



(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)



1-0032452

(51)⁸ A61K 39/12

(13) B

(21) 1-2018-04345

(22) 04/04/2017

(86) PCT/EP2017/057957 04/04/2017

(87) WO/2017/174564 12/10/2017

(30) 16163807.7 05/04/2016 EP

(45) 25/07/2022 412

(43) 25/04/2019 373A

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

Archimedesweg 4, 2333 CN Leiden, the Netherlands

(72) LANGEDIJK, Johannes, Petrus, Maria (NL); VERHAGEN, Janneke, M (NL).

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

(54) PHÂN TỬ AXIT NUCLEIC MÃ HÓA PROTEIN F CỦA VIRUT HỢP BÀO HÔ HẤP (RSV), VECTƠ ADENOVIRUT TÁI TỔ HỢP Ở NGƯỜI, DƯỢC PHẨM, TẾ BÀO CHỦ ĐƯỢC PHÂN LẬP, VÀ PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ VACCIN

(57) Sáng chế đề cập đến phân tử axit nucleic mã hóa protein F của RSV trước dung hợp hoặc phân hoạt tính miễn dịch của chúng, trong đó protein F của RSV trước dung hợp bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1 hoặc 2. Sáng chế còn đề cập đến vectơ adenovirut tái tổ hợp ở người, dược phẩm, tế bào chủ được phân lập chứa phân tử axit nucleic, axit nucleic tái tổ hợp được phân lập, và phương pháp điều chế vaccin kháng virut hợp bào hô hấp (RSV).

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

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

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Virut hợp bào hô hấp (RSV) là mầm gây bệnh truyền nhiễm đường hô hấp ở trẻ con cao mà được tin là gây ra ~200,000 ca tử vong ở trẻ nhỏ hàng năm. Ở trẻ nhỏ ít hơn 2 tuổi, RSV chiếm khoảng 50% ca nhập viện do nhiễm trùng hô hấp, với đỉnh điểm của ca nhập viện xảy ra ở độ tuổi 2-4 tháng. Đã được báo cáo rằng hầu hết trẻ con sẽ bị nhiễm RSV trước độ tuổi 2 tuổi, và nhiễm lại trong cuộc đời do tính miễn dịch tự nhiên thấp. Khi có tuổi, gánh nặng bệnh tật do RSV tương tự với gánh nặng gây ra do nhiễm virut cúm A không dịch. Vaccin kháng RSV hiện không có sẵn, nhưng được mong muốn do gánh nặng bệnh cao.

RSV là paramyxovirut, thuộc họ phụ pneumovirinae. Bộ gen của nó mã hóa cho nhiều protein khác nhau, bao gồm protein màng được biết là Glycoprotein (G) RSV và protein dung hợp (F) RSV là đích kháng nguyên chính để trung hòa kháng thể.

Không giống protein RSV G, protein F được bảo toàn giữa các chủng RSV; mà làm nó thành ứng viên vaccin hấp dẫn có khả năng tạo ra kháng thể trung hòa rộng. Protein F là protein xuyên màng và nó được kết hợp vào màng tế bào virut từ màng tế bào trong quá trình nảy nở virut. Protein F của RSV tạo điều kiện xâm nhiễm bằng cách dung hợp màng tế bào virut và tế bào chủ. Trong quá trình dung hợp, protein F uốn nếp lại không đảo ngược được từ cấu dạng trước dung hợp để hủy sang cấu dạng sau dung hợp ổn định. Tiền thân protein, F0, cần phân cắt trong quá trình trưởng thành nội bào bằng proteaza giống furin. Có hai vị trí furin, phân cắt nó dẫn đến loại bỏ peptit p27 và hình thành hai vùng: vùng F2 đầu N và vùng F1 đầu C (Hình 1). Các vùng F2 và F1 được nối bằng hai cầu xystin. Các kháng thể kháng protein dung hợp có thể ngăn ngừa hấp thụ virut trong tế bào và do đó có hiệu quả trung hòa. Bên cạnh là đích để trung hòa kháng

thể, RSV F chứa các epitop tế bào T gây độc tế bào (Pemberton et al, 1987, J. Gen.Virol. 68: 2177-2182).

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

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

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

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất phân tử axit nucleic mã hóa protein F trước dung hợp của RSV ổn định, trong đó protein F trước dung hợp RSV chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1 hoặc 2.

Theo các phương án nhất định, phân tử axit nucleic mã hóa protein F trước dung hợp RSV là codon được tối ưu hóa để biểu hiện trong tế bào của người.

Theo các phương án nhất định, phân tử axit nucleic mã hóa protein F trước dung hợp RSV chứa trình tự axit nucleic có SEQ ID NO: 3 hoặc 4.

Sáng chế còn đề xuất vector chứa phân tử axit nucleic mã hóa protein F trước dung hợp của RSV, trong đó protein F của RSV bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1 hoặc 2.

Theo các phương án nhất định, vector là adenovirus tái tổ hợp của người.

Theo các phương án nhất định, adenovirut tái tổ hợp là của kiểu huyết thanh 26 hoặc 35.

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

Theo các phương án nhất định, adenovirut tái tổ hợp có bộ gen bao gồm ở đầu tận cùng 5' của nó trình tự CTATCTAT.

Sáng chế còn đề xuất chế phẩm, ví dụ vaccin kháng virus hợp bào hô hấp (RSV), chứa phân tử axit nucleic hoặc vectơ theo sáng chế.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp chủng ngừa cho đối tượng kháng RSV, phương pháp bao gồm việc cho đối tượng dùng chế phẩm theo sáng chế.

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

Sáng chế còn đề xuất phương pháp làm giảm nhiễm và/hoặc sao chép RSV trong, ví dụ đường mũi và phổi của, đối tượng, bao gồm việc dùng cho đối tượng chế phẩm chứa axit nucleic hoặc vectơ theo sáng chế. Điều này sẽ làm giảm tác dụng có hại gây ra do lây nhiễm RSV ở đối tượng, và do đó góp phần bảo vệ đối tượng chống tác dụng có hại này nhờ việc dùng chế phẩm. Theo một số phương án, tác dụng có hại của lây nhiễm RSV có thể cơ bản được phòng ngừa, cụ thể là làm giảm đến mức thấp đến nỗi chúng không liên quan đến lâm sàng.

Sáng chế còn đề xuất tế bào chủ được phân lập chứa phân tử axit nucleic mã hóa protein F trước dung hợp của RSV, trong đó protein F trước dung hợp của RSV bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1 hoặc 2. Theo các phương án nhất định, phân tử axit nucleic mã hóa protein F trước dung hợp của RSV bao gồm trình tự axit nucleic có SEQ ID NO: 3 hoặc 4.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều chế vaccin kháng virus hợp bào hô hấp (RSV), bao gồm việc tạo ra adenovirut tái tổ hợp mà chứa axit nucleic mã hóa protein F trước dung hợp của RSV hoặc đoạn của chúng, nhân giống adenovirut tái tổ hợp này trong môi trường nuôi cấy của tế bào chủ, phân lập và tinh chế adenovirut tái tổ hợp, và

bào chế adenovirut tái tổ hợp trong chế phẩm được dụng, trong đó protein F trước dung hợp của RSV bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1 hoặc 2. Theo các phương án nhất định, adenovirut tái tổ hợp là của kiểu huyết thanh 26 hoặc 35.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

HÌNH 1: Biểu diễn bằng đồ thị của protein F của RSV. Tiền thân protein bao gồm vùng F2 và F1 và peptit p27 mà bị loại ra khỏi protein trưởng thành bằng cách phân cắt bằng proteaza giống furin. Các vị trí phân cắt được thể hiện bằng mũi tên. Số trên đỉnh hộp chỉ vị trí axit amin trong protein chiều dài đầy đủ không gồm peptit tín hiệu. Ở F1, các chi tiết cấu trúc được thể hiện: peptit dung hợp (FP), vùng uốn nếp lại 1 (RR1) bao gồm A lặp heptad (HRA) và vùng uốn nếp lại 2 (RR2) bao gồm B lặp heptad (HRB).

HÌNH 2: Biểu hiện bề mặt tương đối của các biến thể protein F. Các biến thể chiều dài đầy đủ của protein F được biểu hiện trong tế bào HEK293T. Tế bào được nhuộm bằng kháng thể kháng RSV F (CR9503) và được phân tích bằng Phân tích tế bào dòng chảy (FACS). Các giá trị cường độ huỳnh quang trung bình (MFI) được tính toán và được chuẩn hóa đến MFI của mẫu tế bào được biến nạp kiểu đại F đối chứng. MFI của Fwt được đặt đến 1. Các thanh thể hiện giá trị trung bình, thanh báo lỗi thể hiện khoảng giá trị.

HÌNH 3: Đoạn của protein F trước dung hợp trên bề mặt tế bào. Các biến thể chiều dài đầy đủ của protein F được biểu hiện trong tế bào HEK293T. Tế bào được nhuộm bằng kháng thể kháng RSV F CR9503 và kháng thể kháng RSV F trước dung hợp CR9501 và được phân tích bằng Phân tích tế bào dòng chảy. Giá trị cường độ huỳnh quang trung bình (MFI) được tính toán và MFI được đo bằng CR9501 được chuẩn hóa đến MFI được đo bằng CR9503. Các giá trị MFI chuẩn hóa chỉ ra đoạn của pre-F trên bề mặt tế bào. Các thanh thể hiện giá trị trung bình, thanh báo lỗi thể hiện khoảng giá trị.

HÌNH 4: Biểu hiện bề mặt tương đối của biến thể protein F. Các phiên bản tan được với vùng xuyên màng và vùng bào tương bị loại (Fsl) và các biến thể chiều dài đầy đủ của protein F được biểu hiện trong tế bào HEK293T. Mức biểu hiện của protein tan được đo trong dịch nổi nuôi cấy bằng bộ tám và biến thể chiều dài đầy đủ được thử bằng nhuộm tế bào sử dụng kháng thể kháng RSV F (CR9503) và được phân tích bằng Phân tích tế bào dòng chảy. Các giá trị cường độ huỳnh quang trung bình (MFI) được

tính toán và được chuẩn hóa đến MFI của mẫu tế bào biến nạp kiểu đại F (Fwt) đối chứng. MFI của Fwt được đặt đến 1. Các thanh thể hiện giá trị trung bình, thanh báo lỗi thể hiện khoảng giá trị.

HÌNH 5: Tính ổn định nhiệt của của biến thể protein F. Biến thể chiều dài đầy đủ của F protein được biểu hiện trong tế bào HEK293T. Sau khi sốc nhiệt, tế bào được nhuộm với kháng thể kháng RSV F (CR9501 – đường liền và CR9503 – đường nét đứt) và được phân tích bằng Phân tích tế bào dòng chảy. Phần trăm tế bào dương tính đối với nhuộm được xác định. Biểu tượng thể hiện giá trị trung bình, thanh báo lỗi thể hiện khoảng giá trị. (A) Phần trăm tế bào dương tính với nhuộm được xác định. (B) Các giá trị cường độ huỳnh quang trung bình (MFI) được tính toán và được chuẩn hóa đến MFI của mẫu tế bào 37°C. MFI của mẫu 37°C được đặt đến 1. Đường chấm tương ứng với nhuộm nền ở 60°C.

HÌNH 6: Tính ổn định của protein F. PreF ổn định hơn protein FA2 ở cấu dạng trước dung hợp trên bề mặt tế bào trong thử nghiệm ứng suất nhiệt. Tế bào A549 được xâm nhiễm bằng Ad26 và Ad35 bao gồm FA2 chèn (wt RSV F, thanh xám) hoặc chèn ổn định F trước dung hợp (preF2.2, thanh đen) ở MOI chỉ định. Các tế bào được xử lý nhiệt ở nhiệt độ chỉ định trong 15 phút trước khi nhuộm. Trên: phần trăm tế bào thể hiện F trước dung hợp trên bề mặt của chúng (được phát hiện bởi kháng thể CR9501); dưới: phần trăm tế bào thể hiện dạng bất kỳ của protein F, trước dung hợp và sau F (được phát hiện bởi kháng thể CR9503). Các giá trị được chuẩn hóa đến mẫu 37°C. Tất cả các thanh thể hiện lần đo đơn.

HÌNH 7: Ad26.RSV.preF2.1 và F2.2 gây đáp ứng miễn dịch tế bào sau khi dùng riêng lẻ ở chuột. Thanh ngang thể hiện trung bình hình học của đáp ứng trong nhóm. Mức nền được tính là 95% phân vị của đơn vị hình thành vết (SFU) quan sát được trong tế bào lách không kích thích, và được thể hiện bằng đường chấm.

HÌNH 8: Ad26.RSV.preF2.1 và F2.2 tạo các kháng thể trung hòa virus tăng khi so với Ad26.RSV.FA2, sau khi dùng riêng lẻ ở chuột. Chuột Balb/c (n=4 mỗi nhóm) được chủng ngừa với liều chỉ định bằng 10⁸ đến 10¹⁰ hạt virus (vp) Ad26.RSV.FA2 hoặc Ad26.RSV.preF2.1 hoặc Ad26.RSV.preF2.2, hoặc với đệm chế phẩm, và đáp ứng miễn dịch thể dịch được thử trong huyết thanh được phân lập 8 tuần sau chủng ngừa. (A) Kháng thể trung hòa virus được xác định kháng RSV A Long sử dụng thử nghiệm vi trung hòa

với kết quả đọc trên cơ sở ELISA. Độ chuẩn được cho là giá trị $\log_2$ của IC₅₀. (B) Các độ chuẩn kháng thể F trước dung hợp hoặc sau dung hợp được xác định bằng ELISA, và tỷ lệ giữa các kháng thể F trước và sau dung hợp đối với tất cả mẫu mà thể hiện độ chuẩn F trước và sau dung hợp trên giới hạn dưới của định lượng (LLOQ) được tính toán. (C) ELISA nhóm phụ được tiến hành sử dụng RSV F A2 sau dung hợp làm chất phản ứng phủ, và tỷ lệ IgG2a/IgG1 ($\log_{10}$) được tạo đồ thị. Tỷ lệ quan sát được đối với Th1 (huyết thanh dẫn xuất từ động vật được chủng ngừa với vectơ Adenovirut biểu hiện RSV F) và Th2 (huyết thanh dẫn xuất từ động vật được chủng ngừa FI-RSV) mẫu tham chiếu được thể hiện bằng đường nét đứt. LLOQ được thể hiện bằng đường chấm (bảng A), và thanh ngang thể hiện đáp ứng trung bình mỗi nhóm.

HÌNH 9: Ad26.RSV.preF2.2 gây đáp ứng kháng thể mà trung hòa khoảng rộng các thể phân lập RSV. Huyết thanh từ chuột Balb/c mà được chủng ngừa với 1010 hạt virut (vp) Ad26.RSV.FA2 (n=3) hoặc Ad26.RSV.preF (n=4) hoặc đệm chế phẩm (n=2) được dùng trong thử nghiệm trung hòa virut (thử nghiệm vi trung hòa với kết quả đọc trên cơ sở ELISA) với chủng RSV A (bảng trên) và B (bảng dưới) được thể hiện. Các độ chuẩn được cho là giá trị $\log_2$ của IC₅₀, và thanh ngang thể hiện đáp ứng trung bình mỗi nhóm. LLOQ được thể hiện bằng đường nét đứt.

HÌNH 10: Chủng ngừa đơn với Ad26.RSV.preF2.2 hoặc Ad35.RSV.preF2.2 ở các liều thấp bảo vệ chuột bông chống thử thách với RSV A2 tương đồng. Chuột bông (*Sigmodon hispidus*) (n=7 đến 9 mỗi nhóm) được chủng ngừa với liều chỉ định (trong vp/động vật) của Ad26.RSV.preF2.2, Ad26.RSV.FA2 (bảng bên trái), Ad35.RSV.preF2.2 hoặc Ad35.RSV.FA2 (bảng bên phải) bằng cách dùng đơn lẻ trong cơ. Chủng ngừa đối chứng được tiến hành với đệm chế phẩm, FI-RSV, hoặc dùng trong mũi ở liều thấp của RSV A2. Ở bảy tuần sau chủng ngừa động vật được thử thách trong mũi với 105 pfu RSV A2. Các độ chuẩn virut phổi (A-B) và mũi (C-D) được xác định bằng phương pháp dung giải tế bào 5 ngày sau thử thách. (E-F) Sera lấy chỉ trước khi thử thách được dùng để tiến hành thử nghiệm trung hòa virut với chủng RSV A Long (thử nghiệm vi trung hòa với kết quả đọc trên cơ sở ELISA). Đường chấm thể hiện mức định lượng thấp (LLOQ). Các thanh ngang thể hiện độ chuẩn trung bình mỗi nhóm.

Hình 11: Chủng ngừa Ad26.RSV.preF2.2 hoặc Ad35.RSV.preF2.2 immunization của chuột bông không làm tăng điểm viêm túi phổi sau thử thách RSV A2. Chuột bông

(*Sigmodon hispidus*) (n=7 đến 9 mỗi nhóm) được chủng ngừa với liều chỉ định (bằng vp/động vật) của Ad26.RSV.preF2.2, Ad26.RSV.FA2 (bảng trên), Ad35.RSV.preF2.2, hoặc Ad35.RSV.FA2 (bảng dưới) bằng cách dùng đơn lẻ trong cơ. Chủng ngừa đối chứng được tiến hành với đệm chế phẩm, FI-RSV, hoặc dùng trong mũi ở liều thấp của RSV A2. Ở bảy tuần sau chủng ngừa động vật được thử thách trong mũi với 105 pfu RSV A2. Viêm túi phổi được cho điểm bằng cách kiểm tra mô học của một vầu phổi 5 ngày sau thử thách trên thước không tuyến tính từ 0 đến 4. Đường chấm ngang đánh dấu điểm tối đa của động vật đối chứng mà phơi lộ trước ra RSV-A2 trước khi thử thách để bắt chước phơi lộ tự nhiên ra RSV không dẫn đến ERD.

Mô tả chi tiết sáng chế

Vaccin RSV bao gồm adenovirut của người chứa axit nucleic mã hóa protein F của RSV đã được mô tả trước đây trong WO2013/139911 và WO2013/139916. Trong đó thể hiện rằng adenovirut tái tổ hợp có kiểu huyết thanh 26 hoặc 35 mà bao gồm axit nucleic mã hóa protein F của RSV là vaccin kháng RSV rất hiệu quả trong giết được thiết lập mô hình chuột bông và có hiệu quả cải thiện so với dữ liệu được mô tả trước đó cho Ad5 mã hóa protein F của RSV. Đã chứng minh rằng việc dùng riêng lẻ, kể cả dùng trong cơ, của Ad26 hoặc Ad35 mã hóa RSV F đủ để tạo ra bảo vệ chống lại sao chép RSV thử thách.

Do tính không ổn định của protein F của RSV, tuy nhiên, protein F của RSV có xu hướng uốn nếp lại sớm thành cấu dạng sau dung hợp ổn định hơn của nó. Hiện tượng này là dấu hiệu bản chất của protein cả ở trong dung dịch và trên bề mặt của virut. Trong huyết thanh của người các kháng thể trung hòa RSV nhất, tuy nhiên, được định hướng kháng RSV F ở cấu trạng trước dung hợp. Trong nghiên cứu mà dẫn đến sáng chế, nỗ lực do đó được thực hiện để xác định các cải biến mà làm ổn định protein F của RSV ở cấu dạng trước dung hợp của nó trong protein chiều dài đầy đủ.

Một vài đột biến có thể làm ổn định protein F của RSV ở cấu trạng trước dung hợp đã được bộc lộ trước đây trong WO2014/174018 và WO2014/202570. Phân tử axit nucleic theo sáng chế mã hóa protein F của RSV chứa nhóm phụ đột biến duy nhất và đặc trưng. Theo sáng chế đã thể hiện rằng kết hợp duy nhất của các đột biến theo sáng chế tạo ra mức biểu hiện protein F của RSV tăng và tính ổn định của protein F của RSV ở cấu trạng trước dung hợp. Ngoài ra, đã thể hiện rằng phân tử axit nucleic theo sáng chế

mã hóa protein F của RSV mà được ổn định ở cấu trạng trước dung hợp, và tạo ra độ chuẩn trung hòa kháng thể cao hơn so với protein F của RSV kiểu đại (như được bộc lộ trong WO2013/139911 và WO2013/139916).

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế do đó đề xuất phân tử axit nucleic mới mã hóa protein F của virus hợp bào hô hấp trước dung hợp (Protein F trước dung hợp của RSV, hoặc protein RSV pre-F), trong đó protein RSV pre-F bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1 hoặc 2.

Theo các phương án nhất định, phân tử axit nucleic mã hóa protein RSV pre-F có SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ axit nucleic, phân tử axit nucleic, axit nucleic hoặc trình tự nucleotit, và polynucleotit được dùng trao đổi nhau và đều đề cập đến biopolyme tuyến tính (mạch) được làm từ nucleotit, bao gồm ADN và ARN.

Chuyên gia trong lĩnh vực cũng cần hiểu rằng nhiều phân tử axit nucleic khác nhau có thể mã hóa cùng polypeptit do sự suy biến của mã gen. Cần hiểu rằng chuyên gia trong lĩnh vực có thể, sử dụng các kỹ thuật thông thường, tạo ra sự thể nucleotit mà không ảnh hưởng trình tự polypeptit được mã hóa bởi polynucleotit được mô tả từ đó phản ánh việc sử dụng đơn vị mã của sinh vật chủ cụ thể bất kỳ trong đó polypeptit là được biểu hiện. Do đó, trừ khi được quy định cụ thể khác, "phân tử axit nucleic mã hóa trình tự axit amin" bao gồm tất cả các trình tự nucleotit mà là các phiên bản suy biến của nhau và mã hóa cùng trình tự axit amin. Trình tự nucleotit mã hóa protein và ARN có thể bao gồm các intron. Trình tự ở đây được cho hướng từ 5' đến 3', như đã biết trong lĩnh vực.

Theo các phương án nhất định, phân tử axit nucleic mã hóa đoạn RSV F trước dung hợp bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1 hoặc 2.

Theo các phương án nhất định, phân tử axit nucleic mã hóa protein F trước dung hợp của RSV, hoặc đoạn của chúng, là codon được tối ưu hóa để biểu hiện trong tế bào của động vật có vú, như tế bào của người. Các phương pháp tối ưu hóa codon đã được biết và mô tả trước đây (ví dụ WO 96/09378).

Theo các phương án nhất định, phân tử axit nucleic mã hóa protein F trước dung hợp của RSV bao gồm trình tự axit nucleic có SEQ ID NO: 3. Theo các phương án nhất

định, axit nucleic mã hóa protein F của RSV bao gồm trình tự axit nucleic có SEQ ID NO: 4.

Theo các phương án nhất định, axit nucleic mã hóa protein F của RSV bao gồm trình tự axit nucleic có SEQ ID NO: 3 hoặc 4.

Thuật ngữ "đoạn" như được sử dụng ở đây đề cập đến peptit có sự loại đầu amin và/hoặc đầu carboxy và/hoặc bên trong, nhưng trong đó trình tự axit amin còn lại giống với các vị trí tương ứng trong trình tự của protein F của RSV chiều dài đầy đủ, ví dụ, protein F của RSV có SEQ ID NO. 1 hoặc 2. Đáng lưu ý là để tạo ra đáp ứng miễn dịch và nói chung để chủng ngừa, protein không cần chiều dài đủ hoặc có các chức năng của kiểu đại, và các đoạn của protein có tác dụng tương tự. Chuyên gia trong lĩnh vực sẽ hiểu rằng các thay đổi có thể thực hiện với protein, ví dụ bằng cách thế, loại, thêm axit amin, v.v., ví dụ bằng các quy trình sinh học phân tử thông thường. Nhìn chung, có thể áp dụng sự thế axit amin bảo toàn mà không làm mất chức năng hoặc khả năng gây miễn dịch của polypeptit. Điều này có thể được kiểm tra dễ dàng theo các quy trình thông thường đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực.

Sáng chế còn đề cập đến vectơ chứa phân tử axit nucleic mã hóa protein F của RSV trước dung hợp bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1 hoặc 2, hoặc đoạn của chúng.

Theo sáng chế, vectơ có thể là bất kỳ vectơ mà có thể thích hợp để đưa vào quy trình AND tái tổ hợp và có thể mang đến biểu hiện phân tử axit nucleic theo sáng chế. Việc lựa chọn vectơ thường sẽ phụ thuộc vào tính phù hợp của vectơ với tế bào chủ trong đó vectơ được đưa vào.

Theo các phương án nhất định, vectơ là adenovirut tái tổ hợp của người, còn gọi là vectơ adenovirut tái tổ hợp. Điều chế vectơ adenovirut tái tổ hợp đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Thuật ngữ 'tái tổ hợp' đối với adenovirut, như được sử dụng ở đây nghĩ là nó được biến đổi bởi bàn tay con người, ví dụ đã sửa đổi đầu tận cùng được tách dòng hoạt tính trong đó và/hoặc chứa gen khác loài, tức là không phải là adenovirut kiểu đại có tự nhiên.

Theo các phương án nhất định, vectơ adenovirut theo sáng chế thiếu hụt ít nhất một chức năng gen thiết yếu của vùng E1, ví dụ vùng E1a và/hoặc vùng E1b, của hệ gen

adenovirut cần thiết cho sự sao chép của virut. Theo các phương án nhất định, vectơ adenovirut theo sáng chế thiếu hụt ít nhất một phần của vùng E3 không thiết yếu. Theo các phương án nhất định, vectơ thiếu hụt ít nhất một chức năng gen thiết yếu của vùng E1 và ít nhất một phần của vùng E3 không thiết yếu. Vectơ adenovirut có thể là "thiếu hụt gấp bội," nghĩa là vectơ adenovirut là thiếu trong một hoặc nhiều chức năng gen cơ bản trong mỗi vùng hai hoặc nhiều vùng của bộ gen adenovirut. Ví dụ, vectơ adenovirut thiếu E1- hoặc E1-, thiếu E3- có thể còn thiếu trong ít nhất một gen cơ bản của vùng E4 và/hoặc ít nhất một gen cơ bản của vùng E2 (ví dụ, vùng E2A và/hoặc vùng E2B).

Vectơ adenovirut, phương pháp tạo cấu trúc của nó và phương pháp nhân giống nó, đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này và được mô tả trong, ví dụ, bằng sáng chế Mỹ 5,559,099, 5,837,511, 5,846,782, 5,851,806, 5,994,106, 5,994,128, 5,965,541, 5,981,225, 6,040,174, 6,020,191, và 6,113,913, và Thomas Shenk, "Adenoviridae và their Replication", M. S. Horwitz, "Adenoviruses", Chương 67 và 68, tương ứng, trong *Virology*, B. N. Fields và cộng sự., eds., tái bản lần thứ 3, Raven Press, Ltd., New York (1996), và các tài liệu khác được đề cập ở đây. Cơ bản là, việc xây dựng vectơ adenovirut liên quan đến việc sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử tiêu chuẩn, như các kỹ thuật được mô tả trong, ví dụ, Sambrook và cộng sự., *Molecular Cloning, Laboratory Manual*, tái bản lần thứ 2, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), Watson và cộng sự., *Recombinant DNA*, tái bản lần thứ 2, Scientific American Books (1992), và Ausubel và cộng sự., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, NY (1995), và các tài liệu khác được đề cập ở đây.

Theo các phương án nhất định, adenovirut là adenovirut ở người có kiểu huyết thanh 26 hoặc 35. Vaccin theo sáng chế trên cơ sở kiểu huyết thanh này thể hiện có tiềm năng hơn loại được mô tả trong lĩnh vực mà trên cơ sở Ad5, do chúng không tạo ra bảo vệ toàn diện kháng sao chép thử thách RSV sau khi cho dùng riêng lẻ trong cơ (Kim et al, 2010, Vaccine 28: 3801-3808; Kohlmann và cộng sự, 2009, *J Virol* 83: 12601-12610; Krause và cộng sự, 2011, *Virology Journal* 8:375). Kiểu huyết thanh theo sáng chế thông thường còn có tỷ suất lưu hành huyết thanh thấp và/hoặc các độ chuẩn kháng thể trung hòa tồn tại trước thấp trong quần thể người. Vectơ adenovirut tái tổ hợp của kiểu huyết thanh này với gen chuyển khác nhau được đánh giá trong các thử nghiệm lâm sàng, và do đó còn thể hiện để có đặc tính an toàn tuyệt vời. Điều chế vectơ rAd26 được mô tả, ví

dụ, trong WO 2007/104792 và trong Abbink và cộng sự., (2007) *Virol* 81(9): 4654-63. Trình tự hệ gen ví dụ của Ad26 được tìm thấy trong Mã số truy cập GenBank EF 153474 và trong SEQ ID NO:1 của WO 2007/104792. Điều chế rAd35 vector được mô tả, ví dụ, trong Patent Mỹ số 7,270,811, trong WO 00/70071, và trong Vogels và cộng sự., (2003) *J Virol* 77(15): 8263-71. Trình tự hệ gen của Ad35 nêu làm ví dụ được tìm thấy trong GenBank Accession AC_000019 và trên Hình 6 của WO 00/70071.

Adenovirut tái tổ hợp theo sáng chế có thể là sao chép-khả biến hoặc sao chép-khuyết. Theo các phương án nhất định, adenovirut thiếu khả năng sao chép, ví dụ vì nó chứa sự làm khuyết trong vùng E1 của hệ gen. Như đã biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, trong trường hợp loại bỏ các vùng thiết yếu từ hệ gen adenovirut, các chức năng được mã hóa bởi các vùng này phải được cung cấp ở dạng trans, tốt hơn nếu bởi tế bào sản xuất, tức là khi một phần hoặc toàn bộ các vùng E1, E2 và/hoặc E4 được loại bỏ khỏi adenovirut, các vùng này phải có mặt trong tế bào sản xuất, ví dụ được kết hợp vào hệ gen của nó, hoặc ở dạng được gọi là adenovirut hỗ trợ hoặc plasmit hỗ trợ. Adenovirut cũng có thể có khuyết đoạn trong vùng E3, mà không cần thiết cho quá trình sao chép, và do đó, khuyết đoạn như vậy không cần phải được bổ sung.

Tế bào tạo (đôi khi còn được gọi trong lĩnh vực và ở đây là ‘tế bào đóng gói’ hoặc ‘tế bào bổ sung’ hoặc ‘tế bào chủ’) mà có thể được sử dụng có thể là tế bào tạo bất kỳ trong đó adenovirut mong muốn có thể được lai tạo. Ví dụ, việc nhân giống vector adenovirut tái tổ hợp được thực hiện ở tế bào sản xuất mà bổ sung các thiếu hụt trong adenovirut. Các tế bào sản xuất như vậy tốt hơn nếu có ít nhất trình tự adenovirut E1 trong hệ gen của nó, và nhờ đó có khả năng bổ sung adenovirut tái tổ hợp với sự làm khuyết trong vùng E1. Bất kỳ tế bào tạo bổ sung E1 có thể được sử dụng, như tế bào vĩnh mạc của người được làm bất tử bởi E1, ví dụ các tế bào 911 hoặc PER.C6 (xem Patent Mỹ 5,994,128), amnioxyt biến đổi E1 (xem Patent Châu Âu 1230354), các tế bào A549 biến đổi E1 (xem ví dụ WO 98/39411, Patent Mỹ 5,891,690), GH329:HeLa (Gao và cộng sự, 2000, *Human Gene Therapy* 11: 213-219), 293, và tương tự. Theo các phương án nhất định, tế bào sản xuất là, ví dụ, tế bào HEK293, hoặc tế bào PER.C6, hoặc tế bào 911, hoặc tế bào IT293SF, và các tế bào tương tự.

Đối với các adenovirut khuyết E1 không phải nhóm phụ C như Ad35 (nhóm phụ B) hoặc Ad26 (nhóm phụ D), được ưu tiên là để trao đổi trọng tự mã hóa E4-orf6 của các

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

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

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

Đối với adenovirut nhóm phụ B, như Ad35, có loại bỏ trong vùng E1n, ưu tiên là giữ lại đầu 3' của khung đọc mở E1B 55K trong adenovirut, ví dụ phía dòng ngược trực tiếp 166 bp của khung đọc mở pIX hoặc đoạn bao gồm chúng như dòng ngược trực tiếp đoạn 243 bp của codon khởi đầu pIX (được đánh dấu ở đầu 5' bởi vị trí giới hạn *Bsu36I* trong bộ gen Ad35), vì điều này làm tăng tính ổn định của adenovirut vì trình tự khởi đầu của gen pIX có một phần trong vùng này (xem, ví dụ Havenga *et al*, 2006, *J. Gen. Virol.* 87: 2135-2143; WO 2004/001032, được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn).

“Axit nucleic khác loại” (ở đây còn gọi là ‘gen chuyển’) trong adenovirut theo sáng chế là axit nucleic mà không có mặt một cách tự nhiên trong adenovirut. Nó được đưa vào adenovirut ví dụ bằng các kỹ thuật sinh học phân tử tiêu chuẩn. Theo sáng chế,

axit nucleic khác loại mã hóa protein RSV pre-F (hoặc đoạn của chúng) chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1 hoặc 2. Nó có thể ví dụ được tách dòng vào vùng E1 hoặc E3 loại bỏ của vector adenovirut. Gen chuyển nhìn chung được liên kết hoạt động với trình tự kiểm soát biểu hiện. Điều này có thể ví dụ được thực hiện bằng cách đặt axit nucleic mã hóa (các) gen chuyển dưới sự điều khiển của trình tự khởi đầu. Các trình tự điều hòa khác có thể được bổ sung. Nhiều trình tự khởi đầu phiên mã có thể được sử dụng để biểu hiện (các) chuyển gen, và đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực. Ví dụ không giới hạn về trình tự khởi đầu phiên mã thích hợp để thu được biểu hiện trong tế bào nhân chuẩn là trình tự khởi đầu phiên mã CMV (US 5,385,839), ví dụ trình tự khởi đầu phiên mã ngay ban đầu CMV, ví dụ bao gồm nt. -735 đến +95 từ trình tự tăng cường gen/trình tự khởi đầu phiên mã sớm tức thì CMV. Tín hiệu polyadenyl hóa, ví dụ tín hiệu polyA hormon sinh trưởng bò (US 5,122,458), có thể có mặt ở sau (các) gen chuyển này.

Theo các phương án nhất định, adenovector tái tổ hợp theo sáng chế bao gồm làm nucleotit đầu 5' trình tự nucleotit: CTATCTAT. Các phương án này là hữu ích vì vector này biểu hiện tăng sao chép trong các quy trình điều chế, dẫn đến việc các mẻ adenovirut có sự đồng nhất cải thiện, so với vector có trình tự đầu tận cùng 5' nguyên gốc (thông thường CATCATCA) (xem cả các đơn sáng chế số PCT/EP2013/054846 và US 13/794,318, tên sáng chế 'Batches of recombinant adenovirus with altered terminal ends' nộp ngày 12 Tháng Ba năm 2012 dưới tên Crucell Holland B.V.), được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ. Sáng chế do đó còn đề xuất các mẻ adenovirut tái tổ hợp mã hóa protein F của RSV hoặc một phần của chúng, trong đó protein F của RSV bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1 hoặc 2, và trong đó hầu hết toàn bộ (ví dụ ít nhất 90%) adenovirut trong mẻ bao gồm bộ gen với trình tự nucleotit cuối CTATCTAT.

Theo các phương án nhất định, phân tử axit nucleic có thể mã hóa đoạn của protein F trước dung hợp của RSV. Đoạn có thể thu được từ một trong số hoặc cả loại bỏ gốc amin và gốc carboxy. Phạm vi loại bỏ có thể được xác định bởi chuyên gia trong lĩnh vực đề, ví dụ, thu được sản lượng tốt hơn adenovirut tái tổ hợp. Đoạn sẽ được chọn để chứa đoạn hoạt tính miễn dịch học của protein F, cụ thể là phần mà sẽ tạo ra tăng đáp ứng miễn dịch ở đối tượng. Điều này có thể dễ dàng xác định được bằng cách sử dụng các phương pháp in silico, in vitro và/hoặc trong cơ thể, tất cả đều quen thuộc đối với chuyên gia trong lĩnh vực.

Sáng chế hơn nữa đề xuất chế phẩm chứa phân tử axit nucleic mã hóa RSV F trước dung hợp chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1 hoặc 2.

Tương tự, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa vector như được mô tả ở đây

Theo các phương án nhất định, chế phẩm chứa phân tử axit nucleic và/hoặc vector là để dùng trong làm giảm nhiễm và/hoặc sao chép RSV ở đối tượng. Theo các phương án ưu tiên nhất định, chế phẩm là để dùng làm vaccin kháng RSV. Thuật ngữ "vaccin" đề cập đến tác nhân hoặc chế phẩm chứa thành phần hoạt tính có tác dụng làm giảm độ gây miễn dịch chữa bệnh ở đối tượng chống lại mầm bệnh hoặc bệnh nhất định. Theo sáng chế, vaccin bao gồm lượng có hiệu quả của phân tử axit nucleic mà mã hóa protein F trước dung hợp của RSV có SEQ ID NO: 1 hoặc 2, hoặc đoạn kháng nguyên của chúng, mà tạo ra đáp ứng miễn dịch kháng protein F của RSV. Sáng chế đề xuất phương pháp phòng ngừa bệnh đường hô hấp thấp nghiêm trọng dẫn đến việc nằm viện và làm giảm tần suất biến chứng như viêm phổi và viêm tiểu phế quản do lây nhiễm và sao chép RSV ở đối tượng. Do đó, sáng chế còn đề xuất phương pháp phòng ngừa hoặc làm giảm bệnh đường hô hấp thấp nghiêm trọng, phòng ngừa hoặc làm giảm (ví dụ rút ngắn) việc nằm viện, và/hoặc làm giảm tần suất và/hoặc độ trầm trọng của viêm phổi hoặc viêm tiểu phế quản gây ra bởi RSV ở đối tượng, bao gồm cho đối tượng chế phẩm chứa phân tử axit nucleic mã hóa protein RSV pre-F hoặc đoạn của chúng, trong đó protein F của RSV bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1 hoặc 2. Thuật ngữ "vaccin" theo sáng chế nghĩa là dược phẩm, và do đó thường bao gồm chất pha loãng, chất mang hoặc tá dược được dùng. Nó có thể có hoặc không bao gồm các thành phần hoạt tính khác. Theo các phương án nhất định nó có thể là vaccin tổ hợp, vaccin này còn bao gồm các thành phần khác cảm sinh phản ứng miễn dịch, chẳng hạn, chống các protein khác của RSV và/hoặc chống các tác nhân xâm nhiễm khác.

Theo các phương án nhất định chế phẩm chứa phân tử axit nucleic hoặc vector còn bao gồm, hoặc được dùng cùng với, một hoặc nhiều tá dược. Tá dược là đã biết trong lĩnh vực để làm tăng thêm đáp ứng miễn dịch đối với yếu tố quyết định kháng nguyên được áp dụng, và chế phẩm được bao gồm adenovirus và tá dược thích hợp ví dụ được bộc lộ trong WO 2007/110409, được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn. Thuật ngữ "chất bổ trợ" và "chất kích thích miễn dịch" được sử dụng thay thế lẫn nhau trong bản mô tả này, và được định nghĩa là một hoặc nhiều chất gây kích thích hệ miễn dịch. Trong bối

cảnh này, tá dược được sử dụng để nâng cao đáp ứng miễn dịch cho protein F trước dung hợp của RSV theo sáng chế. Các ví dụ về tá dược thích hợp bao gồm muối nhôm như nhôm hydroxit và/hoặc nhôm phosphat; chế phẩm nhũ dầu (hoặc chế phẩm dầu trong nước), bao gồm nhũ tương squalen nước, như MF59 (xem ví dụ WO 90/14837); chế phẩm saponin, như ví dụ QS21 và các phức hợp kích thích miễn dịch (ISCOMS) (xem ví dụ US 5,057,540; WO 90/03184, WO 96/11711, WO 2004/004762, WO 2005/002620); các chất dẫn xuất từ vi khuẩn hoặc vi sinh vật, ví dụ về các chất này là monophosphoryl lipid A (MPL), 3-O- deaxylat hóa MPL (3dMPL), CpG- motif chứa oligonucleotit, độc tố vi khuẩn ADP-ribosyl hóa hoặc dạng đột biến của nó, như nội độc tố LT không bền nhiệt từ *E. coli*, độc tố khuẩn tả CT, và tương tự. Còn có thể sử dụng tá dược mã hóa vector, ví dụ bằng cách sử dụng axit nucleic khác loại mã hóa dung hợp vùng oligomer hóa của protein liên kết C4 (C4bp) với kháng nguyên mong muốn (ví dụ Solabomi et al, 2008, *Infect Immun* 76: 3817-23). Theo các phương án nhất định chế phẩm theo sáng chế bao gồm nhôm làm tá dược, ví dụ dưới dạng nhôm hydroxit, nhôm phosphat, nhôm kali phosphat, hoặc kết hợp của chúng, ở các nồng độ 0,05 – 5 mg, ví dụ từ 0,075-1,0, hàm lượng nhôm mỗi liều dùng.

Theo các phương án khác, các hợp chất không bao gồm các tá dược.

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

thành phần hoạt tính khác. Theo một số phương án, các kháng nguyên không adenovirut khác (ngoài RSV.F), có thể được mã hóa trong vectơ theo sáng chế. Theo một số phương án, do đó có thể được mong muốn để biểu hiện nhiều hơn một protein từ adenovirut đơn, và trong các trường hợp này nhiều trình tự mã hóa ví dụ có thể được liên kết để tạo ra dịch mã đơn từ cắt xét biểu hiện đơn hoặc có thể có mặt trong hai cắt xét biểu hiện riêng biệt được tách dòng thành các phần khác nhau của bộ gen adenovirut.

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

Việc dùng chế phẩm có thể tiến hành sử dụng các đường dùng tiêu chuẩn. Các phương án không giới hạn bao gồm cho dùng ngoài đường tiêu hóa, như bằng cách tiêm ví dụ trong da, trong cơ, v.v., hoặc dưới da, qua da, hoặc cho dùng ở niêm mạc, ví dụ trong mũi, miệng, và tương tự. Việc dùng trong mũi thường thấy là đường dùng được ưu tiên đối với vaccin kháng RSV. Tác dụng quan trọng nhất của chiến lược dùng trong mũi vật sống là kích thích trực tiếp sự miễn dịch của hệ hô hấp cục bộ và không làm tăng bệnh liên quan. Chỉ các vaccin dưới đánh giá lâm sàng đối với sử dụng nhi khoa ở thời điểm hiện tại là vaccin dùng trong mũi vật sống (Collins và Murphy. Vaccines against human respiratory syncytial virus). Trong: *Perspectives in Medical Virology 14: Respiratory Syncytial Virus* (Ed. Cane, P.), Elsevier, Amsterdam, Hà Lan, pp233-277). Dùng trong mũi là đường dùng được ưu tiên thích hợp theo sáng chế. Tác dụng của cho dùng trong cơ là đơn giản và dễ thiết lập, và không tạo ra các băn khoăn về tính an toàn đối với áp dụng trong mũi của trẻ dưới 6 tuổi. Theo một phương án, chế phẩm được sử dụng bằng cách tiêm trong cơ, ví dụ vào cơ delta của cánh tay, hoặc cơ rộng ngoài của đùi. Chuyên gia trong lĩnh vực biết các khả năng khác nhau để dùng chế phẩm, ví dụ vaccin để tạo ra đáp ứng miễn dịch đối với (các) kháng nguyên trong vaccin.

Đối tượng như được sử dụng ở đây ưu tiên là động vật có vú, ví dụ loài gặm nhấm, ví dụ chuột, chuột hại cây bông, hoặc động vật linh trưởng không phải người, hoặc người. Tốt hơn nếu, đối tượng là đối tượng người. Đối tượng có thể ở độ tuổi bất kỳ, ví dụ từ

khoảng 1 tháng đến 100 tuổi, ví dụ từ khoảng 2 tháng đến khoảng 80 tuổi, ví dụ từ khoảng 1 tháng đến khoảng 3 tuổi, từ khoảng 3 tuổi đến khoảng 50 tuổi, từ khoảng 50 tuổi đến khoảng 75 tuổi, v.v..

Còn có thể cho phép một hoặc nhiều lần dùng tăng cường một hoặc nhiều chế phẩm, ví dụ vaccin, theo sáng chế. Nếu thực hiện chủng ngừa tăng cường, thông thường, chủng ngừa tăng cường này sẽ được dùng cho cùng đối tượng ở thời điểm từ từ một tuần đến một năm, ưu tiên là từ hai tuần đến bốn tháng, sau khi dùng chế phẩm cho đối tượng lần thứ nhất (mà trong các trường hợp này được gọi là ‘chủng ngừa khơi mào’). Trong các phác đồ tăng cường tùy ý, còn có thể cho dùng vectơ khác nhau, ví dụ một hoặc nhiều adenovirut có kiểu huyết thanh khác nhau, hoặc vectơ khác như MVA, hoặc ADN, hoặc protein, cho đối tượng sau chủng ngừa khơi mào. Ví dụ có thể dùng cho đối tượng vectơ adenovirut tái tổ hợp bao gồm trình tự axit nucleic mã hóa protein F của RSV trước dung hợp làm khơi mào, và tăng cường với chế phẩm chứa RSV F protein. Theo các phương án nhất định, protein F của RSV còn ổn định ở cấu trạng trước dung hợp.

Theo một số phương án, việc cho dùng bao gồm cho dùng khơi mào và ít nhất một lần cho dùng tăng cường. Theo các phương án nhất định, chế phẩm được dùng làm chế phẩm khơi mào và/hoặc làm chế phẩm tăng cường trong chế độ chủng ngừa khơi mào-tăng cường. Theo các phương án nhất định của nó, dùng khơi mào là với rAd35 chứa axit nucleic mã hóa protein RSV pre-F hoặc đoạn của chúng (‘rAd35-RSV.pre-F’), trong đó protein F của RSV pre-F bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1 hoặc 2, và dùng tăng cường là với rAd26 chứa axit nucleic mã hóa protein F của RSV (‘rAd26-RSV.pre-F’), trong đó protein RSV pre-F bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1 hoặc 2. Theo các phương án khác của nó, dùng khơi mào là với rAd26-RSV.pre-F và dùng tăng cường là với rAd35-RSV.pre-F. Theo các phương án khác, cả dùng khơi mào và dùng tăng cường là với rAd26.RSV.pre-F. Theo các phương án nhất định, dùng khơi mào là với rAd26-RSV.pre-F hoặc rAd35-RSV.pre-F và dùng tăng cường là với protein F của RSV. Theo tất cả các phương án này, có thể cung cấp các lần cho dùng tăng cường với vectơ hoặc protein giống hoặc khác nhau. Các phương án trong đó tăng cường với protein F của RSV có thể đặc biệt có lợi bao gồm ví dụ ở các đối tượng người già trong nhóm có nguy cơ (ví dụ có COPD hoặc suyễn) ở 50 tuổi hoặc già hơn, hoặc ví dụ ở đối tượng khỏe mạnh ở 60 tuổi hoặc già hơn hoặc 65 tuổi hoặc già hơn.

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

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra vaccin kháng virus hợp bào hô hấp (RSV), bao gồm việc tạo ra adenovirut tái tổ hợp mà chứa axit nucleic mã hóa protein F của RSV hoặc đoạn của chúng, nhân giống adenovirut tái tổ hợp này trong môi trường nuôi cấy của tế bào chủ, phân lập và tinh chế adenovirut tái tổ hợp, và mang adenovirut tái tổ hợp vào chế phẩm được dụng, trong đó protein F của RSV bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1 hoặc 2.

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

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

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

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

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

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

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

Các chất tẩy có thể được sử dụng, và phương pháp sử dụng chúng, thường là đã biết với chuyên gia trong lĩnh vực. Một số ví dụ đã được bàn đến ví dụ trong WO

98/22588, tr. 29-33. Các chất tẩy có thể bao gồm chất tẩy anion, cation, ion lưỡng tính, và không ion. Nồng độ của chất tẩy có thể thay đổi, ví dụ nằm trong khoảng 0,1%-5% (khối lượng/khối lượng). Theo một phương án, chất tẩy được sử dụng là Triton X-100.

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

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

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

Ưu tiên là, tinh chế sử dụng ít nhất một bước tinh chế, như ví dụ được bàn đến trong WO 98/22588, tr. 61-70. Nhiều quy trình đã được mô tả để tinh chế thêm

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

Để dùng cho người, sáng chế có thể sử dụng chế phẩm được bao gồm rAd và chất mang hoặc tá dược được dùng. Trong nội dung của sáng chế, thuật ngữ "được dùng" nghĩa là chất mang hoặc tá dược, ở liều lượng và nồng độ được sử dụng, sẽ không gây ra tác động có hại hoặc không mong muốn bất kỳ đối tượng sử dụng chúng. Các chất mang và tá dược được dùng này là đã biết trong lĩnh vực (xem Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, A. R. Gennaro, Ed., Mack Publishing Company [1990]; Pharmaceutical Formulation Development of Peptides và Proteins, S. Frokjaer và L. Hovgaard, Eds., Taylor & Francis [2000]; và Handbook of Pharmaceutical Excipients, tái bản lần thứ 3, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press [2000]). rAd được tinh chế ưu tiên là được điều chế và cho dùng là dung dịch vô trùng mặc dù cũng có thể sử dụng các chế phẩm khô lạnh. Các dung dịch vô trùng được điều chế bằng cách lọc vô trùng hoặc bằng các phương pháp khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Sau đó, các dung dịch được làm đông lạnh hoặc được nạp đầy vào đồ chứa phân liều được. Độ pH của dung dịch nhìn chung nằm trong khoảng từ độ pH 3,0 đến 9,5, ví dụ độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 7,5. rAd cơ bản là trong dung dịch có chất đệm được dùng thích hợp, và dung dịch của rAd còn có thể chứa muối. Tùy ý, chất làm ổn định có thể có mặt, như albumin. Theo các phương án nhất định, chất tẩy rửa được bổ sung. Theo một số phương án, rAd có thể được điều chế thành chế phẩm tiêm. Các chế phẩm này chứa lượng có hiệu quả rAd, hoặc là dung dịch lỏng, huyền phù lỏng vô trùng hoặc các dạng đông khô và tùy ý chứa chất ổn định hoặc tá dược. Vacxin adenovirut còn có thể được sol khí để cho dùng trong mũi (xem ví dụ WO 2009/117134).

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

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

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Làm ổn định protein F của RSV ở cấu dạng trước dung hợp của nó

Plasmid mã hóa trình tự RSV F cơ bản được tổng hợp và thể axit amin được đưa vào protein bằng đột biến định hướng điểm. Các biến thể protein được biểu hiện chuyển tiếp trong các tế bào HEK293. Biểu hiện protein tương đối trên bề mặt tế bào được đánh giá bằng Phân tích tế bào dòng chảy. Tính ổn định của protein F ở cấu dạng trước dung hợp được đánh giá trong thử nghiệm tính ổn định nhiệt.

Trình tự protein được dùng cho các biến thể protein RSV A2 F được lấy từ GenBank, số truy cập ACO83301.1. Thể axit amin được đưa vào trình tự bằng đột biến định hướng điểm (bộ kit đột biến định hướng điểm QuikChange II XL, Agilent technologies). Đoạn mỗi đột biến được thiết kế sử dụng dụng cụ trực tuyến PrimerX. Các tế bào HEK293T (CRL-11268) được mua từ Bộ sưu tập nuôi cấy mô của Mỹ và được nuôi cấy dưới các điều kiện nuôi cấy tế bào tiêu chuẩn (37°C, 10% CO₂).

Các kháng thể Protein F kháng RSV IgG1 đầy đủ của người CR9501 và CR9503 được cấu trúc bằng cách tách dòng vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và chuỗi nhẹ (VL) thành vectơ biểu hiện IgG1 đơn. Các tế bào PER.C6® (Crucell) được biến nạp với cấu trúc biểu hiện IgG1 và các kháng thể được biểu hiện được tinh chế từ dịch nổi nuôi cấy

sử dụng sắc ký POROS Mabcapture A (Applied Biosystems) và sau đó trao đổi đệm đến 50mM NaAc, 50mM NaCl, pH 5,5. Nồng độ kháng thể được đo bằng hấp thụ quang ở 280 nm. Chất lượng kháng thể cũng được xác nhận bằng sắc ký loại kích cỡ (SEC), SDS-PAGE và điện di tập trung đẳng điện. Kháng thể CR9501 bao gồm vùng VH và VL của 58C5 (như được mô tả trong WO2011/020079) mà liên kết đặc hiệu với protein F của RSV ở cấu dạng trước dung hợp của nó và không liên kết với cấu dạng sau dung hợp. CR9503 bao gồm vùng VH và VL của motavizumab, mà nhận diện cả cấu dạng trước dung hợp và sau dung hợp của RSV F.

Biểu hiện protein và xử lý nhiệt:

Plasmid được biến nạp tạm thời vào tế bào HEK293T dành sử dụng chất phản ứng biến nạp 293fectin (Cat# 12347-019) (Life Technologies) theo khuyến nghị của nhà cung cấp. 48 giờ sau biến nạp các tế bào được thu hoạch bằng cách tháo với đệm FACS chứa EDTA (không trypsin, xem phần tiếp theo) và huyền phù tế bào được xử lý nhiệt trong 10 phút hoặc là trong bể nước hoặc trong khối PCR để thử nghiệm tính ổn định nhiệt. Sau khi xử lý nhiệt, các tế bào được chuẩn bị để Phân tích tế bào dòng chảy.

Để phân tích protein F biểu hiện adeno, các tế bào A549 được xâm nhiễm bằng virus Ad26 ở MOI bằng 10 000 hoặc 5000 và virus Ad35 ở MOI bằng 5000, 2500 hoặc 1,250. Sau 48h, các tế bào được tháo và được xử lý nhiệt trong 15 phút ở 37°C, 50°C và 56°C. Khi xử lý nhiệt tế bào được nhuộm sử dụng CR9501-Alexa647 hoặc CR9503-Alexa647 và Propidium Iodua (PI). Sau khi nhuộm, các tế bào được cố định và phân tích sử dụng thiết bị phân tích tế bào BD FACS CANTO II.

Phân tích tế bào dòng chảy:

Đối với mỗi lần nhuộm, các đối chứng sau đây được bao gồm: 1) mẫu đối chứng âm, tức là các tế bào mà không đưa qua bất kỳ xử lý nào và không được nhuộm bằng kháng thể bất kỳ dán nhãn fluorophore; 2) mẫu đối chứng dương, tức là các tế bào mà được nhuộm chỉ với một fluorophore (một trong mỗi tế bào mà được dùng cho thử nghiệm).

Các tế bào được tạo huyền phù lại trong Phân tích tế bào dòng chảy (Đệm FC, 5mM EDTA, FBS 1% trong PBS) và được phân bố trong thể tích bằng 50 µl huyền phù

tế bào mỗi giếng trong tấm 96 giếng với nắp (tấm đáy chữ U hoặc V). Phương pháp hai bước hoặc một bước được dùng cho việc nhuộm.

Trong trường hợp phương pháp hai bước 50 μ l Abs thứ nhất (hoặc đệm cho đối chứng âm) được thêm vào giếng và được ủ ở RT trong 30 phút. CR9501 và CR9503 biotinyl hóa được dùng ở 2 μ g/ml (nồng độ cuối trong giếng 1 μ g/ml). Sau khi ủ, các tế bào được rửa 2 lần bằng đệm FC. Sau đó 50 μ l Streptavidin-APC (Mẫu dò phân tử cat#SA1005, 0,1 mg/ml được dùng ở 1:100) hoặc đệm cho đối chứng âm được thêm vào giếng và được ủ ở RT trong 30 phút. Các tế bào được rửa lại 2 lần bằng đệm FC. Sau khi rửa, các tế bào được tạo huyền phù lại trong 100 μ l đệm FC +/- chủng sống-chết (PI từ Invitrogen, cat#P1304MP, được dùng ở 2 μ g/ml) và được ủ ở RT trong 15 phút. Các tế bào được ly tâm ở 200g (1000rpm) trong 5 phút, đệm với PI được loại và các tế bào được tạo huyền phù lại trong 150 μ l đệm FC.

Trong trường hợp phương pháp một bước, kháng thể CR9501 và CR9503 được dán nhãn mẫu dò huỳnh quang Alexa647 (Mẫu dò phân tử, cat#A-20186) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các tế bào được nhuộm theo phương pháp ở trên ngoại trừ bước Streptavidin-APC.

Từ quần thể tế bào sống, phần trăm tế bào dương tính đối với liên kết kháng thể CR9501/CR9503 được xác định. Các tế bào dương tính đối với liên kết CR9503 biểu hiện protein F của RSV trên bề mặt của chúng. Các tế bào dương tính đối với liên kết CR9501 biểu hiện RSV F trước dung hợp trên bề mặt của chúng.

Cường độ của nhuộm kháng thể (Giá trị trung vị của cường độ huỳnh quang – MFI) tỷ lệ với lượng protein F trên bề mặt tế bào. MFI được tính toán từ quần thể tế bào sống biểu hiện protein F.

Các kết quả:

Biểu hiện bề mặt tế bào của các biến thể protein F chiều dài đầy đủ:

Nhóm phụ đột biến mà được xác định trước đây để làm tăng biểu hiện hoặc tính ổn định của vùng ngoại bào protein F của RSV ở cấu dạng trước dung hợp được đưa vào trong trình tự RSV A2 F kiểu dài chiều dài đầy đủ (số truy cập Genbank ACO83301). Các đột biến được đưa vào một mình hoặc nhiều kết hợp, và tác động lên biểu hiện protein và tính ổn định được đánh giá.

Mức biểu hiện của protein được đo là trung bình cường độ huỳnh quang (MFI) bằng Phân tích tế bào dòng chảy sau khi nhuộm với kháng thể CR9503 mà nhận diện cả protein F trước dung hợp và sau dung hợp. Kết hợp của việc thể hai axit amin mà được mô tả trước đây đối với việc làm ổn định của protein RSV pre-F (tức là N67I và S215P) cũng làm tăng mức biểu hiện của Protein F của RSV chiều dài đầy đủ lên 2,3 lần, so với RSV F kiểu dại chiều dài đầy đủ (Hình 2).

Biểu hiện tăng nổi bật quan sát thấy đối với các biến thể với 3 thể axit amin được kết hợp. Thụ vị là, kết hợp của nhiều hơn ba đột biến trong một biến thể không làm tăng thêm biểu hiện protein. Điều này có thể do khả năng giới hạn của màng tế bào để điều tiết nhiều bản sao của protein F.

Lượng của F trước dung hợp trên bề mặt của tế bào được đánh giá bằng cách nhuộm với kháng thể đặc hiệu trước dung hợp CR9501 (Hình 3). Biến nạp các tế bào với tất cả các biến thể F tạo ra lượng tương tự nhiều hơn hoặc ít hơn protein F trước dung hợp trên bề mặt tế bào. Sự có mặt của vùng xuyên màng làm ổn định protein chiều dài đầy đủ để mở rộng nhất định và do đó sự khác biệt về tính ổn định trước dung hợp không phải như xuất hiện dưới các điều kiện môi trường giữa các protein F chiều dài đầy đủ. Do đó thử nghiệm tính ổn định nhiệt được phát triển để phân biệt tốt hơn tính ổn định của các biến thể chiều dài đầy đủ, như được mô tả dưới đây.

Chủng A2 mà được dùng làm trình tự bố mẹ cho các biến thể protein F được mô tả trước đây (WO2014/174018 và WO2014/202570) là dòng tế bào được làm phù hợp với chủng phòng thí nghiệm mà tích tụ hai đột biến duy nhất và hiếm (tức là của Lysin 66 và Isoleuxin 76). Theo sáng chế, hai gốc này được gây đột biến để tương tự với thể phân lập lâm sàng tự nhiên (K66E, I76V). Các đột biến K66E và I76V được bao gồm trong thiết kế protein được chọn. So với các biến thể với Lys66 và Ile76, các biến thể với glutamat ở 66 (K66E) có xu hướng biểu hiện hơi cao hơn. Việc thêm valin ở gốc 76 (thể kép của K66E và I76V) không ảnh hưởng đến mức biểu hiện khi so với các biến thể chỉ với thể K66E (Hình 4).

Khả năng của các biến thể protein F chiều dài đầy đủ trên bề mặt tế bào:

Trong điều kiện môi trường trên quy mô ngắn hạn, không quan sát thấy khác biệt đáng kể về tính ổn định của cấu dạng trước dung hợp giữa các biến thể F chiều dài đầy đủ

đủ với các kết hợp khác nhau của đột biến làm ổn định. Nhiệt độ cao được biết là dùng làm bộ khởi động trong phòng thí nghiệm hiệu quả để uốn nếp lại protein F của RSV từ cấu dạng trước dung hợp sang cấu dạng sau dung hợp. Do đó, thử nghiệm sốc nhiệt được thiết lập và được dùng để đánh giá tính ổn định của protein chiều dài đầy đủ liên kết màng. Nói ngắn gọn, tế bào HEK293T được biến nạp với cấu trúc protein F và được dùng cho thử nghiệm 48 giờ sau biến nạp. Các tế bào được tách từ đĩa nuôi cấy tế bào và huyền phù tế bào được xử lý nhiệt ở nhiệt độ tăng trong 10 phút. Sau khi xử lý nhiệt, tế bào được nhuộm với kháng thể kháng RSV F và được phân tích bằng Phân tích tế bào dòng chảy. Dữ liệu phân tích tế bào dòng chảy được phân tích theo hai đường khác nhau. Phần trăm của tế bào, dương tính với nhuộm bằng kháng thể kháng F được phân tích, và trung bình cường độ huỳnh quang (MFI) của tế bào dương tính cũng được tính toán (Hình 5).

Cả nhuộm bằng CR9501 (kháng thể chỉ nhận diện protein F trước dung hợp) và CR9503 (kháng thể nhận diện protein F trước và sau dung hợp) được dùng trong thử nghiệm Phân tích tế bào dòng chảy. Kháng thể CR9503 dùng làm đối chứng dương. Trong trường hợp khi protein F mất cấu dạng trước dung hợp nhưng vẫn ở trên bề mặt của tế bào, protein vẫn bị phát hiện bằng kháng thể CR9503. Mất nhuộm bản cả hai kháng thể cho thấy rằng protein không có trên bề mặt tế bào để liên kết kháng thể, ví dụ do kết tụ.

Các protein chiều dài đầy đủ với ba trong số nhiều thể axit amin được thử trong thử nghiệm và so với RSV F kiểu đại. Biểu hiện của các biến thể này là cao nhất và do đó các biến thể này là các ứng viên được ưu tiên. Tất cả protein chứa thể N67I và S215P, và một hoặc hai đột biến làm ổn định bổ sung được thêm vào.

Protein kiểu đại không biến đổi có sự nhuộm khá ổn định với kháng thể CR9503. MFI của nhuộm CR9503 tăng ở các nhiệt độ cao tuy nhiên khoảng rộng các giá trị cũng có thể rất cao. Điều này chỉ ra rằng không có tích tụ protein xảy ra sau khi sốc nhiệt. Một nửa cấu trạng trước dung hợp bị mất sau khi ủ tế bào ở xấp xỉ 55°C, sau khi ủ ở 60°C tất cả cấu dạng trước dung hợp bị mất như được chứng minh bằng liên kết CR9501 giảm với mẫu F kiểu đại sau sốc nhiệt ở nhiệt độ tăng.

Tất cả các biến thể protein F được thử ổn định hơn RSV F kiểu đại với đa số nhuộm CR9501 cũng còn lại sau xử lý ở nhiệt độ cao (Hình 5 và 6). Protein với thể axit amin K498R ít ổn định hơn loại khác. Việc bổ sung đột biến K66E làm ổn định thêm

protein cũng như các biến thể với thể axit amin K498R trở nên ổn định như loại khác và không quan sát thấy mất cấu trúc trước dung hợp ở 60°C. Chỉ các kết hợp được chọn của các đột biến làm ổn định được thử với K66E và I76V được kết hợp. Tất cả bốn protein được thử ổn định khi phần trăm của các tế bào dương tính được phân tích, tuy nhiên khi MFI là biến thể được phân tích với K498R thể hiện giảm rõ rệt liên kết CR9501 sau xử lý với 60°C, cho thấy rằng biến thể này ít ổn định hơn khi được đánh giá trong thử nghiệm ứng suất nhiệt độ.

Kết luận là, kết hợp của ba đột biến làm ổn định (bao gồm N67I và S215P) được xem là đủ cho mức biểu hiện cao và ổn định. Đột biến S46G hoặc D486N được lựa chọn là đột biến làm ổn định thứ ba nhờ vị trí của chúng trong cấu trúc protein. K66E và I76V được bao gồm trong vì chúng không có tác động tiêu cực lên biểu hiện protein và tính ổn định nhưng làm trình tự gần hơn với trình tự có trong tự nhiên.

Do đó, protein F của RSV trước dung hợp với các đột biến K66E, N67I, I76V, S215P và D486N (F2.2) (SEQ ID NO: 2) và protein F của RSV trước dung hợp với các đột biến K66E, N67I, I76V, S215P và S46G (F2.1) (SEQ ID NO: 1) được chọn lọc cho các vectơ adenovirus cấu trúc. Các protein này thể hiện là ổn định ở cấu trúc trước dung hợp trong thử nghiệm tính ổn định nhiệt lên đến 60°C, và được biểu hiện ở mức cao.

Ví dụ 2. Điều chế các vectơ adenovirus

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

Trình tự axit nucleic, mã hóa protein F trước dung hợp theo sáng chế là gen được tối ưu để biểu hiện ở người và được tổng hợp, bởi Geneart. Trình tự Kozak (5' GCCACC 3') được bao gồm trực tiếp ở phía trước của bộ ba khởi đầu ATG, và hai bộ ba kết thúc (5' TGA TAA 3') được thêm ở đầu của trình tự mã hóa RSV.pre-F. Gen RSV.pre-F được chèn vào plasmid pAdApt35BSU và plasmid pAdApt26 qua vị trí HindIII và XbaI.

Nuôi cấy tế bào:

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

Tạo ra, lây nhiễm và chuyển adenovirus:

Tất cả các adenovirut được tạo ra trong tế bào PER.C6® bằng cách tái tổ hợp cùng loại đơn lẻ và được tạo ra như được mô tả trước đây (đối với rAd35: Havenga *et al.*, 2006, *J. Gen. Virol.* 87: 2135–2143; đối với rAd26: Abbink và cộng sự., 2007, *J. Virol.* 81: 4654–4663). Tóm lại, tế bào PER.C6 được biến nạp bằng plasmid vector Ad, sử dụng Lipofectamine theo chỉ dẫn được cung cấp bởi nhà sản xuất (Life Technologies). Để giải thoát vector Ad35 ví dụ mang catxet biểu hiện của gen chuyển RSV.pre-F, plasmid pAdApt35BSU.RSV.pre-F và cosmit pWE/Ad35.pIX-rITR.dE3.5orf6 được sử dụng, trong khi đó đối với vector Ad26 mang catxet biểu hiện của gen chuyển RSV.pre-F, plasmid the pAdApt26.RSV.pre-F và pWE.Ad26.dE3.5orf6.cosmit được sử dụng. Tế bào được thu một ngày sau khi CPE đầy đủ, rửa đông, ly tâm trong 5 phút ở 3,000 rpm, và được lưu trữ ở -20°C . Các virut tiếp theo là bản được tinh chế và khuếch đại trong PER.C6 được nuôi cấy trên giếng đơn của tấm nuôi cấy mô đa giếng 24 giếng. Khuếch đại tiếp được thực hiện trong PER.C6 được nuôi cấy sử dụng bình thót cổ nuôi cấy mô T25 và bình thót cổ nuôi cấy mô T175. Chất dung giải thô T175, 3 đến 5 ml được sử dụng để chủng ngừa $20\times$ bình thót cổ nuôi cấy mô ba lớp T175 chứa 70% lớp dịch nuôi cấy của tế bào PER.C6. Virut được tinh chế bằng phương pháp tinh chế CsCl hai bước. Cuối cùng, virut được lưu trữ thành các phân phân ước ở -85°C .

Ví dụ 3. *Tạo ra khả năng miễn dịch kháng RSV F sử dụng adenovirut tái tổ hợp có kiểu huyết thanh 26 và 35 biểu hiện RSV F trước dung hợp trong cơ thể.*

Tạo ra khả năng miễn dịch của Ad26.RSV.preF2.1 và Ad26.RSV.preF.2.2 được đánh giá ở chuột, so sánh đáp ứng miễn dịch tế bào và dịch với đáp ứng do các liều giống nhau của Ad26.RSV.FA2 (tức là biểu hiện protein F của RSV kiểu đại). Chuột Balb/c ($n=4$ mỗi nhóm) được chủng ngừa với liều chỉ định bằng 10^8 đến 10^{10} hạt virut (vp) Ad26.RSV.FA2 hoặc Ad26.RSV.preF2.1 hoặc Ad26.RSV.preF2.2, hoặc với đệm chế phẩm. Vào 8 tuần sau khi mỗi, số đơn vị hình thành vết (SFU) IFN γ đặc hiệu RSV F A2 mỗi 10^6 tế bào lách được xác định sử dụng ELISpot. Thể hiện rằng Ad26.RSV.preF2.1 và Ad26.RSV.preF.2.2 gây đáp ứng miễn dịch thể dịch tăng ở chuột khi so với Ad26.RSV.FA2, với khả năng trung hòa rộng và đáp ứng tế bào được duy trì. Chủng ngừa đơn liều trong cơ với Ad26.RSV.preF2.1 và Ad26.RSV.preF.2.2 gây đáp ứng tế bào (Hình 7) mà đặc trưng ở chỗ tạo ra CD8 $^{+}$ tế bào T dương tính với IFN γ , IL2 và/hoặc TNF α (dữ liệu không được thể hiện).

Số lượng và chất lượng của đáp ứng tế bào có thể so sánh được giữa Ad26.RSV.preF2.1, Ad26.RSV.preF2.2 và Ad26.RSV.FA2. Ngược lại, Ad26.RSV.preF2.1 và Ad26.RSV.preF2.2 tạo ra độ chuẩn kháng thể trung hòa RSV cao hơn đáng kể so với Ad26.RSV.FA2. Phân tích gần hơn của đáp ứng kháng thể chứng minh rằng Ad26.RSV.preF2.1 và Ad26.RSV.preF2.2 tạo ra mức kháng thể cao hơn đối với F trước dung hợp, trong khi đó độ chuẩn F sau dung hợp vẫn duy trì so với Ad26.RSV.FA2, tạo ra tỷ lệ kháng thể preF/postF tăng đáng kể. Ngoài ra, tỷ lệ IgG2a/IgG1 của đáp ứng kháng thể giữ không đổi, chứng minh sự dịch chuyển nghiêng Th1 tương tự của đáp ứng thể dịch như đã chứng minh trước đây đối với Ad26.RSV.FA2 (Hình 8).

Đối với Ad26.RSV.preF2.2 còn chứng minh rằng kháng thể tạo ra có khả năng trung hòa nhiều chủng RSV A và B khác nhau, chủng trong phòng thí nghiệm cũng như các thể phân lập lâm sàng, tương tự như quan sát được đối với Ad26.RSV.FA2 (Hình 9).

Sau đó, hiệu quả và tính sinh miễn dịch của cấu trúc vector Ad26.RSV.preF2.2 và Ad35.RSV.preF2.2 được đánh giá trong mô hình chuột bông. Các động vật này được phép sao chép RSV của người, với độ chuẩn đỉnh RSV trong phổi vào ngày 4 và 5. Các nhóm đối chứng trong thử nghiệm bao gồm trong nhóm được xâm nhiễm trong mũi với liều thấp RSV A2, nhờ đó bắt chước bộc lộ tự nhiên, cũng như nhóm được chủng ngừa bằng FI-RSV, sử dụng lô gốc 100 mà gây bệnh hô hấp tăng cường (ERD) trong các nghiên cứu lâm sàng trong dịch pha loãng mà được thể hiện để tạo ra ERD ở chuột bông.

Chủng ngừa liều đơn trong cơ của các động vật bằng Ad26.RSV.preF2.2 ở các liều nằm trong khoảng từ 10^5 đến 10^8 vp/động vật, hoặc Ad35.RSV.preF2.2 trong các liều nằm trong khoảng từ 10^6 đến 10^9 vp/động vật tạo ra bảo vệ hoàn toàn phổi khỏi xâm nhiễm bằng vacxin chủng RSV A2 tương đồng, ngoại trừ 3 động vật được chủng ngừa bằng 10^5 vp Ad26.RSV.preF2.2 (Hình 10A và 10B). Bảo vệ không phụ thuộc liều của việc sao chép RSV trong mũi được quan sát đối với cả hai vector. Nó nằm trong khoảng từ bảo vệ đầy đủ ở 10^8 vp/động vật, đến bảo vệ một phần ở 10^5 vp đối với Ad26.RSV.preF2.2, trong khi đó đối với Ad35.RSV.preF2.2, mũi của động vật được chủng ngừa bằng 10^9 vp được bảo vệ hoàn toàn khỏi RSV A2, và 10^6 vp tạo ra bảo vệ một phần (Hình 10C và 10D) Mũi của động vật được chủng ngừa bằng Ad26.RSV.preF2.2 và Ad35.RSV.preF2.2 được bảo vệ tốt hơn khỏi xâm nhiễm RSV

A2 so với khi được chủng ngừa bằng đối chứng F kiểu đại tương ứng của chúng Ad26.RSV.FA2 và Ad35.RSV.FA2, khi được phân tích về liều dùng ($p=0,0003$, và $p=0,0001$). Bảo vệ khỏi xâm nhiễm RSV đi kèm bởi cảm ứng phụ thuộc liều của độ chuẩn trung hòa virut kháng RSV A Long, đã được tạo ra bởi liều thấp nhất của Ad26.RSV.preF2.2 hoặc Ad35.RSV.preF2.2 được áp dụng (Hình 10E và 10F). Qua so sánh thống kê liều dùng của các độ chuẩn VNA A Long thể hiện rằng Ad26.RSV.preF2.2 sinh miễn dịch nhiều hơn so với Ad26.RSV.FA2 ($p=0,0414$), trong khi đó tạo ra độ chuẩn VNA khác biệt không đáng kể giữa Ad35.RSV.preF2.2 và Ad35.RSV.FA2.

Còn chứng minh rằng Ad26.RSV.preF và Ad35.RSV.preF không gây các dấu hiệu mô bệnh của Bệnh hô hấp tăng cường (ERD) sau thử thách RSV A2, ở bất kỳ trong số các nồng độ được thử. Chuột bông là mô hình được sử dụng và nghiên cứu nhiều nhất để theo dõi ERD. Ở mô hình động vật này, chủng ngừa với FI-RSV gây ERD một cách thống nhất sau thử thách RSV, mà nhìn thấy được bằng phân tích mô bệnh của phần phổi bị nhiễm đối với các thông số là chứng viêm túi phổi, cơ bản bao gồm xâm nhập bạch cầu trung hòa, và viêm phế quản, cơ bản gồm xâm nhập tế bào lympho. Ở chuột bông, điểm gây FI-RSV đối với các thông số này có thể quan sát từ ngày 1 sau khi tiêm RSV, và đỉnh điểm ở 4 đến 5 ngày sau thử thách RSV.

ERD được phân tích 5 ngày sau thử thách với RSV A2 bằng cách cho điểm 4 thông số của thử thách viêm phổi (viêm phế quản, viêm quanh mạch, viêm phổi mô kẽ, viêm túi phổi). Chủng ngừa với FI-RSV tạo ra điểm tăng cường đối với các chất đánh dấu mô học nhất, mà đặc biệt xuất hiện đối với viêm túi phổi (Hình 11), chất đánh dấu mà trước đây thể hiện là chất đánh dấu phân liệt nhất cho ERD. Không quan sát thấy tăng viêm túi phổi hoặc bất kỳ chất đánh dấu mô học ERD khác ở động vật được chủng ngừa bằng hoặc là Ad26.RSV.preF2.2 hoặc Ad35.RSV.preF2.2 trong chế độ chỉ mỗi sau thử thách RSV, ngay cả ở liều vacxin thấp có thể gây ái lực thấp và/hoặc mức kháng thể thấp (Hình 11). Điều này xác nhận kết quả trước đây của tác giả với các vector Ad26.RSV.FA2 và Ad35.RSV.FA2.

Theo sáng chế, do đó thể hiện rằng Ad26.RSV.preF và Ad35.RSV.preF là các vector adenovirut tiềm năng biểu hiện RSV F A2 mà được ổn định ở cấu trạng trước dung hợp. Các vector này tạo ra đáp ứng miễn dịch thể dịch và tế bào mạnh. Đáp ứng miễn dịch tạo ra là bảo vệ chống thử thách RSV A2 và đề xuất khoảng rộng trung hòa virut trong

ống nghiệm chống các thể phân lập lâm sàng và phòng thí nghiệm của RSV. Không quan sát thấy tạo ra ERD ở chuột bông sau khi phơi lộ RSV của các động vật được chủng ngừa và do đó xác nhận dữ liệu tạo ra với Ad26 và Ad35 mã hóa đối với kháng nguyên RSV F A2 kiểu đại. Không có chuột nhà hay chuột bông được thấy các dấu hiệu rõ ràng của khả năng gây phản ứng liên hệ miễn dịch sau khi tiêm hoặc là Ad26.RSV.preF hoặc Ad35.RSV.preF.

Bảng 1. Trình tự axit amin của protein F trước dung hợp RSV được mã hóa bởi phân tử axit nucleic theo sáng chế (các đột biến được gạch chân)

SEQ ID NO: 1: Trình tự axit amin RSV preF2.1:

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLGALRTG
WYTSVITIELSNIKEEIKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNN
RARRELPRFMNYTLNNAKKTNTLSKKRKRRLGFLGVSASIASGVAVSKVL
HLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLTISKVLDLKNYIDKQLLPIVNBKQSC
SIPNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITN
DQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLC
TTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTL
PSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNR
GIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNBKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVF
PSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAVKSTTNIMITTHIIVIVILLSLI
AVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIAFSN

SEQ ID NO: 2: Trình tự axit amin của RSV preF2.2:

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTG
WYTSVITIELSNIKEEIKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNN
RARRELPRFMNYTLNNAKKTNTLSKKRKRRLGFLGVSASIASGVAVSKVL
HLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLTISKVLDLKNYIDKQLLPIVNBKQSC
SIPNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITN
DQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLC
TTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTL
PSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNR
GIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNBKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVF
PSNEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAVKSTTNIMITTHIIVIVILLSLI
AVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIAFSN

Bảng 2. Trình tự nucleotit của phân tử axit nucleic được ưu tiên theo sáng chế

SEQ ID NO: 3: codon được tối ưu hóa axit nucleic mã hòa protein trước dung hợp RSV F pre-F2.1

PreF2.1

ATGGAGCTGCTGATCCTGAAGGCCAACGCCATCACCACCATCCTGAC
CGCCGTGACCTTCTGCTTCGCCAGCGGCCAGAACATCACCGAGGAGTTCTA
CCAGAGCACCTGCAGCGCCGTGAGCAAGGGCTACCTGGGCGCCCTGAGAA
CCGGCTGGTACACCAGCGTGATCACCATCGAGCTGAGCAACATCAAGGAGA
TCAAGTGCAACGGCACCGACGCCAAGGTGAAGCTGATCAAGCAGGAGCTG
GACAAGTACAAGAACGCCGTGACCGAGCTGCAGCTGCTGATGCAGAGCAC
CCCCGCCACCAACAACAGAGCCAGAAGAGAGCTGCCCAGATTCATGAACT
ACACCCTGAACAACGCCAAGAAGACCAACGTGACCCTGAGCAAGAAGAGA
AAGAGAAGATTCTGGGGCTTCCTGCTGGGCGTGGGCAGCGCCATCGCCAGC
GGCGTGGCCGTGAGCAAGGTGCTGCACCTGGAGGGCGAGGTGAACAAGAT
CAAGAGCGCCCTGCTGAGCACCAACAAGGCCGTGGTGAGCCTGAGCAACG
GCGTGAGCGTGCTGACCAGCAAGGTGCTGGACCTGAAGAACTACATCGACA
AGCAGCTGCTGCCCATCGTGAACAAGCAGAGCTGCAGCATCCCCAACATCG
AGACCGTGATCGAGTTCCAGCAGAAGAACAACAGACTGCTGGAGATCACC
AGAGAGTTCAGCGTGAACGCCGGCGTGACCACCCCCGTGAGCACCTACATG
CTGACCAACAGCGAGCTGCTGAGCCTGATCAACGACATGCCCATCACCAAC
GACCAGAAGAAGCTGATGAGCAACAACGTGCAGATCGTGAGACAGCAGAG
CTACAGCATCATGAGCATCATCAAGGAGGAGGTGCTGGCCTACGTGGTGCA
GCTGCCCCCTGTACGGCGTGATCGACACCCCCTGCTGGAAGCTGCACACCAG
CCCCCTGTGCACCACCAACACCAAGGAGGGCAGCAACATCTGCCTGACCAG
AACCGACAGAGGCTGGTACTGCGACAACGCCGGCAGCGTGAGCTTCTTCCC
CCAGGCCGAGACCTGCAAGGTGCAGAGCAACAGAGTGTTCTGCGACACCAT
GAACAGCCTGACCCTGCCCAGCGAGGTGAACCTGTGCAACGTGGACATCTT
CAACCCCAAGTACGACTGCAAGATCATGACCAGCAAGACCGACGTGAGCA
GCAGCGTGATCACCAGCCTGGGCGCCATCGTGAGCTGCTACGGCAAGACCA
AGTGCAACCGCCAGCAACAAGAACAGAGGCATCATCAAGACCTTCAGCAAC
GGCTGCGACTACGTGAGCAACAAGGGCGTGAGACACCGTGAGCGTGGGCAA
CACCCTGTACTACGTGAACAAGCAGGAGGGCAAGAGCCTGTACGTGAAGG
GCGAGCCCATCATCAACTTCTACGACCCCCTGGTGTTCCCCAGCGACGAGTT
CGACGCCAGCATCAGCCAGGTGAACGAGAAGATCAACCAGAGCCTGGCCT
TCATCAGAAAGAGCGACGAGCTGCTGCACAACGTGAACGCCGTGAAGAGC
ACCACCAACATCATGATCACCACCATCATCATCGTGATCATCGTGATCCTGC

TGAGCCTGATCGCCGTGGGCCTGCTGCTGTACTGCAAGGCCAGAAGCACCC
CCGTGACCCTGAGCAAGGACCAGCTGAGCGGCATCAACAACATCGCCTTCA
GCAACTGA

SEQ ID NO: 4: codon được tối ưu hóa axit nucleic mã hòa protein trước dung hợp
RSV F pre-F2.2

PreF2.2

ATGGAGCTGCTGATCCTGAAGGCCAACGCCATCACCACCATCCTGAC
GCGCGTGACCTTCTGCTTCGCCAGCGGCCAGAACATCACCGAGGAGTTCTA
CCAGAGCACCTGCAGCGCCGTGAGCAAGGGCTACCTGAGCGCCCTGAGAA
CCGGCTGGTACACCAGCGTGATCACCATCGAGCTGAGCAACATCAAGGAGA
TCAAGTGCAACGGCACCGACGCCAAGGTGAAGCTGATCAAGCAGGAGCTG
GACAAGTACAAGAACGCCGTGACCGAGCTGCAGCTGCTGATGCAGAGCAC
CCCCGCCACCAACAACAGAGCCAGAAGAGAGCTGCCCAGATTCATGAACT
ACACCCTGAACAACGCCAAGAAGACCAACGTGACCCTGAGCAAGAAGAGA
AAGAGAAGATTCTGCGCTTCCTGCTGGGCGTGCGCAGCGCCATCGCCAGC
GGCGTGGCCGTGAGCAAGGTGCTGCACCTGGAGGGCGAGGTGAACAAGAT
CAAGAGCGCCCTGCTGAGCACCAACAAGGCCGTGGTGAGCCTGAGCAACG
GCGTGAGCGTGCTGACCAGCAAGGTGCTGGACCTGAAGAACTACATCGACA
AGCAGCTGCTGCCCATCGTGAACAAGCAGAGCTGCAGCATCCCCAACATCG
AGACCGTGATCGAGTTCCAGCAGAAGAACAACAGACTGCTGGAGATCACC
AGAGAGTTCAGCGTGAACGCCGGCGTGACCACCCCCGTGAGCACCTACATG
CTGACCAACAGCGAGCTGCTGAGCCTGATCAACGACATGCCCATCACCAAC
GACCAGAAGAAGCTGATGAGCAACAACGTGCAGATCGTGAGACAGCAGAG
CTACAGCATCATGAGCATCATCAAGGAGGAGGTGCTGGCCTACGTGGTGCA
GCTGCCCCCTGTACGGCGTGATCGACACCCCCTGCTGGAAGCTGCACACCAG
CCCCCTGTGCACCACCAACACCAAGGAGGGCAGCAACATCTGCCTGACCAG
AACCGACAGAGGCTGGTACTGCGACAACGCCGGCAGCGTGAGCTTCTTCCC
CCAGGCCGAGACCTGCAAGGTGCAGAGCAACAGAGTGTTCTGCGACACCAT
GAACAGCCTGACCCTGCCCAGCGAGGTGAACCTGTGCAACGTGGACATCTT
CAACCCCAAGTACGACTGCAAGATCATGACCAGCAAGACCGACGTGAGCA
GCAGCGTGATCACCAGCCTGGGCGCCATCGTGAGCTGCTACGGCAAGACCA

AGTGCACCGCCAGCAACAAGAACAGAGGCATCATCAAGACCTTCAGCAAC
GGCTGCGACTACGTGAGCAACAAGGGCGTGGACACCGTGAGCGTGGGCAA
CACCTGTACTACGTGAACAAGCAGGAGGGCAAGAGCCTGTACGTGAAGG
GCGAGCCCATCATCAACTTCTACGACCCCCTGGTGTTCCTCCAGCAACGAGTT
CGACGCCAGCATCAGCCAGGTGAACGAGAAGATCAACCAGAGCCTGGCCT
TCATCAGAAAGAGCGACGAGCTGCTGCACAACGTGAACGCCGTGAAGAGC
ACCACCAACATCATGATCACCACCATCATCATCGTGATCATCGTGATCCTGC
TGAGCCTGATCGCCGTGGGCCTGCTGCTGTACTGCAAGGCCAGAAGCACCC
CCGTGACCCTGAGCAAGGACCAGCTGAGCGGCATCAACAACATCGCCTTCA
GCAACTGA

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phân tử axit nucleic mã hóa protein F của virus hợp bào hô hấp (RSV - respiratory syncytial virus), bao gồm trình tự polynucleotit có SEQ ID NO: 3 hoặc 4.
2. Vector adenovirus tái tổ hợp ở người bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa protein F của virus hợp bào hô hấp (RSV) có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2, trong đó adenovirus tái tổ hợp ở người có sự loại bỏ trong vùng E1, loại bỏ trong vùng E3, hoặc loại bỏ trong cả hai vùng E1 và E3 của bộ gen adenovirus.
3. Vector adenovirus tái tổ hợp ở người theo điểm 2, trong đó axit nucleic mã hóa protein F của RSV là codon được tối ưu hóa để biểu hiện trong tế bào của người.
4. Vector adenovirus tái tổ hợp ở người theo điểm 2, trong đó axit nucleic mã hóa protein F của RSV bao gồm trình tự axit nucleic có SEQ ID NO: 3 hoặc 4.
5. Vector theo điểm 2, trong đó adenovirus tái tổ hợp ở người là của kiểu huyết thanh 26 hoặc 35.
6. Vector theo điểm 2, trong đó adenovirus tái tổ hợp ở người có bộ gen bao gồm trình tự polynucleotit CTATCTAT (SEQ ID NO: 7) ở đầu tận cùng 5' của nó.
7. Dược phẩm bao gồm phân tử axit nucleic theo điểm 1.
8. Dược phẩm bao gồm vector theo điểm 2.
9. Tế bào chủ được phân lập chứa phân tử axit nucleic mã hóa protein F của RSV theo điểm 1.
10. Phương pháp điều chế vắc xin kháng virus hợp bào hô hấp (RSV), bao gồm việc tạo ra adenovirus tái tổ hợp ở người mà chứa axit nucleic mã hóa protein F của RSV trước dung hợp, nhân giống adenovirus tái tổ hợp này trong môi trường nuôi cấy tế bào chủ, phân lập và tinh chế adenovirus tái tổ hợp, và bào chế adenovirus tái tổ hợp trong chế phẩm dược dụng, trong đó protein F của RSV trước dung hợp bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1 hoặc 2, trong đó adenovirus tái tổ hợp ở người có sự loại bỏ trong vùng E1, loại bỏ trong vùng E3, hoặc loại bỏ trong cả hai vùng E1 và E3 của bộ gen adenovirus.

11. Axit nucleic tái tổ hợp được phân lập mà tạo ra bộ gen của adenovirut tái tổ hợp ở người mà chứa axit nucleic mã hóa protein F của RSV trước dung hợp, bao gồm trình tự axit nucleic có SEQ ID NO: 3 hoặc 4.

12. Tế bào chủ được phân lập bao gồm vectơ adenovirut tái tổ hợp ở người theo điểm 2.

13. Dược phẩm bao gồm vectơ adenovirut tái tổ hợp ở người theo điểm 4.

14. Vectơ theo điểm 2, trong đó protein F của RSV có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2.

15. Phương pháp theo điểm 10, trong đó protein F của RSV có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2.

16. Vectơ adenovirut tái tổ hợp ở người chứa trình tự polynucleotit mã hóa protein F của virut hợp bào hô hấp (RSV) có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2.

17. Vectơ theo điểm 16, trong đó adenovirut tái tổ hợp ở người là kiểu huyết thanh 26 hoặc 35.

18. Vectơ theo điểm 16, trong đó adenovirut tái tổ hợp ở người có bộ gen bao gồm trình tự polynucleotit CTATCTAT (SEQ ID NO: 7) ở đầu tận cùng 5' của nó.

19. Dược phẩm chứa vectơ theo điểm 16.

20. Tế bào chủ được phân lập bao gồm vectơ adenovirut tái tổ hợp ở người theo điểm 16.

21. Phương pháp điều chế vaccin kháng virut hợp bào hô hấp (RSV), bao gồm việc nhân giống vectơ adenovirut tái tổ hợp ở người theo điểm 16 trong môi trường nuôi cấy tế bào chủ, phân lập và tinh chế vectơ adenovirut tái tổ hợp ở người, và bào chế vectơ adenovirut tái tổ hợp ở người trong chế phẩm dược dụng.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> CruceCell Holland B.V.

<120> PHÂN TỬ AXIT NUCLEIC MÃ HÓA PROTEIN F CỦA VIRUT HỢP BÀO HỒ HẤP (RSV), VECTƠ ADENOVIRUT TÁI TỔ HỢP Ở NGƯỜI, DƯỢC PHẨM, TẾ BÀO CHỦ ĐƯỢC PHÂN LẬP, VÀ PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ VACCIN

<130> 0270 EP P00 PRI

<140> EP16163807

<141> 2015-04-05

<160> 4

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 574

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của RSV preF2.1

<400> 1

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

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

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Gly 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 Ile 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 Ser Lys Val Leu His Leu
 145 150 155 160

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

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

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

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

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

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

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

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

Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro

290		295		300
Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro				
305		310		315 320
Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg				
	325		330	335
Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe				
	340		345	350
Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp				
	355		360	365
Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val				
	370		375	380
Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr				
385		390		395 400
Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys				
	405		410	415
Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile				
	420		425	430
Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp				
	435		440	445
Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly				
	450		455	460
Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro				
465		470		475 480
Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn				
	485		490	495

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

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

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

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

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

<210> 2
 <211> 574
 <212> PRT
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự axit amin của RSV preF2.2

<400> 2

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 Ile 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 Ser Lys Val Leu His Leu
 145 150 155 160

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

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

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

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

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

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

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

Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile

275										280					285				
Met	Ser	Ile	Ile	Lys	Glu	Glu	Val	Leu	Ala	Tyr	Val	Val	Gln	Leu	Pro				
	290					295					300								
Leu	Tyr	Gly	Val	Ile	Asp	Thr	Pro	Cys	Trp	Lys	Leu	His	Thr	Ser	Pro				
305					310					315					320				
Leu	Cys	Thr	Thr	Asn	Thr	Lys	Glu	Gly	Ser	Asn	Ile	Cys	Leu	Thr	Arg				
				325					330					335					
Thr	Asp	Arg	Gly	Trp	Tyr	Cys	Asp	Asn	Ala	Gly	Ser	Val	Ser	Phe	Phe				
			340					345					350						
Pro	Gln	Ala	Glu	Thr	Cys	Lys	Val	Gln	Ser	Asn	Arg	Val	Phe	Cys	Asp				
		355					360					365							
Thr	Met	Asn	Ser	Leu	Thr	Leu	Pro	Ser	Glu	Val	Asn	Leu	Cys	Asn	Val				
	370					375					380								
Asp	Ile	Phe	Asn	Pro	Lys	Tyr	Asp	Cys	Lys	Ile	Met	Thr	Ser	Lys	Thr				
385					390					395					400				
Asp	Val	Ser	Ser	Ser	Val	Ile	Thr	Ser	Leu	Gly	Ala	Ile	Val	Ser	Cys				
				405					410					415					
Tyr	Gly	Lys	Thr	Lys	Cys	Thr	Ala	Ser	Asn	Lys	Asn	Arg	Gly	Ile	Ile				
			420					425					430						
Lys	Thr	Phe	Ser	Asn	Gly	Cys	Asp	Tyr	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Val	Asp				
		435					440					445							
Thr	Val	Ser	Val	Gly	Asn	Thr	Leu	Tyr	Tyr	Val	Asn	Lys	Gln	Glu	Gly				
	450					455					460								
Lys	Ser	Leu	Tyr	Val	Lys	Gly	Glu	Pro	Ile	Ile	Asn	Phe	Tyr	Asp	Pro				
465					470					475					480				

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

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

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

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

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

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

<210> 3

<211> 1725

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> bộ ba mã mã hóa axit nucleic mã hóa protein trước dung hợp RSV F pre-F2.1

<400> 3

atggagctgc tgatcctgaa ggccaacgcc atcaccacca tcctgaccgc cgtgaccttc	60
tgcttcgcca gcggccagaa catcaccgag gaggctctacc agagcacctg cagcgccgtg	120
agcaagggct acctggggcg cctgagaacc ggctgggtaca ccagcgtgat caccatcgag	180
ctgagcaaca tcaaggagat caagtgaac ggcaccgacg ccaaggtgaa gctgatcaag	240
caggagctgg acaagtacaa gaacgccgtg accgagctgc agctgctgat gcagagcacc	300
cccgccacca acaacagagc cagaagagag ctgcccagat tcatgaacta caccctgaac	360
aacgccaaga agaccaacgt gaccctgagc aagaagagaa agagaagatt cctgggcttc	420
ctgctggggcg tgggcagcgc catcgccagc ggcgtggccg tgagcaaggt gctgcacctg	480

```

gagggcgagg tgaacaagat caagagcgcc ctgctgagca ccaacaaggc cgtggtgagc      540
ctgagcaacg gcgtgagcgt gctgaccagc aaggtgctgg acctgaagaa ctacatcgac      600
aagcagctgc tgcccatcgt gaacaagcag agctgcagca tccccaacat cgagaccgtg      660
atcgagttcc agcagaagaa caacagactg ctggagatca ccagagagtt cagcgtgaac      720
gccggcgtga ccacccccgt gagcacctac atgctgacca acagcgagct gctgagcctg      780
atcaacgaca tgcccatcac caacgaccag aagaagctga tgagcaacaa cgtgcagatc      840
gtgagacagc agagctacag catcatgagc atcatcaagg aggaggtgct ggcctacgtg      900
gtgcagctgc ccctgtacgg cgtgatcgac accccctgct ggaagctgca caccagcccc      960
ctgtgcacca ccaacaccaa ggagggcagc aacatctgcc tgaccagaac cgacagaggc     1020
tggtactgcg acaacgccgg cagcgtgagc ttcttcccc aggccgagac ctgcaaggctg     1080
cagagcaaca gagtgttctg cgacaccatg aacagcctga ccctgcccag cgaggtgaac     1140
ctgtgcaacg tggacatctt caaccccaag tacgactgca agatcatgac cagcaagacc     1200
gacgtgagca gcagcgtgat caccagcctg ggcgccatcg tgagctgcta cggcaagacc     1260
aagtgcaccg ccagcaacaa gaacagaggc atcatcaaga cttcagcaa cggctgcgac     1320
tacgtgagca acaagggcgt ggacaccgtg agcgtgggca acaccctgta ctacgtgaac     1380
aagcaggagg gcaagagcct gtacgtgaag ggcgagccca tcatcaactt ctacgacccc     1440
ctggtgttcc ccagcgacga gttcgacgcc agcatcagcc aggtgaacga gaagatcaac     1500
cagagcctgg cttcatcag aaagagcgac gagctgctgc acaacgtgaa cgccgtgaag     1560
agcaccacca acatcatgat caccaccatc atcatcgtga tcatcgtgat cctgctgagc     1620
ctgatcgccg tgggcctgct gctgtactgc aaggccagaa gcacccccgt gaccctgagc     1680
aaggaccagc tgagcggcat caacaacatc gccttcagca actga                        1725

```

<210> 4

<211> 1725

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

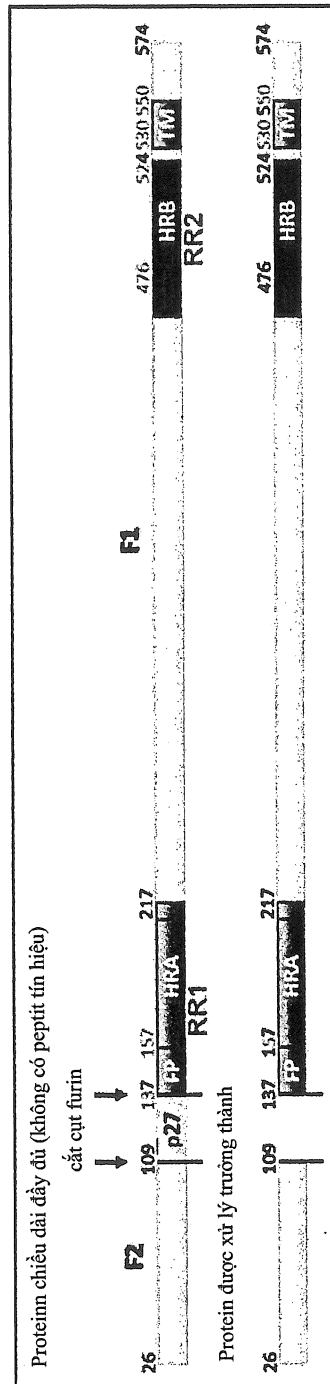
<223> bộ ba mã mã hóa axit nucleic mã hóa protein trước dung hợp RSV F pre-F2.2

```

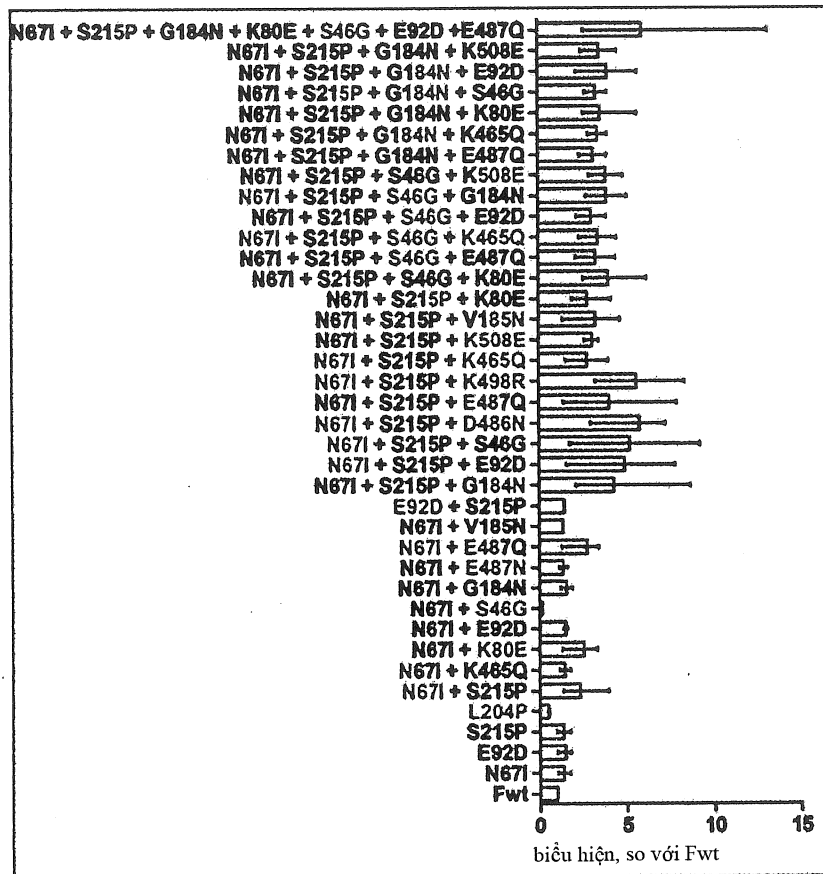
<400> 4
atggagctgc tgatcctgaa ggccaacgcc atcaccacca tcctgaccgc cgtgaccttc      60
tgcttcgcca gcggccagaa catcaccgag gagttctacc agagcacctg cagcgccgtg      120
agcaagggct acctgagcgc cctgagaacc ggctggtaca ccagcgtgat caccatcgag      180
ctgagcaaca tcaaggagat caagtgaac ggcaccgacg ccaagggtgaa gctgatcaag      240
caggagctgg acaagtacaa gaacgccgtg accgagctgc agctgctgat gcagagcacc      300
cccgccacca acaacagagc cagaagagag ctgccagat tcatgaacta caccctgaac      360
aacgccaaga agaccaacgt gaccctgagc aagaagagaa agagaagatt cctgggcttc      420
ctgctgggcg tgggcagcgc catcgccagc ggcgtggccg tgagcaagggt gctgcacctg      480
gagggcgagg tgaacaagat caagagcgcc ctgctgagca ccaacaaggc cgtggtgagc      540
ctgagcaacg gcgtgagcgt gctgaccagc aagggtgctgg acctgaagaa ctacatcgac      600
aagcagctgc tgcccatcgt gaacaagcag agctgcagca tccccaacat cgagaccgtg      660
atcgagttcc agcagaagaa caacagactg ctggagatca ccagagagtt cagcgtgaac      720
gccggcgtga ccacccccgt gagcacctac atgctgacca acagcgagct gctgagcctg      780
atcaacgaca tgcccatcac caacgaccag aagaagctga tgagcaacaa cgtgcagatc      840
gtgagacagc agagctacag catcatgagc atcatcaagg aggagggtgct ggcctacgtg      900
gtgcagctgc ccctgtacgg cgtgatcgac accccctgct ggaagctgca caccagcccc      960
ctgtgcacca ccaacaccaa ggagggcagc aacatctgcc tgaccagaac cgacagaggc     1020
tggtactgcg acaacgccgg cagcgtgagc ttcttcccc aggccgagac ctgcaagggtg     1080
cagagcaaca gagtgttctg cgacaccatg aacagcctga ccctgcccag cgagggtgaac     1140
ctgtgcaacg tggacatctt caacccaag tacgactgca agatcatgac cagcaagacc     1200
gacgtgagca gcagcgtgat caccagcctg ggcgccatcg tgagctgcta cggcaagacc     1260
aagtgcaccg ccagcaacaa gaacagaggc atcatcaaga ccttcagcaa cggctgcgac     1320
tacgtgagca acaagggcgt ggacaccgtg agcgtgggca acaccctgta ctacgtgaac     1380
aagcaggagg gcaagagcct gtacgtgaag ggcgagccca tcatcaactt ctacgacccc     1440

```

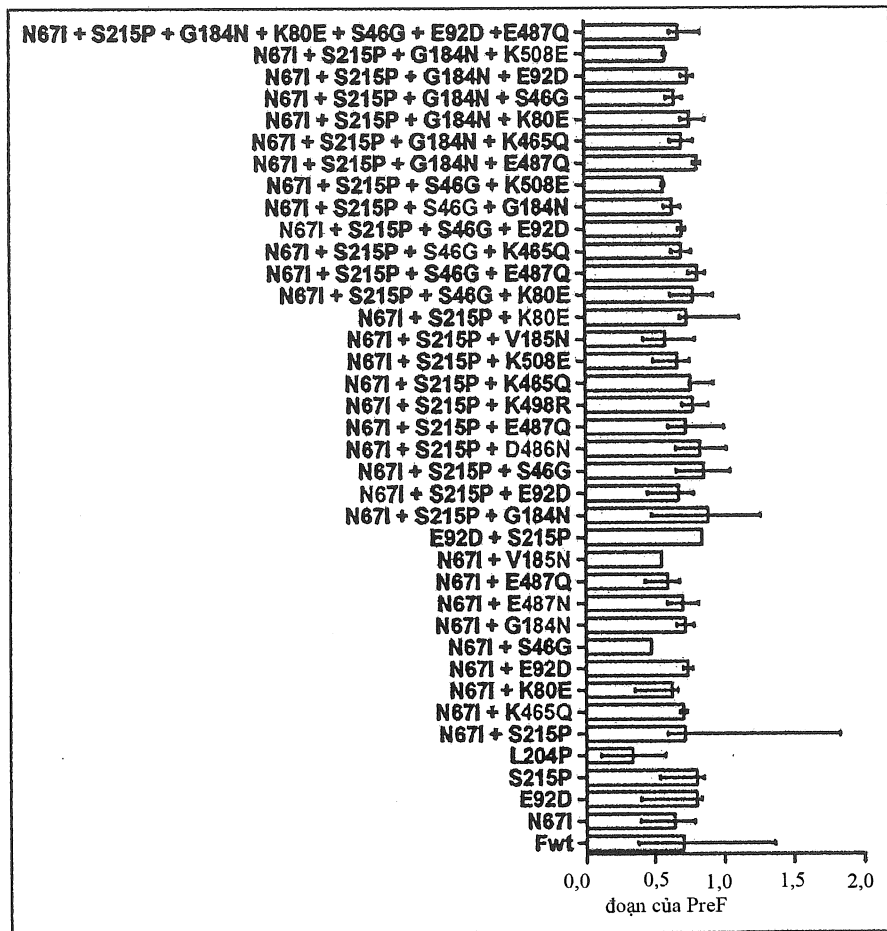
ctggtgttcc ccagcaacga gttcgacgcc agcatcagcc aggtgaacga gaagatcaac	1500
cagagcctgg ccttcatcag aaagagcgac gagctgctgc acaacgtgaa cgccgtgaag	1560
agcaccacca acatcatgat caccaccatc atcatcgtga tcatcgtgat cctgctgagc	1620
ctgatcgccg tgggcctgct gctgtactgc aaggccagaa gcacccccgt gaccctgagc	1680
aaggaccagc tgagcgcat caacaacatc gccttcagca actga	1725



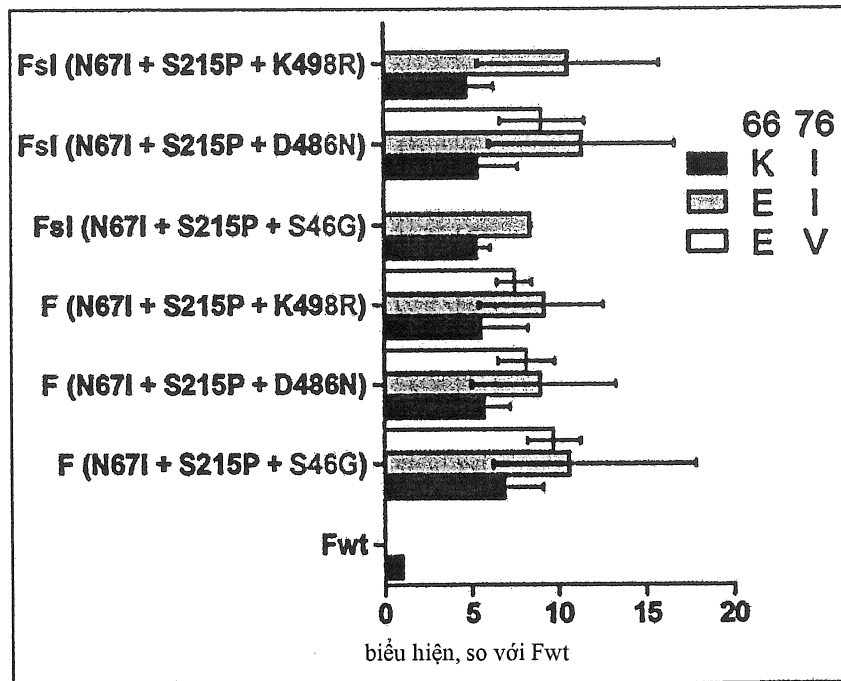
HÌNH 1



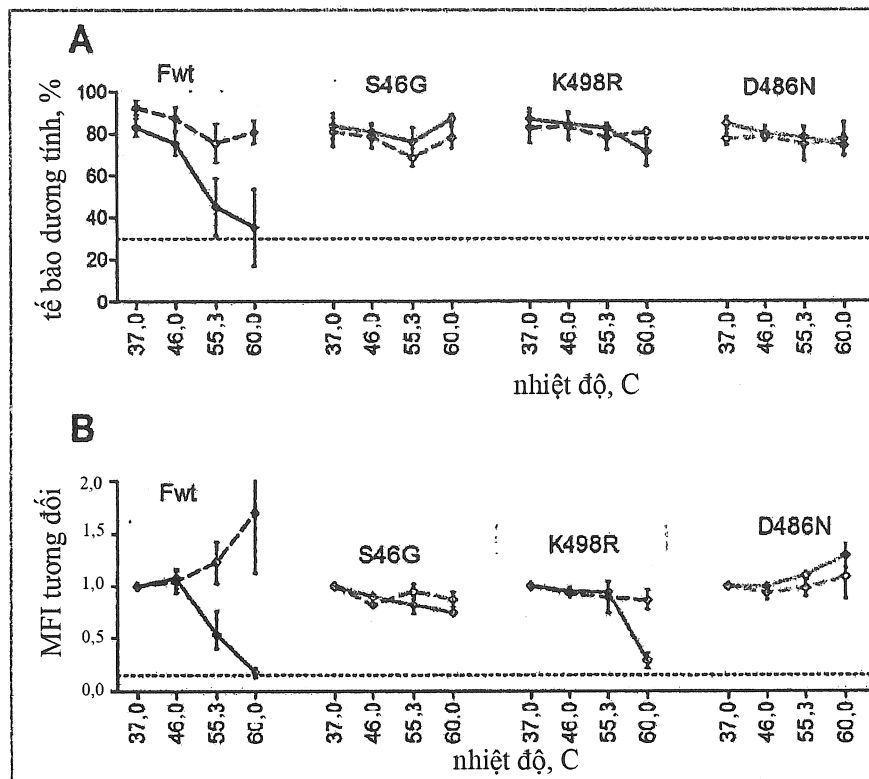
HÌNH 2



HÌNH 3

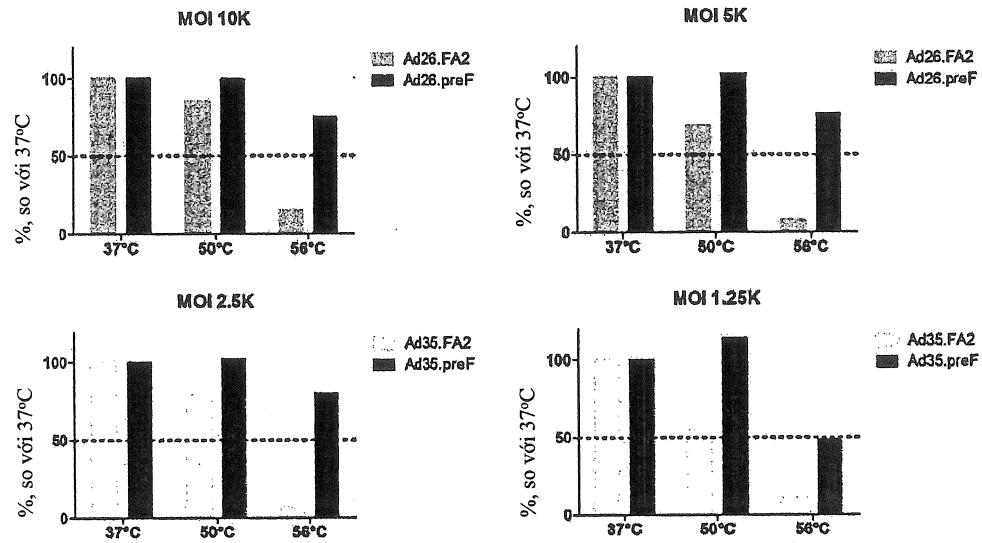


HÌNH 4

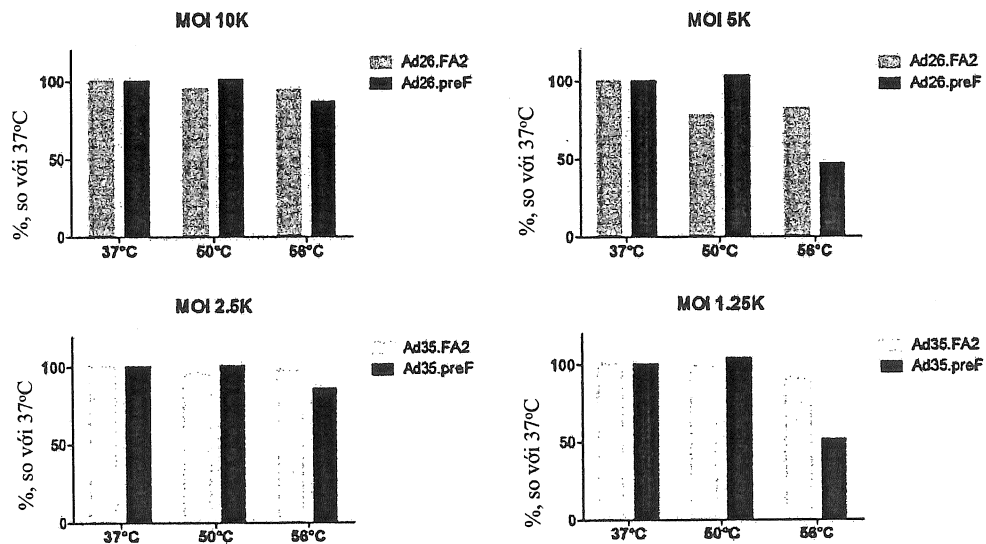


HÌNH 5

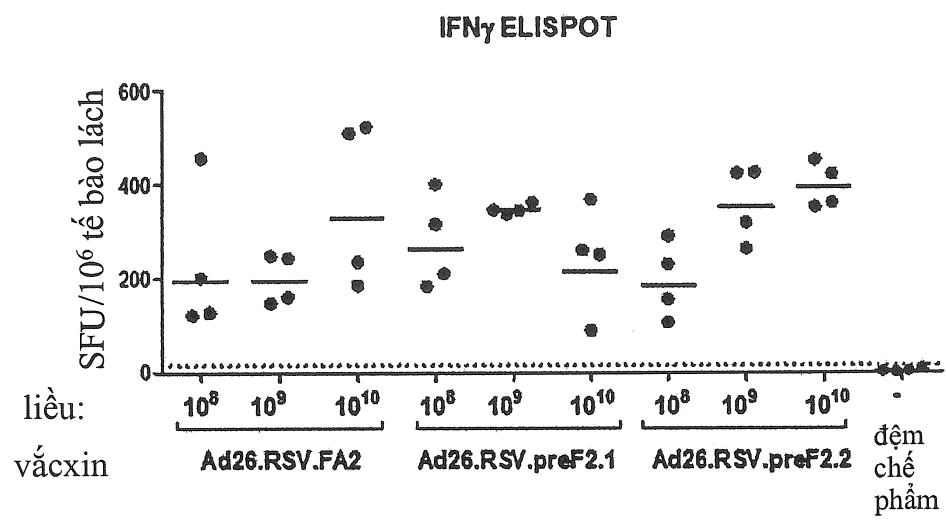
% tế bào với F trước dung hợp



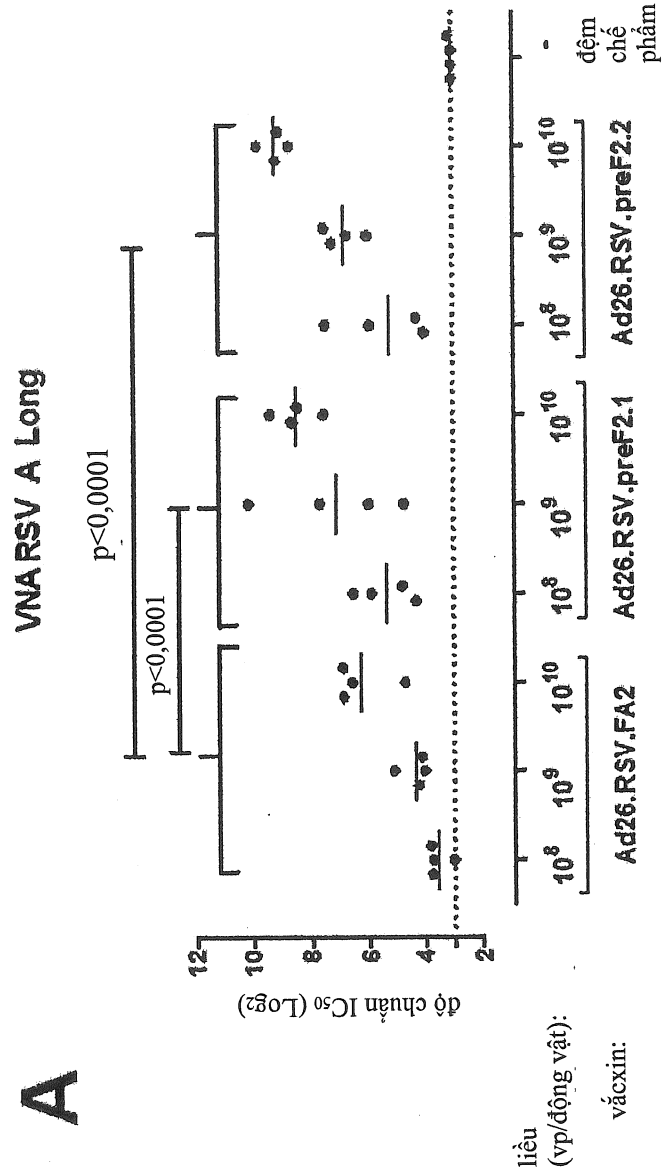
% tế bào với F tổng



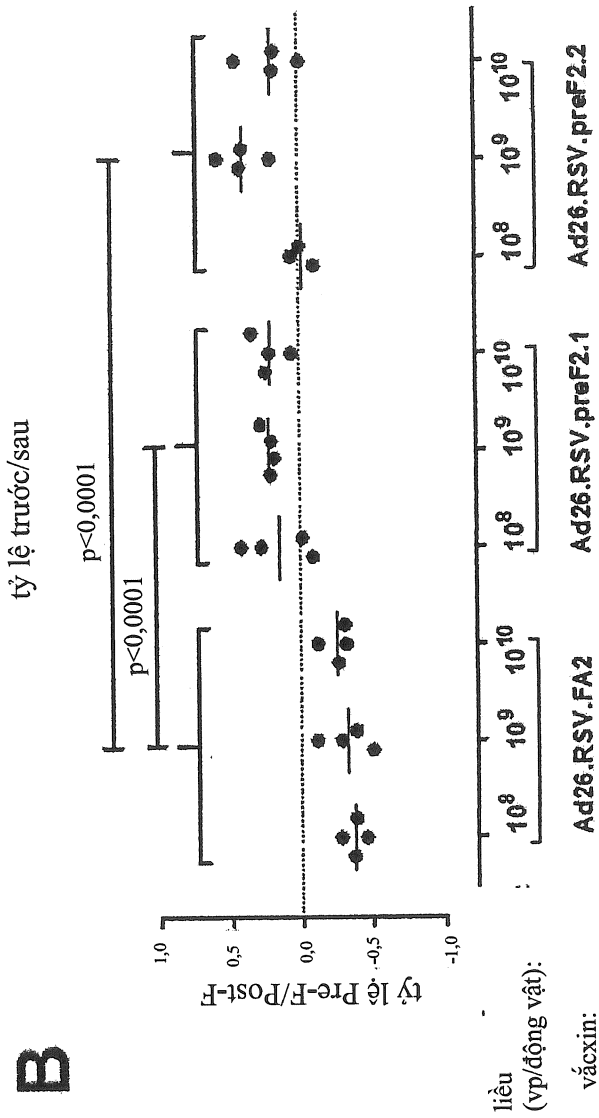
HÌNH 6



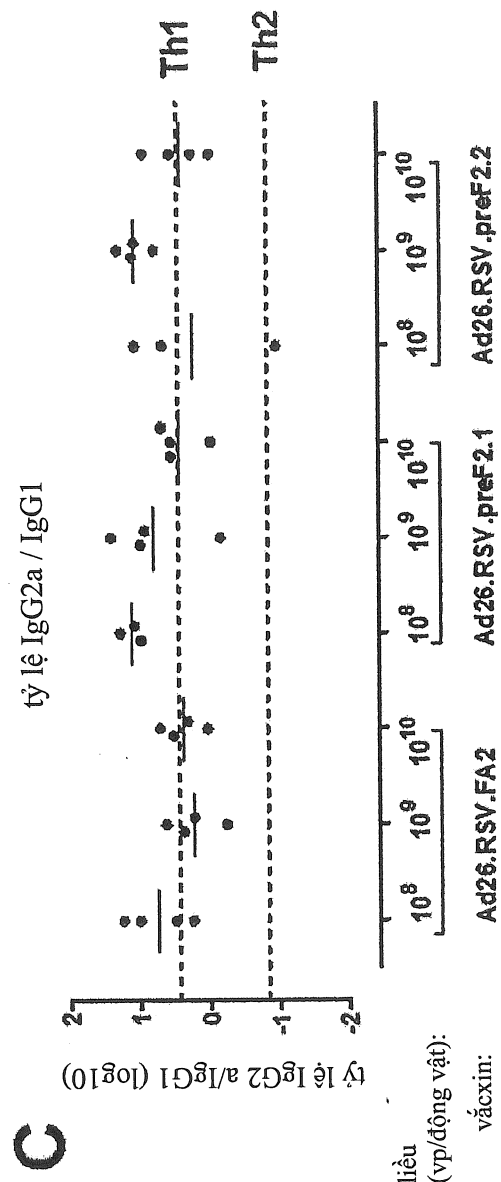
HÌNH 7



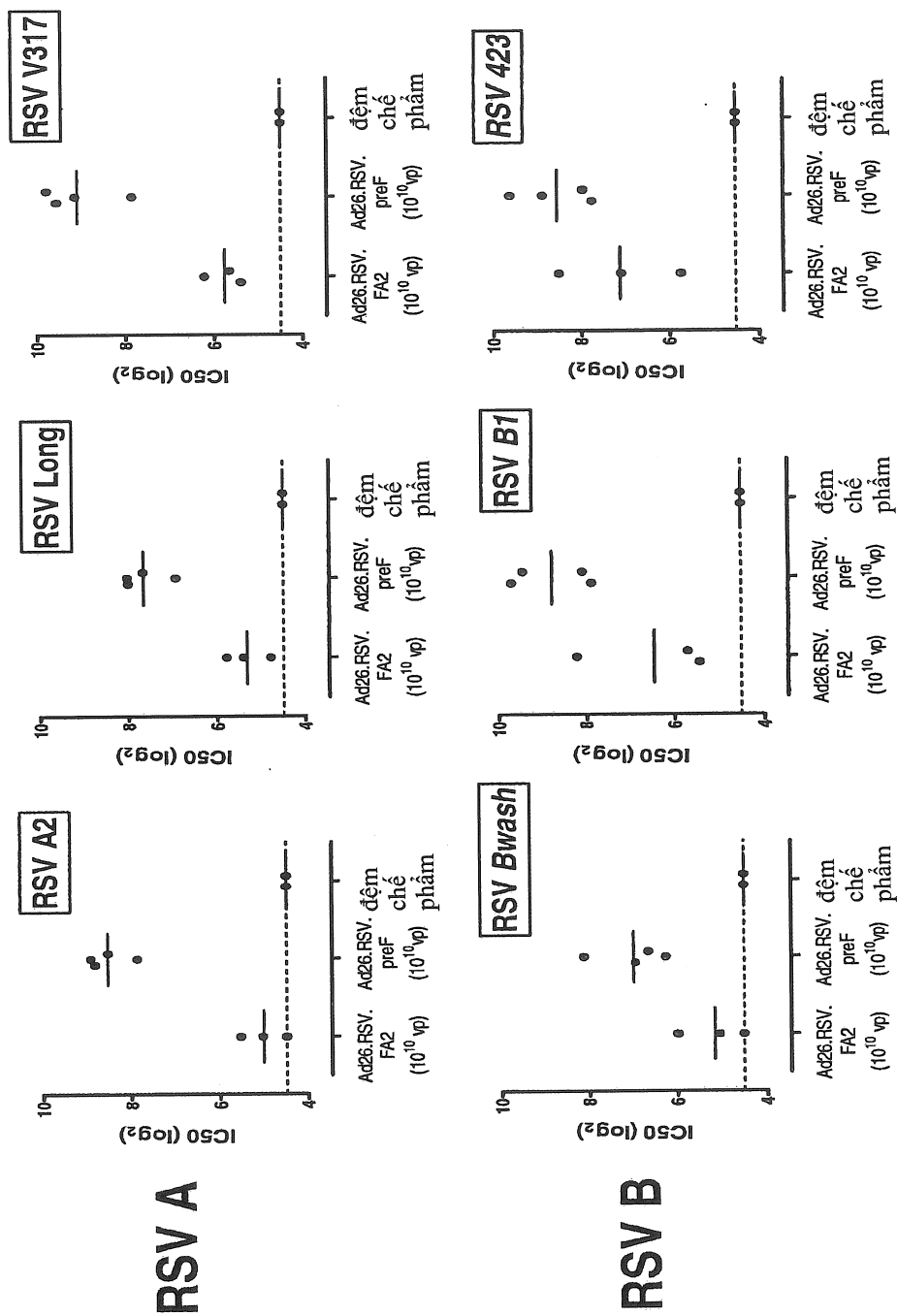
HÌNH 8



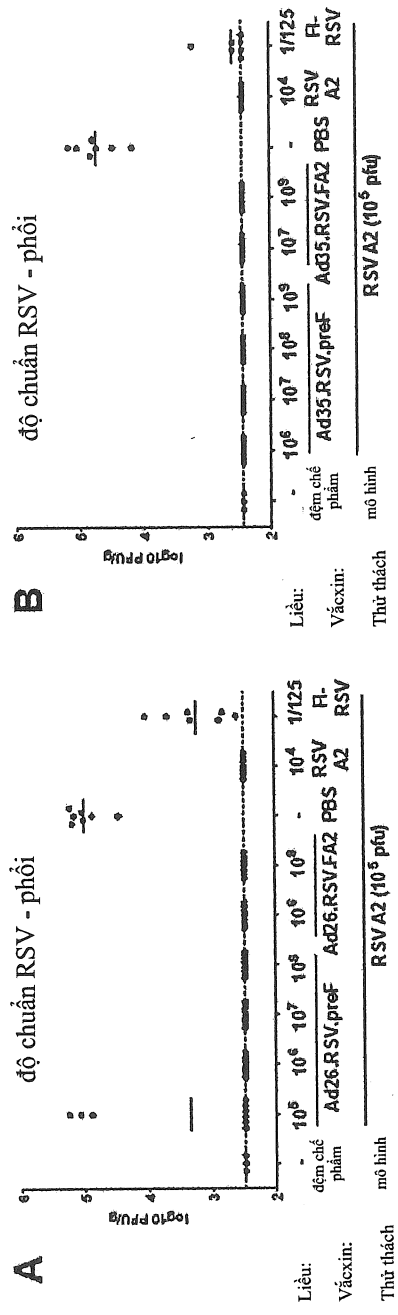
HÌNH 8 - tiếp



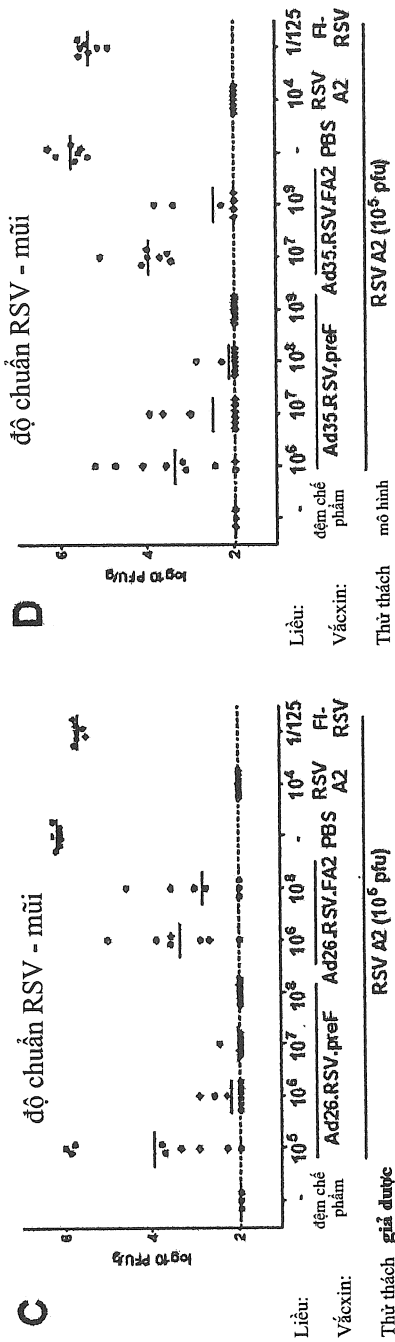
HÌNH 8 - tiếp



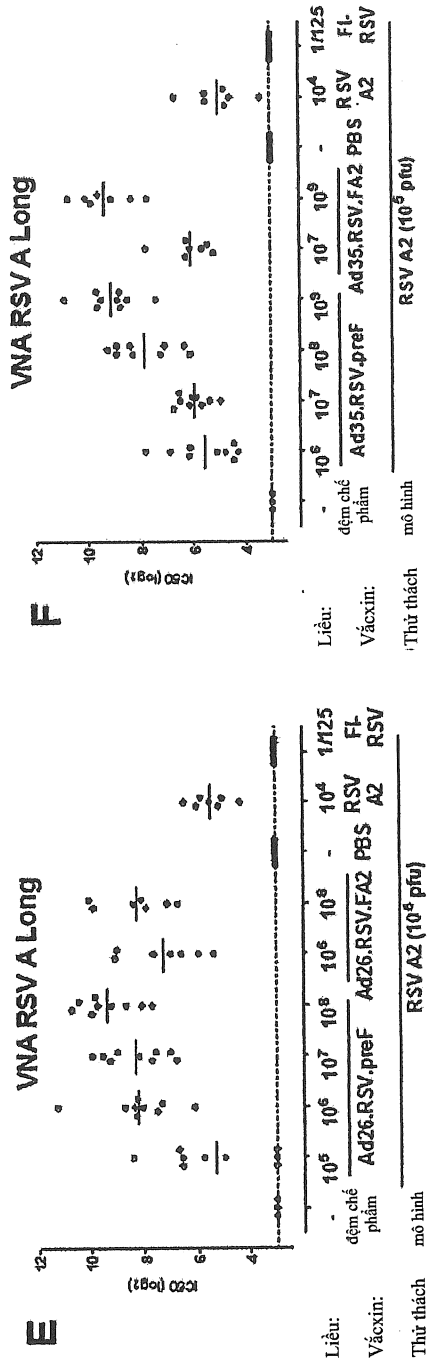
HÌNH 9



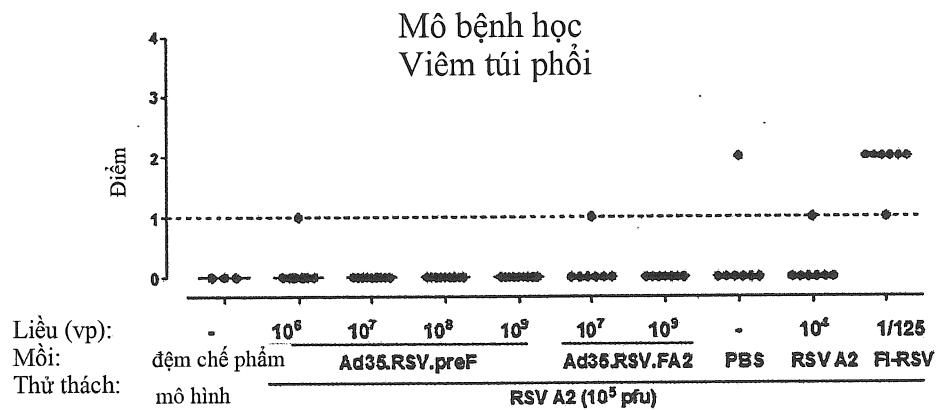
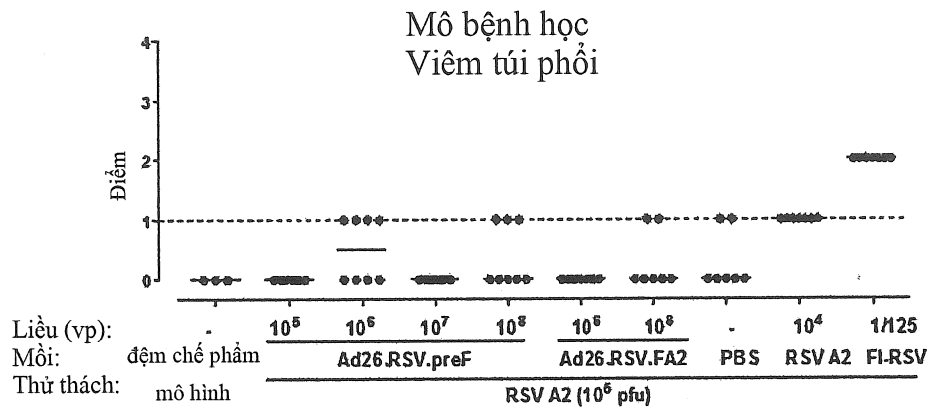
HÌNH 10



HÌNH 10 - tiếp



HÌNH 10 - tiếp



HÌNH 11