
20 25 30

tac ata ggc tgg ttc cgc cag gcc cca ggg aag gag cgc gag gca gtc 144
Tyr Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Ala Val
35 40 45

tca tgt att agt ggt agt agt ggt agc aca tac tat cca gac tcc gtg 192
Ser Cys Ile Ser Gly Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val

```
    50                  55                  60

aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac acg gtg tat        240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

ctg caa atg aac agc ctg aaa cct gag gac acg gcc gtt tat tac tgt        288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

gcg aca att cgt agt agt agc tgg ggg ggt tgc gtg cac tac ggc atg        336
Ala Thr Ile Arg Ser Ser Ser Trp Gly Gly Cys Val His Tyr Gly Met
            100                 105                 110

gac tac tgg ggc aaa ggg acc cag gtc acc gtc tcc agc cac cac cat        384
Asp Tyr Trp Gly Lys Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser His His His
        115                 120                 125

cac cat cac tag                                                       396
His His His
    130
```

<210> SEQ ID NO: 8
<211> 131
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 8

```
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp Tyr Tyr
            20                  25                  30

Tyr Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Ala Val
        35                  40                  45

Ser Cys Ile Ser Gly Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
    50                  55                  60
```

```
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Thr Ile Arg Ser Ser Ser Trp Gly Gly Cys Val His Tyr Gly Met
            100                 105                 110

Asp Tyr Trp Gly Lys Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser His His His
        115                 120                 125

His His His
    130
```

<210> SEQ ID NO: 9
<211> 396
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Kháng thể miền đơn DS-Cav1-L66

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(396)

<400> 9

```
cag gtg cag ctg cag gag tct ggg gga ggc ttg gtg cag cct ggg ggg          48
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

tct ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc act ttg gat tat tat          96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp Tyr Tyr
            20                  25                  30

tac ata ggc tgg ttc cgc cag gcc cca ggg aag gag cgc gag ggg gtc         144
Tyr Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
        35                  40                  45

tca tgt att agt agt agt cat ggt agc aca tac tat gca gac tcc gtg         192
Ser Cys Ile Ser Ser Ser His Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60
```

```
aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac acg gtg tat        240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

ctg cag atg aac agc ctg aaa cct gag gac acg gcc gtt tat tac tgt        288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

gcg aca gta gct gta gca cat ttc cgg ggt tgc gga gtc gac ggc atg        336
Ala Thr Val Ala Val Ala His Phe Arg Gly Cys Gly Val Asp Gly Met
            100                 105                 110

gac tac tgg ggc aaa ggg acc cag gtc acc gtc tcc agc cac cac cat        384
Asp Tyr Trp Gly Lys Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser His His His
        115                 120                 125

cac cat cac tag                                                       396
His His His
    130
```

<210> SEQ ID NO: 10
<211> 131
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 10

```
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp Tyr Tyr
            20                  25                  30

Tyr Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
        35                  40                  45

Ser Cys Ile Ser Ser Ser His Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
```

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Val Ala Val Ala His Phe Arg Gly Cys Gly Val Asp Gly Met
100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Lys Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser His His His
115 120 125

His His His
130

<210> SEQ ID NO: 11
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi

<400> 11
caggaaacag ctatgacc 18

<210> SEQ ID NO: 12
<211> 47
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi

<400> 12
ggcgggtatc tctcgagaaa aggcaggtgc agctgcagga gtctggg 47

<210> SEQ ID NO: 13
<211> 49
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi

<400> 13
ctaactagtc tagtgatggt gatggtggtg gctggagacg gtgacctgg 49

<210> SEQ ID NO: 14
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi

<400> 14
tcacgaaggc tccacataca 20

<210> SEQ ID NO: 15
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi

<400> 15
gcagggtcat cgtctttttc 20

<210> SEQ ID NO: 16
<211> 461
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Protein F của RSV tiền dung hợp ổn định (fig. 11a+b)

<400> 16

Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser
1 5 10 15

Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile
20 25 30

Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp

35 40 45

Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala
50 55 60

Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn
65 70 75 80

Arg Ala Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val Gly Ser Ala Ile
85 90 95

Ala Ser Gly Val Ala Val Cys Lys Val Leu His Leu Glu Gly Glu Val
100 105 110

Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys Ala Val Val Ser
115 120 125

Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Phe Lys Val Leu Asp Leu Lys
130 135 140

Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Leu Asn Lys Gln Ser Cys
145 150 155 160

Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln Gln Lys Asn Asn
165 170 175

Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn Ala Gly Val Thr
180 185 190

Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu Leu Leu Ser Leu
195 200 205

Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys Leu Met Ser Asn
210 215 220

Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile Met Cys Ile Ile
225 230 235 240

```
Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro Leu Tyr Gly Val
                245                 250                 255

Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro Leu Cys Thr Thr
            260                 265                 270

Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg Thr Asp Arg Gly
        275                 280                 285

Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe Pro Gln Ala Glu
    290                 295                 300

Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp Thr Met Asn Ser
305                 310                 315                 320

Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val Asp Ile Phe Asn
                325                 330                 335

Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr Asp Val Ser Ser
            340                 345                 350

Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys Tyr Gly Lys Thr
        355                 360                 365

Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile Lys Thr Phe Ser
    370                 375                 380

Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp Thr Val Ser Val
385                 390                 395                 400

Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly Lys Ser Leu Tyr
                405                 410                 415

Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro Leu Val Phe Pro
            420                 425                 430
```

Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn Glu Lys Ile Asn
435 440 445

Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu Leu
450 455 460

<210> SEQ ID NO: 17
<211> 568
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Protein F của RSV tiền dung hợp ổn định (fig. 11c)

<400> 17

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 Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val 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 Cys 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 Phe Lys Val
            180                 185                 190

Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Leu 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 Cys 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 Ser Ala Ile Gly Gly Tyr Ile Pro Glu Ala Pro Arg Asp Gly Gln
515 520 525

Ala Tyr Val Arg Lys Asp Gly Glu Trp Val Leu Leu Ser Thr Phe Leu
530 535 540

Gly Gly Leu Val Pro Arg Gly Ser His His His His His His Ser Ala
545 550 555 560

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
565

<210> SEQ ID NO: 18
<211> 574
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự liên ứng F của RSV A

<400> 18

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

Ala Val Thr Leu Cys Phe Ala Ser Ser 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 Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val 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 Ala Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro
            100                 105                 110

Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Thr Lys Asn Asn 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 Ile Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
145                 150                 155                 160

Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Asn 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 Ile
    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 Val Gly Lys Ser Thr Thr Asn Ile Met Ile Thr
515 520 525

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

Gly Leu Phe 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> SEQ ID NO: 19
<211> 574
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự liên ứng F của RSV B

<400> 19

Met Glu Leu Leu Ile His Arg Ser Ser Ala Ile Phe Leu Thr Leu Ala
1 5 10 15

Ile Asn Ala Leu Tyr Leu Thr Ser Ser Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Arg 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 Glu Thr Lys Cys Asn Gly Thr Asp Thr Lys Val 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 Asn Thr Pro Ala Ala Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Ala Pro
            100                 105                 110

Gln Tyr Met Asn Tyr Thr Ile Asn Thr Thr Lys Asn Leu Asn Val Ser
        115                 120                 125

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

Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Asn 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 Asn Asn Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn
        195                 200                 205

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

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

Ala Gly Val Thr Thr Pro Leu 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 Ser 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

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

Leu Cys Thr Thr Asn Ile 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 Asp 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 Ser Leu Cys Asn Thr
370 375 380

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

Asp Ile 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 Leu Glu Gly
450 455 460

```
Lys Asn Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Tyr 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 Arg Ser Asp Glu Leu
            500                 505                 510

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

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

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

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