



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

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



1-0034886

(51)⁷ C07K 14/11; A61P 31/16; C12N 15/63; (13) B
C12N 15/44; A61K 39/145

(21) 1-2014-02984

(22) 08/02/2013

(86) PCT/US2013/025284 08/02/2013

(87) WO/2013/122827 22/08/2013

(30) 61/597,998 13/02/2012 US

(45) 27/02/2023 419

(43) 25/03/2015 324A

(73) UNIVERSITY OF PITTSBURGH-OF THE COMMONWEALTH SYSTEM OF
HIGHER EDUCATION (US)

200 Gardner Steel Conference Center, Thackeray and O'Hara Streets, Pittsburgh, PA
15260, United States of America

(72) Ted M. ROSS (US); Corey J. CREVAR (US); Brendan M. GILES (US).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) POLYPEPTIT NGỪNG KẾT TỎ HỒNG CẦU CÚM TÁI TỔ HỢP VÀ DUỢC
PHẨM CHỨA POLYPEPTIT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến sự tạo ra polypeptit HA cúm H5N1 được tối ưu hóa để kích thích phản ứng miễn dịch phản ứng rộng đối với thể phân lập virus cúm. Các polypeptit HA được tối ưu hóa đã được phát triển thông qua một loạt sự sắp thẳng hàng protein HA, và sau đó tạo ra các trình tự liên ứng, dựa vào thể phân lập của H5N1 ở người và ở chim. Sáng chế đề xuất polypeptit HA cúm H5N1 được tối ưu hóa, và các hợp phần, các protein dung hợp và các VLP chứa polypeptit HA. Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất trình tự axit nucleic được tối ưu hóa codon mã hóa polypeptit HA. Sáng chế còn đề xuất các phương pháp để kích thích phản ứng miễn dịch chống lại virus cúm ở đối tượng.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các protein ngưng kết tổ hồng cầu cúm được tối ưu hóa mà kích thích các phản ứng miễn dịch phản ứng rộng đối với các virus cúm H5N1 ở người và chim, và dùng chúng làm vắc-xin.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Virus cúm là thành viên của họ *Orthomyxoviridae*. Có ba kiểu phụ của virus cúm, được gọi là cúm A, cúm B, và cúm C. Virion cúm chứa hệ gen ARN chiều âm bị phân mảnh, làm mã hóa các protein sau: ngưng kết tổ hồng cầu (HA), neuraminidaza (NA), chất nền (M1), protein kênh ion proton (M2), nucleoprotein (NP), protein nền polymeraza 1 (PB1), protein nền polymeraza 2 (PB2), protein axit polymeraza (PA), và protein không cấu trúc 2 (NS2). HA, NA, M1, và M2 là protein có liên quan đến màng, trong khi NP, PB1, PB2, PA, và NS2 là các protein liên quan đến capsit nhân. Protein M1 là protein dư thừa nhất trong các hạt cúm. Các protein HA và NA là các glycoprotein vỏ, chịu trách nhiệm để gắn virus và thâm các hạt virus vào trong tế bào, và các nguồn của các epitop trội miễn dịch chính để trung hòa virus và miễn dịch bảo vệ. Cả hai protein HA và NA được xem là các thành phần quan trọng nhất đối với vắc-xin phòng bệnh cúm.

Mỗi năm, chỉ ở Mỹ, bệnh cúm theo mùa khiến cho trên 300.000 người đi viện và 36.000 người chết (Simonsen *et al.*, *Lancet Infect Dis* 7:658-66, 2007). Năm 2009, sự cấp bách của virus cúm H1N1 mới đã chứng tỏ dịch cúm lớn có thể bùng phát nhanh trên thế giới như thế nào.

Hiện có hai vắc-xin cúm được cấp li-xăng ở Mỹ - vắc-xin tách ra, được làm bất hoạt và vắc-xin virus sống bị làm giảm độc lực. Các vắc-xin được làm bất hoạt có thể kích thích một cách hiệu quả các phản ứng miễn dịch thể dịch mà thông thường chỉ là các phản ứng miễn dịch tế bào kém. Các vắc-xin virus sống không thể áp dụng được cho các bệnh nhân bị suy giảm miễn dịch hoặc bệnh nhân có thai do nguy cơ nhiễm khuẩn tăng của họ. Như vậy, vẫn cần phải có vắc-xin virus cúm bảo vệ rộng.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Được bộc lộ ở đây là sự tạo ra polypeptit HA H5N1 được tối ưu hóa bằng máy tính để kích thích phản ứng miễn dịch phản ứng rộng đối với virus cúm H5N1. Các polypeptit HA được tối ưu hóa đã phát triển thông qua một loạt sự sắp hàng protein HA, và sự tạo ra sau đó của các trình tự liên ứng dựa vào 1.989 thể phân lập cúm H5N1 ở người và ở chim.

Được đề xuất ở đây là các polypeptit HA cúm tái tổ hợp có trình tự axit amin được tối ưu hóa để kích thích phản ứng miễn dịch phản ứng rộng chống lại cúm H5N1. Theo một số phương án, polypeptit HA chứa trình tự axit amin ít nhất 99,8% giống hệt với SEQ ID NO: 1 hoặc ít nhất 99,6% giống hệt với SEQ ID NO: 3. Theo một số phương án, trình tự axit amin của polypeptit bao gồm không quá hai, hoặc không quá một sự thay thế liên quan đến SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 3. Theo một số phương án, polypeptit HA cúm thiếu gốc metionin đầu tận N.

Phân tử axit nucleic phân lập và vector mã hóa polypeptit HA tái tổ hợp cũng được đề xuất bởi phần bộc lộ sáng chế. Theo một số phương án, các phân tử axit nucleic và vector mã hóa polypeptit HA tái tổ hợp bao gồm trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 2 hoặc SEQ ID NO: 4. Sáng chế còn đề xuất các tế bào được phân lập chứa các vector này.

Sáng chế còn đề xuất các hạt giống như virus cúm (các VLP) và các protein dung hợp chứa các polypeptit HA được tối ưu hóa.

Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất các hợp phần bao gồm các polypeptit HA cúm được tối ưu hóa, các protein dung hợp hoặc các VLP được bộc lộ ở đây trong chất mang được dụng. Các phương pháp để kích thích phản ứng miễn dịch chống lại virus cúm ở đối tượng bằng cách dùng các hợp phần, các protein dung hợp hoặc các VLP được mô tả cũng được đề xuất bởi phần mô tả này.

Sáng chế còn đề xuất các phương pháp gây miễn dịch ở đối tượng chống lại virus cúm bằng cách cho đối tượng dùng hợp phần chứa VLP mà bao gồm polypeptit HA được tối ưu hóa.

Các mục đích trên và các mục đích khác, các dấu hiệu, và các ưu điểm của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng hơn từ phần mô tả chi tiết sau đây, mà được hiểu rõ ràng

hơn cùng với các hình vẽ kèm theo.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG. 1 là sơ đồ tóm tắt quá trình tạo ra trình tự HA COBRA bằng cách sử dụng 1989 thể phân lập virus cúm H5N1 ở người và ở chim, ở đây được gọi là HA “All H5 COBRA”.

FIG. 2 là sơ đồ tóm tắt quá trình tạo ra trình tự HA COBRA bằng cách sử dụng 1213 thể phân lập H5N1 nhánh gai nối 2 ở người và ở chim, ở đây được gọi là HA “COBRA-2 ở người-chim”.

FIG. 3 là sơ đồ thể hiện các chuẩn độ HAI so với các chủng thách thức nhánh gai nối 1, nhánh gai nối 2 và nhánh gai nối 7 sau khi chủng vắc-xin bằng các VLP chứa trình tự HA All H5 COBRA (SEQ ID NO: 1), các VLP chứa trình tự HA COBRA-2 ở người-chim (SEQ ID NO: 3), các VLP chứa trình tự HA COBRA virus cúm nhánh gai nối 2 ở chim (Human COBRA-2), hoặc các VLP chứa HA virus cúm Whooper Swan (A/Whooper Swan/Mongolia/244/2005). Chủng vắc-xin (3µg) được thực hiện ở 0 và 3 tuần với tá dược (Imject™).

FIG. 4 là sơ đồ thể hiện thể trọng của các động vật đã được chủng vắc-xin bằng các VLP chứa trình tự HA All H5 COBRA (SEQ ID NO: 1), các VLP chứa trình tự HA COBRA-2 ở người-chim (SEQ ID NO: 3), các VLP chứa trình tự HA COBRA-2 ở người, hoặc các VLP Whooper Swan sau đó được thách thức bằng virus nhánh gai nối 2.1 Indonesia (A/Indonesia/5/2005). Chủng vắc-xin (3µg) được thực hiện ở 0 và 3 tuần với tá dược (Imject™); thách thức virus xuất hiện trong tuần 5.

FIG. 5 là sơ đồ thể hiện thể trọng của các động vật đã được chủng vắc-xin bằng các VLP chứa trình tự HA All H5 COBRA (SEQ ID NO: 1), các VLP chứa trình tự HA COBRA-2 ở người-chim (SEQ ID NO: 3), các VLP chứa trình tự HA COBRA-2 ở người, hoặc các VLP Whooper Swan, sau đó được thách thức bằng virus nhánh gai nối 1 Vietnam (A/Vietnam/1203/2004). Chủng vắc-xin (3µg) được thực hiện ở 0 và 3 tuần với tá dược (Imject™); thách thức virus xuất hiện trong tuần 5.

FIG. 6 là sơ đồ thể hiện chuẩn độ virus (Ngày 3) ở phổi của các con chuột đã được chủng vắc-xin bằng các VLP chứa trình tự HA All H5 COBRA (SEQ ID NO: 1), các VLP chứa trình tự HA COBRA-2 ở người-chim (SEQ ID NO: 3), các VLP

chứa trình tự HA COBRA-2 ở người, hoặc các VLP Whooper Swan, sau đó được thách thức bằng virus nhánh gai nổi 2.2 Whooper Swan. Chủng vắc-xin (3 μ g) được thực hiện ở 0 và 3 tuần với tá dược (ImjectTM); thách thức virus xuất hiện trong tuần 5.

FIG. 7 là sơ đồ thể hiện chuẩn độ virus (Ngày 3) ở phổi của các con chuột đã được chủng vắc-xin bằng các VLP chứa trình tự HA All H5 COBRA (SEQ ID NO: 1), các VLP chứa trình tự HA COBRA-2 ở người-chim (SEQ ID NO: 3), các VLP chứa trình tự HA COBRA-2 ở người, hoặc các VLP Whooper Swan, sau đó được thách thức bằng virus nhánh gai nổi 1 Vietnam. Chủng vắc-xin (3 μ g) được thực hiện ở 0 và 3 tuần với tá dược (ImjectTM); thách thức virus xuất hiện trong tuần 5.

FIG. 8 là sơ đồ thể hiện thể trọng của các động vật đã được chủng vắc-xin bằng các VLP chứa trình tự HA All H5 COBRA (SEQ ID NO: 1), các VLP chứa trình tự HA COBRA-2 ở người-chim (SEQ ID NO: 3), các VLP chứa trình tự HA COBRA-2 ở người, hoặc các VLP Whooper Swan, sau đó được thách thức bằng virus nhánh gai nổi 1 Vietnam. Chủng vắc-xin một lần (3 μ g) được thực hiện ở tuần 0 với tá dược (ImjectTM), tiếp theo là thách thức virus trong tuần 4.

FIG. 9 là sơ đồ thể hiện chuẩn độ virus ở phổi của các con chuột đã được chủng vắc-xin bằng các VLP chứa trình tự HA All H5 COBRA (SEQ ID NO: 1), các VLP chứa trình tự HA COBRA-2 ở người-chim (SEQ ID NO: 3), các VLP chứa trình tự HA COBRA-2 ở người, hoặc các VLP Whooper Swan, sau đó được thách thức bằng virus nhánh gai nổi 1 Vietnam. Chủng vắc-xin một lần (3 μ g) được thực hiện ở tuần 0 với tá dược (ImjectTM), tiếp theo là thách thức virus trong tuần 4. D2 = ngày thứ 2; D3 = ngày thứ 3.

FIG. 10 là sơ đồ thể hiện thể trọng của các động vật đã được chủng vắc-xin bằng các VLP chứa trình tự HA All H5 COBRA (SEQ ID NO: 1), các VLP chứa trình tự HA COBRA-2 ở người-chim (SEQ ID NO: 3), các VLP chứa trình tự HA COBRA-2 ở người, hoặc các VLP Whooper Swan, sau đó được thách thức bằng virus nhánh gai nổi 1 Vietnam. Chủng vắc-xin một lần (3 μ g) được thực hiện ở tuần 0 không có tá dược, tiếp theo là thách thức virus trong tuần 4.

FIG. 11 là sơ đồ thể hiện phần trăm sống sót của các động vật được chủng vắc-xin bằng các VLP chứa trình tự HA All H5 COBRA (SEQ ID NO: 1), các VLP

chứa trình tự HA COBRA-2 ở người-chim (SEQ ID NO: 3), các VLP chứa trình tự HA COBRA-2 ở người, hoặc các VLP Whooper Swan, sau đó được thách thức bằng virus nhánh gai nổi 1 Vietnam. Chủng vắc-xin một lần (3 μ g) được thực hiện ở tuần 0 không có tá dược, tiếp theo là thách thức virus trong tuần 4.

FIG. 12 là sơ đồ thể hiện thể trọng của các động vật đã được chủng vắc-xin bằng các VLP chứa trình tự HA All H5 COBRA (SEQ ID NO: 1), các VLP chứa trình tự HA COBRA-2 ở người-chim (SEQ ID NO: 3), các VLP chứa trình tự HA COBRA-2 ở người, hoặc các VLP Whooper Swan, sau đó được thách thức bằng virus nhánh gai nổi 1 Vietnam. Chủng vắc-xin một lần ở liều lượng bằng 0,6 μ g được thực hiện ở tuần 0 với tá dược (Imject™), tiếp theo là thách thức virus trong tuần 4.

FIG. 13 là sơ đồ thể hiện chuẩn độ virus (Ngày 2) ở phổi của các con chuột đã được chủng vắc-xin bằng các VLP chứa trình tự HA All H5 COBRA (SEQ ID NO: 1), các VLP chứa trình tự HA COBRA-2 ở người-chim (SEQ ID NO: 3), các VLP chứa trình tự HA COBRA-2 ở người, hoặc các VLP Whooper Swan, sau đó được thách thức bằng virus nhánh gai nổi 1 Vietnam. Chủng vắc-xin một lần ở liều lượng bằng 0,6 μ g được thực hiện ở tuần 0 với tá dược (Imject™), tiếp theo là thách thức virus trong tuần 4.

FIG. 14 là sơ đồ thể hiện chuẩn độ virus (Ngày 3) ở phổi của các con chuột đã được chủng vắc-xin bằng các VLP chứa trình tự HA All H5 COBRA (SEQ ID NO: 1), các VLP chứa trình tự HA COBRA-2 ở người-chim (SEQ ID NO: 3), các VLP chứa trình tự HA COBRA-2 ở người, hoặc các VLP Whooper Swan, sau đó được thách thức bằng virus nhánh gai nổi 1 Vietnam. Chủng vắc-xin một lần ở liều lượng bằng 0,6 μ g được thực hiện ở tuần 0 với tá dược (Imject™), tiếp theo là thách thức virus trong tuần 4.

FIG. 15 là sơ đồ thể hiện thể trọng của các động vật đã được chủng vắc-xin bằng các VLP chứa trình tự HA All H5 COBRA (SEQ ID NO: 1), các VLP chứa trình tự HA COBRA-2 ở người-chim (SEQ ID NO: 3), các VLP chứa trình tự HA COBRA-2 ở người, hoặc các VLP Whooper Swan, sau đó được thách thức bằng virus nhánh gai nổi 2.2 Whooper Swan. Chủng vắc-xin một lần ở liều lượng bằng 0,6 μ g được thực hiện ở tuần 0 với tá dược (Imject™), tiếp theo là thách thức virus trong tuần 4.

FIG. 16 là sơ đồ thể hiện chuẩn độ virus (Ngày 2) ở phổi của các con chuột đã được chủng vắc-xin bằng các VLP chứa trình tự HA All H5 COBRA (SEQ ID NO: 1), các VLP chứa trình tự HA COBRA-2 ở người-chim (SEQ ID NO: 3), các VLP chứa trình tự HA COBRA-2 ở người, hoặc các VLP Whooper Swan, sau đó được thách thức bằng virus nhánh gai nổi 2.2 Whooper Swan. Chủng vắc-xin một lần ở liều lượng bằng 0,6µg được thực hiện ở tuần 0 với tá dược (Imject™), tiếp theo là thách thức virus trong tuần 4.

FIG. 17 là sơ đồ thể hiện chuẩn độ virus (Ngày 3) ở phổi của các con chuột đã được chủng vắc-xin bằng các VLP chứa trình tự HA All H5 COBRA (SEQ ID NO: 1), các VLP chứa trình tự HA COBRA-2 ở người-chim (SEQ ID NO: 3), các VLP chứa trình tự HA COBRA-2 ở người, hoặc các VLP Whooper Swan, sau đó được thách thức bằng virus nhánh gai nổi 2.2 Whooper Swan. Chủng vắc-xin một lần ở liều lượng bằng 0,6µg được thực hiện ở tuần 0 với tá dược (Imject™), tiếp theo là thách thức virus trong tuần 4.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

Các trình tự axit nucleic và axit amin được liệt kê trong danh mục trình tự kèm theo được thể hiện bằng cách sử dụng các chữ cái viết tắt tiêu chuẩn đối với các bazơ nucleotit, và mã ba chữ cái đối với các axit amin, được xác định trong 37 C.F.R. 1,822. Chỉ một dải của mỗi trình tự axit nucleic được thể hiện, nhưng dải bổ sung được hiểu là được bao gồm bởi sự viện dẫn bất kỳ đến dải được thể hiện. Danh mục trình tự được bổ sung là tệp chữ ASCII, được tạo ra ngày 1 tháng 2 năm 2013, 14.7 KB, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Trong danh mục trình tự kèm theo:

SEQ ID NO: 1 là trình tự axit amin COBRA đối với thể phân lập cúm H5N1 ở người và ở chim, ở đây được gọi là HA “All H5 COBRA”.

SEQ ID NO: 2 là trình tự axit nucleic được tối ưu hóa codon mã hóa HA COBRA cúm H5N1 của SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO: 3 là trình tự axit amin COBRA đối với các thể phân lập cúm nhánh gai nổi 2 H5N1 ở người và chim, ở đây được gọi là HA “COBRA-2 ở người-chim”.

SEQ ID NO: 4 là trình tự axit nucleic được tối ưu hóa codon mã hóa HA

COBRA cúm H5N1 của SEQ ID NO: 2.

Mô tả chi tiết sáng chế

I. Các chữ viết tắt

COBRA: kháng nguyên phản ứng rộng được tối ưu hóa bằng máy tính

HA: ngưng kết tổ hồng cầu

HAI: ức chế ngưng kết tổ hồng cầu

HRP: peroxidaza cây cải ngựa

M1: protein nền 1

NA: neuraminidaza

PFU: đơn vị dạng vết tan

VLP: hạt giống như virut

II. Thuật ngữ và phương pháp

Trừ khi có quy định khác, các thuật ngữ kỹ thuật được sử dụng theo sử dụng thông thường. Các định nghĩa về thuật ngữ thông dụng trong sinh học phân tử có thể được tìm thấy trong tài liệu: Benjamin Lewin, *Genes V*, được công bố bởi Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew *et al.* (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, được công bố bởi Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); và Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: Comprehensive Desk Reference*, được công bố bởi VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8).

Để tạo điều kiện thuận lợi cho việc xem xét các phương án thực hiện khác nhau của phần mô tả, dưới đây là các giải thích về các thuật ngữ cụ thể:

Chất phụ trợ: Chất hoặc tá dược mà làm tăng cường một cách không đặc hiệu phản ứng miễn dịch đối với kháng nguyên. Các chất phụ trợ có thể bao gồm huyền phù của các khoáng chất (phèn, nhôm hydroxit, hoặc phosphat) trên đó kháng nguyên được hấp phụ; hoặc nhũ tương nước trong dầu, trong đó dung dịch kháng nguyên được nhũ hóa trong dầu khoáng (ví dụ, chất phụ trợ không hoàn chỉnh Freund), đôi khi bao gồm mycobacteria bị giết chết (chất phụ trợ hoàn chỉnh Freund) để làm tăng cường thêm tính kháng nguyên. Các oligonucleotit kích thích miễn dịch

(như các oligonucleotit bao gồm motif CpG) cũng được dùng làm các chất phụ trợ (ví dụ, xem các patent Mỹ số 6,194,388; 6,207,646; 6,214,806; 6,218,371; 6,239,116; 6,339,068; 6,406,705; và 6,429,199). Các chất phụ trợ còn bao gồm các phân tử sinh học, như các phân tử đồng kích thích. Các chất phụ trợ sinh học minh họa bao gồm IL-2, RANTES, GM-CSF, TNF- α , IFN- γ , G-CSF, LFA-3, CD72, B7-1, B7-2, OX-40L và 41 BBL.

Áp dụng: Như được sử dụng trong bản mô tả, việc áp dụng hợp phần cho đối tượng có nghĩa là đưa cho, áp dụng hoặc đưa hợp phần vào tiếp xúc với đối tượng. Việc áp dụng có thể được tiến hành theo một số đường bất kỳ, như, ví dụ, dùng tại chỗ, dùng qua đường miệng, dùng dưới da, dùng trong cơ, dùng trong bụng, trong tĩnh mạch, trong vỏ và trong chân bì.

Kháng thể: Phân tử globulin miễn dịch được tạo ra bởi các tế bào lympho B có trình tự axit amin đặc hiệu. Các kháng thể được tạo ra ở người hoặc các động vật khác bằng kháng nguyên đặc hiệu (chất sinh miễn dịch). Các kháng thể được đặc trưng bằng cách phản ứng đặc hiệu với kháng nguyên theo một số cách có thể chứng minh được, mỗi kháng thể và kháng nguyên được định theo các thuật ngữ với các chất khác nhau. “Kích thích phản ứng kháng thể” dùng để chỉ khả năng của kháng nguyên hoặc phân tử khác để kích thích sự sản sinh các kháng thể.

Kháng nguyên: Hợp chất, hợp phần, hoặc chất mà có thể kích thích sự sản sinh của các kháng thể hoặc phản ứng tế bào T ở động vật, kể cả các hợp phần được tiêm hoặc được hấp phụ vào trong động vật. Kháng nguyên phản ứng với các sản phẩm có tính miễn dịch ở dịch thể hoặc tế bào đặc hiệu, kể cả các sản phẩm được thách thức bởi các chất sinh miễn dịch khác loại. Theo một số phương án về các hợp phần và các phương pháp được bộc lộ, kháng nguyên là protein HA cúm.

Được tối ưu hóa codon: Axit nucleic “được tối ưu hóa codon” dùng để chỉ trình tự axit nucleic mà đã được biến đổi để cho các codon là tối ưu đối với sự biểu hiện trong hệ thống cụ thể (như các loài cụ thể hoặc nhóm các loài). Ví dụ, trình tự axit nucleic có thể được tối ưu hóa cho sự biểu hiện trong các tế bào động vật có vú. Sự tối ưu hóa codon không làm biến đổi trình tự axit amin của protein đã được mã hóa.

Protein dung hợp: Một protein được tạo ra bởi sự biểu hiện của trình tự axit

nucleic được thiết kế di truyền từ các trình tự axit nucleic mã hóa ít nhất một phần của hai protein khác nhau (khác loại). Để tạo ra protein dung hợp, các trình tự axit nucleic cần phải ở trong cùng khung đọc và không chứa các codon dừng bên trong. Ví dụ, protein dung hợp có thể bao gồm HA cúm được dung hợp với protein khác loại.

Ngưng kết tổ hồng cầu (HA): Glycoprotein bề mặt virus cúm. HA tạo ra liên kết của hạt virus với các tế bào chủ và sau đó nhập virus vào tế bào chủ. Trình tự nucleotit và axit amin của một số protein HA cúm được biết trong lĩnh vực và có sẵn, như thông qua cơ sở dữ liệu nguồn virus cúm NCBI (Bao *et al.*, *J Virol* 82:596-601, 2008). HA (cùng với NA) là một trong hai yếu tố quyết định kháng nguyên virus cúm chính.

Phản ứng miễn dịch: Phản ứng của tế bào của hệ miễn dịch, như tế bào B, tế bào T, đại thực bào hoặc polymorphonucleocyt, đối với tác nhân kích thích như kháng nguyên hoặc vắc-xin. Phản ứng miễn dịch có thể bao gồm tế bào bất kỳ của kháng thể có liên quan trong phản ứng phòng vệ của vật chủ, ví dụ kể cả, tế bào biểu mô mà tiết interferon hoặc xytokin. Phản ứng miễn dịch bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, phản ứng miễn dịch bẩm sinh hoặc viêm. Như được sử dụng trong bản mô tả, phản ứng miễn dịch bảo vệ dùng để chỉ phản ứng miễn dịch mà bảo vệ đối tượng khỏi nhiễm khuẩn (ngăn ngừa nhiễm khuẩn hoặc ngăn ngừa sự phát triển của bệnh có liên quan đến nhiễm khuẩn). Các phương pháp xác định các phản ứng miễn dịch đã được biết rõ trong lĩnh vực và bao gồm, ví dụ, xác định sự tăng sinh và/hoặc hoạt tính của các tế bào lympho (như các tế bào B hoặc T), sự tiết của các xytokin hoặc các chemokin, viêm, sản sinh kháng thể và tương tự.

Chất sinh miễn dịch: Hợp chất, hợp phần, hoặc chất mà có khả năng, trong các điều kiện thích hợp, làm kích thích phản ứng miễn dịch, như sự sản sinh các kháng thể hoặc phản ứng tế bào T ở động vật, kể cả các hợp phần mà được tiêm hoặc được hấp phụ vào động vật. Như được sử dụng trong bản mô tả, “hợp phần sinh miễn dịch” là hợp phần chứa chất sinh miễn dịch (như polypeptit HA).

Gây miễn dịch: Để làm cho đối tượng được bảo vệ khỏi bệnh nhiễm khuẩn, như bằng cách chủng vắc-xin.

Virus cúm: Virus ARN sợi âm được phân mảnh mà thuộc về họ

Orthomyxoviridae. Có ba loại virus cúm, A, B và C. Các virus cúm A gây nhiễm khuẩn một loạt chim và động vật có vú, kể cả người, ngựa, sư tử biển, lợn, chồn, và gà. Ở những động vật, hầu hết các virus cúm gây ra nhiễm khuẩn cục bộ nhẹ đường hô hấp và đường ruột non. Tuy nhiên, các chủng virus cúm gây bệnh cao, như H5N1, gây nhiễm khuẩn toàn thân ở gia cầm trong đó tỷ lệ chết có thể đạt đến 100%. Trong năm 2009, cúm H1N1 là nguyên nhân thông dụng nhất gây ra cúm ở người. Một chủng mới của H1N1 có nguồn gốc từ lợn xảy ra trong năm 2009 và được tuyên bố đại dịch bởi tổ chức Y tế thế giới. Chủng này được gọi là "cúm lợn." Các virus cúm H1N1 còn chịu trách nhiệm đối với đại dịch cúm Tây Ban Nha vào năm 1918, sự bùng phát Fort Dix vào năm 1976, và đại dịch cúm ở Nga vào năm 1977-1978.

Được phân lập: Thành phần sinh học “được phân lập” (như axit nucleic, protein hoặc virus) về cơ bản đã được tách ra hoặc được tinh chế khỏi các thành phần sinh học khác (như mảnh vụn tế bào, hoặc các protein hoặc các axit nucleic khác). Các thành phần sinh học mà đã “được phân lập” bao gồm các thành phần sinh học được tinh chế bằng các phương pháp tinh chế tiêu chuẩn. Thuật ngữ này còn bao gồm các axit nucleic tái tổ hợp, các protein hoặc các virus (hoặc các VLP), cũng như các axit nucleic hoặc các peptit được tổng hợp về mặt hóa học.

Tác nhân liên kết: Một hoặc nhiều axit amin mà dùng làm đoạn đệm giữa hai polypeptit của protein dung hợp.

Protein nền (M1): Protein cấu trúc virus cúm được tìm thấy trong vỏ virus. M1 được cho là làm chức năng trong việc cấu trúc và hình thành.

Neuraminidaza (NA): Glycoprotein màng virus cúm. NA có liên quan trong việc phá hủy cấu trúc của thụ thể tế bào đối với HA virus bằng cách phân cắt các gốc axit sialic tận cùng từ các gốc hydrat carbon trên các bề mặt của các tế bào bị nhiễm khuẩn. NA còn phân cắt các gốc axit sialic khỏi các protein virus, làm ngăn ngừa sự kết tụ của các virus. NA (cùng với HA) là một trong hai yếu tố quyết định kháng nguyên virus cúm chính.

Được liên kết có điều khiển: Trình tự axit nucleic đầu tiên được liên kết có điều khiển với trình tự axit nucleic thứ hai khi trình tự axit nucleic thứ nhất được đặt trong mối quan hệ chức năng với trình tự axit nucleic thứ hai. Ví dụ, gen khởi đầu được liên kết có điều khiển với trình tự mã hóa nếu gen khởi đầu ảnh hưởng đến sự

phiên mã hoặc sự biểu hiện của trình tự mã hóa. Thông thường, các trình tự ADN được liên kết có điều khiển là liên tục và, khi cần liên kết hai vùng mã hóa protein, trong cùng khung đọc.

Protein HA cúm được tối ưu hóa: Như được sử dụng ở đây, “protein HA cúm được tối ưu hóa” đề cập đến trình tự liên ứng protein HA được tạo ra bởi sự sắp thẳng hàng trình tự của các thể phân lập virus cúm H5N1 ở người và chim (như được mô tả trong các Ví dụ 1 và 2 dưới đây). Các trình tự nucleotit mã hóa protein HA được tối ưu hóa được tối ưu hóa thêm để biểu hiện trong các tế bào động vật có vú thông qua sự tối ưu hóa codon và sự tối ưu hóa ARN (như làm tăng độ ổn định ARN). Các protein HA cúm được tối ưu hóa được bộc lộ ở đây (và được nêu ở đây là SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 3) cũng được gọi là các trình tự “COBRA” (kháng nguyên phản ứng rộng được tối ưu hóa bằng máy tính). Các polypeptit HA được tối ưu hóa được thiết kế để kích thích các đáp ứng miễn dịch phản ứng rộng ở đối tượng. Trong phần bộc lộ sáng chế, “phản ứng rộng” có nghĩa là trình tự protein kích thích phản ứng miễn dịch ở đối tượng là đủ để kìm hãm, trung hòa hoặc ngăn chặn sự nhiễm khuẩn của khoảng rộng của các virus cúm (như hầu hết hoặc tất cả các virus cúm thuộc kiểu phụ đặc hiệu). Trong một số trường hợp, protein HA cúm được tối ưu hóa có khả năng kích thích đáp ứng miễn dịch, như đáp ứng miễn dịch bảo vệ, chống lại hầu hết hoặc tất cả các thể phân lập virus cúm H5N1.

Sự bùng nổ: Như được sử dụng trong bản mô tả, “sự bùng nổ” virus cúm dùng để chỉ tập hợp của thể phân lập virus từ trong một nước trong năm đã nêu.

Môi trường dẫn thuốc được dụng: Các chất mang được dụng (môi trường dẫn thuốc) hữu ích trong bộc lộ này là thông thường. *Remington's Pharmaceutical Sciences*, theo E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15th Edition (1975), mô tả các hợp phần và chế phẩm thích hợp để vận chuyển thuốc của một hoặc nhiều hợp phần trị liệu, như một hoặc nhiều vắc-xin cúm, và các tác nhân được phẩm khác.

Thông thường, bản chất của chất mang sẽ phụ thuộc vào cách dùng cụ thể được sử dụng. Ví dụ, các chế phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa thường chứa các dịch lỏng để tiêm mà bao gồm các chất lỏng có thể chấp nhận được về mặt dược học và sinh lý học như nước, muối sinh lý, dung dịch muối cân bằng, dextroza chứa nước, glyxerol hoặc chất tương tự làm môi trường dẫn thuốc. Đối với các hợp phần rắn (ví

dự, dạng thuốc bột, viên tròn, viên nén, hoặc viên nang), các chất mang rắn không độc thông thường có thể bao gồm, ví dụ, loại dược phẩm của mannitol, lactoza, tinh bột, hoặc magie stearat. Ngoài chất mang trung tính về mặt sinh học, dược phẩm cần được áp dụng có thể chứa lượng nhỏ các chất phụ gia không độc, như chất làm ẩm hoặc chất tạo nhũ tương, các chất bảo quản, và chất đệm pH và chất tương tự, ví dụ natri axetat hoặc sorbitan monolaurat.

Polypeptit: Polyme trong đó các monome là các gốc axit amin mà được nối với nhau thông qua liên kết amit. Khi các axit amin là các axit alpha-amino, thì có thể sử dụng hoặc chất đồng phân quang học L hoặc chất đồng phân quang học D. Các thuật ngữ “polypeptit” hoặc “protein” như được sử dụng trong bản mô tả được dự định bao gồm trình tự axit amin bất kỳ và bao gồm các trình tự được biến đổi như các glycoprotein. Thuật ngữ “polypeptit” cụ thể được dự định bao gồm các protein có trong tự nhiên, cũng như các protein mà được tạo ra bằng cách tái tổ hợp hoặc tổng hợp. Thuật ngữ “gốc” hoặc “gốc axit amin” bao gồm việ dẫn đến axit amin mà được đưa vào protein, polypeptit, hoặc peptit.

Những sự thay thế axit amin bảo toàn là những sự thay thế mà, khi được tạo ra, cản trở ít nhất đến các đặc tính của protein gốc, tức là, cấu trúc và đặc biệt là chức năng của protein được bảo toàn và không bị thay đổi đáng kể bởi những sự thay thế này. Các ví dụ về sự thay thế bảo toàn được thể hiện ở dưới đây.

Gốc ban đầu	Sự thay thế bảo toàn
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
His	Asn; Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile; Val
Lys	Arg; Gln; Glu
Met	Leu; Ile
Phe	Met; Leu; Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp; Phe
Val	Ile; Leu

Sự thay thế bảo toàn thông thường duy trì (a) cấu trúc của khung polypeptit trong vùng thay thế, ví dụ, dưới dạng cấu hình dạng tấm hoặc dạng xoắn, (b) điện tích hoặc khả năng kỵ nước của phân tử ở điểm đích, hoặc (c) khối lớn của chuỗi bên.

Những sự thay thế nhìn chung là được mong đợi để tạo ra sự thay đổi lớn nhất về các đặc tính protein sẽ là những sự thay đổi không bảo toàn, ví dụ những sự thay đổi trong đó (a) gốc ưa nước, ví dụ, seryl hoặc threonyl, được thay thế cho (hoặc bằng) gốc kỵ nước, ví dụ, leuxyl, isoleuxyl, phenylalanyl, valyl hoặc alanyl; (b)

xystein hoặc prolin được thay thế cho (hoặc bằng) gốc khác bất kỳ; (c) gốc có mạch bên điện dương, ví dụ, lysyl, arginyl, hoặc histadyl, được thay thế cho (hoặc bằng) gốc điện âm, ví dụ, glutamyl hoặc aspartyl; hoặc (d) gốc có mạch bên lớn, ví dụ, phenylalanin, được thay thế cho (hoặc bằng) gốc không có mạch bên, ví dụ, glyxin.

Phòng ngừa, điều trị hoặc làm thuyên giảm bệnh: “Phòng ngừa” bệnh dùng để chỉ việc ức chế sự phát triển toàn diện của bệnh. “Điều trị bệnh” dùng để chỉ sự can thiệp bằng điều trị mà làm thuyên giảm dấu hiệu hoặc triệu chứng của bệnh hoặc tình trạng bệnh lý sau khi nó bắt đầu phát triển. “Làm thuyên giảm bệnh” dùng để chỉ sự giảm một số hoặc mức độ nghiêm trọng của các dấu hiệu hoặc các triệu chứng của bệnh.

Gen khởi đầu: Gen khởi đầu là một dãy của các trình tự không chế axit nucleic mà hướng đến sự phiên mã của axit nucleic. Gen khởi đầu bao gồm các trình tự axit nucleic cần thiết gần điểm bắt đầu phiên mã. Gen khởi đầu tùy ý còn bao gồm gen tăng cường xa hoặc các yếu tố ức chế. “Gen khởi đầu cấu trúc” là gen khởi đầu mà có hoạt tính liên tục và không phải qua sự điều tiết bằng các dấu hiệu hoặc các phân tử bên ngoài. Trái lại, hoạt tính của “gen khởi đầu có thể cảm ứng” được điều tiết bởi tín hiệu hoặc phân tử bên ngoài (ví dụ, yếu tố phiên mã). Theo một số phương án ở đây, gen khởi đầu là gen khởi đầu CMV.

Được tinh chế: Thuật ngữ “được tinh chế” không nhất thiết phải là tinh khiết hoàn toàn; hơn nữa, nó dự định như là thuật ngữ tương đối. Như vậy, ví dụ, peptit, protein, virus, VLP hoặc hợp chất hoạt tính khác được tinh chế là chất mà được phân lập toàn bộ hoặc một phần từ các protein có liên quan trong tự nhiên và các tạp chất khác. Theo các phương án nhất định, thuật ngữ “hầu như tinh khiết” dùng để chỉ peptit, protein, virus, VLP hoặc hợp chất hoạt tính khác mà đã được phân lập từ tế bào, môi trường nuôi cấy tế bào, hoặc chế phẩm thô khác và phải qua phân đoạn để loại bỏ các thành phần khác nhau của chế phẩm ban đầu, như các protein, mảnh vỡ tế bào, và các thành phần khác.

Tái tổ hợp: Axit nucleic tái tổ hợp, protein, virus hoặc VLP là axit nucleic tái tổ hợp, protein, virus hoặc VLP mà có trình tự mà không có trong tự nhiên hoặc có trình tự mà được tạo ra bởi sự kết hợp nhân tạo của hai phân mảnh trình tự được tách ra khác. Sự kết hợp nhân tạo này thường được thực hiện bằng cách tổng hợp hóa học

hoặc bằng cách thao tác nhân tạo của các mảnh đã được phân lập của các axit nucleic, ví dụ, bằng các kỹ thuật thiết kế di truyền.

Tính đồng nhất trình tự: Tính tương đồng giữa các trình tự axit amin hoặc axit nucleic được biểu hiện theo các thuật ngữ về tính tương đồng giữa các trình tự, theo cách khác được gọi là tính đồng nhất trình tự. Tính đồng nhất trình tự thường được xác định xét về phần trăm tính đồng nhất (hoặc tính tương tự hoặc tương đồng); tỷ lệ phần trăm cao hơn, hai trình tự tương tự hơn. Các chất tương đồng hoặc các biến thể của gen hoặc protein được đưa ra sẽ có mức độ tương đối cao của tính đồng nhất trình tự khi được sắp thẳng hàng bằng cách sử dụng phương pháp chuẩn.

Các phương pháp sắp thẳng hàng của các trình tự để so sánh được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật. Các chương trình khác nhau và các thuật toán sắp thẳng hàng được mô tả trong tài liệu: Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482, 1981; Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443, 1970; Pearson and Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2444, 1988; Higgins and Sharp, *Gene* 73:237-244, 1988; Higgins and Sharp, *CABIOS* 5:151-153, 1989; Corpet *et al.*, *Nucleic Acids Research* 16:10881-10890, 1988; and Pearson and Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2444, 1988. Altschul *et al.*, *Nature Genet.* 6:119-129, 1994.

Công cụ tìm kiếm sự sắp thẳng hàng tại chỗ NCBI (The NCBI Basic Local Alignment Search Tool) (BLAST™) (Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215:403-410, 1990) có sẵn từ một số nguồn, bao gồm Trung tâm quốc gia về thông tin công nghệ sinh học- National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD) và trên Internet, để sử dụng cùng với chương trình phân tích trình tự blastp, blastn, blastx, tblastn và tblastx.

Đối tượng: Các sinh vật có xương sống đa tế bào sống, loại mà bao gồm cả động vật có vú là người và không phải là người, như các động vật linh trưởng không phải là người.

Lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị: Lượng chất đặc hiệu đủ để đạt được tác dụng mong muốn ở đối tượng được điều trị bằng chất này. Ví dụ, lượng này có thể là lượng của vắc-xin virus cúm hữu ích để kích thích phản ứng miễn dịch ở đối tượng và/hoặc để phòng ngừa nhiễm khuẩn hoặc bệnh do virus cúm gây ra. Lý tưởng là, trong phạm vi của bản mô tả, lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị của vắc-xin cúm

là lượng đủ để làm tăng sức đề kháng đối với, ngăn ngừa, làm thuyên giảm, và /hoặc điều trị nhiễm khuẩn do virus cúm gây ra ở đối tượng mà không gây ra tác động độc tế bào chính ở đối tượng. Lượng hữu hiệu của vắc-xin cúm có tác dụng để làm tăng sức đề kháng đối với, phòng ngừa, làm thuyên giảm bệnh, và /hoặc điều trị nhiễm khuẩn ở đối tượng sẽ phụ thuộc vào, ví dụ, đối tượng được điều trị, cách dùng hợp phần điều trị và các yếu tố khác.

Bị biến nạp: Tế bào bị biến nạp là tế bào mà phân tử axit nucleic đã được đưa vào đó bằng kỹ thuật sinh học phân tử. Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ sự biến nạp bao gồm tất cả các kỹ thuật bằng kỹ thuật đó phân tử axit nucleic có thể được đưa vào tế bào này, bao gồm sự chuyển nhiễm với vector virus, sự biến nạp với vector plasmit, và đưa ADN trần bằng cách đục lỗ điện, bọc vật liệu trong màng liposome (lipofection), và sự đẩy nhanh bắn hạt.

Vắc-xin: Chế phẩm của nguyên liệu sinh miễn dịch có khả năng kích thích phản ứng miễn dịch, được dùng để phòng ngừa, làm thuyên giảm hoặc điều trị bệnh, như bệnh nhiễm khuẩn. Nguyên liệu sinh miễn dịch có thể bao gồm, ví dụ, các vi sinh vật bị làm suy yếu hoặc bị giết chết (như các virus bị làm suy yếu), hoặc các protein kháng nguyên (kể cả các VLP), các peptit hoặc ADN thu được từ chúng. Các vắc-xin có thể gây ra cả phản ứng phòng bệnh (ngăn ngừa) và chữa bệnh. Các phương pháp dùng thay đổi theo vắc-xin, nhưng có thể bao gồm tiêm chủng, tiêu hóa, xông hít hoặc các dạng áp dụng khác. Tiêm chủng có thể được vận chuyển bằng bất kỳ trong số các đường, bao gồm ngoài đường tiêu hóa, như trong tĩnh mạch, dưới da hoặc trong cơ. Các vắc-xin có thể được sử dụng cùng với chất phụ trợ để làm tăng tốc phản ứng miễn dịch.

Vector: Vector là phân tử axit nucleic cho phép chèn axit nucleic lạ mà không phá vỡ khả năng của vector để làm tái tạo và/hoặc hợp nhất trong tế bào chủ. Vector có thể bao gồm các trình tự axit nucleic mà cho phép nó tái tạo trong tế bào chủ, như nguồn gốc tái tạo. Vector xen có khả năng tự cài xen vào axit nucleic chủ. Vector cũng có thể bao gồm một hoặc nhiều gen đánh dấu có thể lựa chọn và các yếu tố di truyền khác. Vector biểu hiện là vector mà chứa các trình tự điều tiết cần thiết để cho phép phiên mã và dịch mã của gen hoặc các gen cài. Theo một số phương án của sáng chế, vector mã hóa protein HA, NA hoặc M1 cúm. Theo một số phương án, vector là vector biểu hiện pTR600 (Công bố đơn patent Mỹ số 2002/0106798; Ross *et al.*, *Nat*

Immunol. 1(2):102-103, 2000; Green *et al.*, *Vaccine* 20:242-248, 2001).

Hạt giống như virus (VLP): Các hạt virus được tạo thành từ một trong nhiều protein cấu trúc virus, nhưng thiếu hệ gen virus. Do các VLP thiếu hệ gen virus, chúng không nhiễm khuẩn. Ngoài ra, các VLP có thể thường được tạo ra bởi sự biểu hiện dị thường và có thể được tinh chế một cách dễ dàng. Hầu hết các VLP chứa ít nhất protein nhân virus mà hướng sự nảy mầm và nhả các hạt ra khỏi tế bào chủ. Một ví dụ về protein nhân này là M1 cúm. Theo một số phương án trong bản mô tả, VLP cúm chứa protein HA, NA và /hoặc M1. Các VLP cúm có thể được tạo ra bằng cách chuyển nhiễm các tế bào chủ với các plasmid mã hóa các protein HA và NA, và tùy ý là protein M1. Sau khi ủ các tế bào đã được chuyển nhiễm trong thời gian thích hợp để cho phép biểu hiện protein (ví dụ trong khoảng 72 giờ), các VLP có thể được phân lập khỏi các dịch nổi môi trường nuôi cấy tế bào. Ví dụ 3 đưa ra phương pháp minh họa để tinh chế các VLP cúm từ các dịch nổi tế bào. Trong ví dụ này, các VLP được phân lập bằng cách ly tâm tốc độ chậm (để loại bỏ mảnh vụn tế bào), lọc chân không và siêu ly tâm qua 20% glyxerol. Các phương pháp khác sản xuất các VLP cúm được biết trong lĩnh vực (ví dụ, xem công bố đơn sáng chế Mỹ số 2006/0263804; 2008/0031895; 2010/0166769; và 2010/0239610).

Trừ khi được giải thích theo cách khác, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học được sử dụng trong bản mô tả có nghĩa giống như được hiểu thông thường bởi chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các thuật ngữ số ít bao gồm cả số nhiều trừ khi có quy định khác. Tương tự, từ “hoặc” được dự định bao gồm “và” trừ khi có quy định khác. Do vậy “chứa A hoặc B” có nghĩa là bao gồm A, hoặc B, hoặc A và B. Cần hiểu thêm rằng tất cả các kích cỡ bazơ hoặc kích cỡ axit amin, và tất cả các giá trị phân tử lượng hoặc khối lượng phân tử, được đưa ra đối với các axit nucleic hoặc các polypeptit là giá trị xấp xỉ, và được đưa ra để mô tả. Mặc dù các phương pháp và các nguyên liệu tương tự hoặc tương đương với các phương pháp và các nguyên liệu được mô tả trong bản mô tả có thể được sử dụng trong thực tế hoặc thử nghiệm của sáng chế, các phương pháp và các nguyên liệu thích hợp là được mô tả dưới đây. Tất cả các tài liệu công bố, các đơn sáng chế, các patent và các tài liệu viện dẫn khác được đề cập trong bản mô tả được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Trong trường hợp xung đột, bản mô tả sáng chế này, bao gồm giải thích các thuật ngữ, sẽ điều chỉnh. Ngoài ra, các nguyên liệu, các phương pháp, và các ví dụ chỉ mang tính minh

họa và không dự định làm giới hạn sáng chế.

III. Tổng quan về một số phương án thực hiện

Được bộc lộ ở đây là sự tạo ra polypeptit HA H5N1 được tối ưu hóa bằng máy tính để kích thích phản ứng miễn dịch phản ứng rộng đối với virus cúm H5N1. Các polypeptit HA được tối ưu hóa đã phát triển thông qua một loạt sự sắp hàng protein HA, và sự tạo ra sau đó của các trình tự liên ứng dựa vào 1.989 thể phân lập cúm H5N1 ở người và ở chim. Các phương pháp được sử dụng để tạo ra các trình tự liên ứng HA được tối ưu hóa được mô tả trong các Ví dụ 1 và 2, được thể hiện trong các hình vẽ Fig. 1 và Fig.2. Các trình tự axit amin của hai polypeptit HA cụ thể được nêu ở đây là SEQ ID NO: 1 (All H5 COBRA) và SEQ ID NO: 3 (COBRA-2 ở người-chim). Cũng được bộc lộ ở đây là các trình tự axit nucleic được tối ưu hóa codon mã hóa các polypeptit HA được tối ưu hóa. Hai trình tự axit nucleic HA được tối ưu hóa codon được nêu ở đây là SEQ ID NO: 2 và SEQ ID NO: 4.

Được đề xuất ở đây là các polypeptit HA cúm tái tổ hợp có trình tự axit amin được tối ưu hóa để kích thích phản ứng miễn dịch phản ứng rộng chống lại cúm H5N1. Theo một số phương án, polypeptit HA chứa trình tự axit amin ít nhất 99,8% giống hệt với các gốc 2-566 của SEQ ID NO: 1 hoặc ít nhất 99,6% giống hệt với các gốc 2-567 của SEQ ID NO: 3. Trong các ví dụ cụ thể, trình tự axit amin của polypeptit HA chứa hoặc bao gồm trình tự axit amin của các gốc 2-566 của SEQ ID NO: 1 hoặc các gốc 2-567 của SEQ ID NO: 3.

Theo các phương án khác, polypeptit HA tái tổ hợp chứa trình tự axit amin ít nhất 99,8% giống hệt với SEQ ID NO: 1 hoặc ít nhất 99,6% giống hệt với SEQ ID NO: 3. Trong một số ví dụ, trình tự axit amin của polypeptit HA là giống hơn so với tỷ lệ phần trăm xác định được mô tả ở trên. Trong các ví dụ khác, trình tự axit amin chứa hoặc bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 3. Trong các ví dụ cụ thể, polypeptit HA thiếu gốc metionin đầu tận N.

Theo một số phương án, trình tự axit amin của polypeptit HA chứa không quá một sự thay thế axit amin liên quan đến SEQ ID NO: 1. Theo các phương án khác, trình tự axit amin của polypeptit HA chứa không quá 2, hoặc không quá 1, sự thay thế axit amin liên quan đến SEQ ID NO: 3. Trong một số ví dụ, sự thay thế axit amin là sự thay thế bảo toàn. Trong các ví dụ khác, sự thay thế axit amin là sự thay thế

không bảo toàn. Trong các ví dụ khác, số những thay thế liên quan đến trình tự được xác định là ít hơn so với số những thay thế được xác định ở trên.

Ngoài ra sáng chế còn đề xuất các phân tử axit nucleic được phân lập mã hóa polypeptit HA cúm tái tổ hợp được bộc lộ trong bản mô tả. Theo một số phương án, phân tử axit nucleic là được tối ưu hóa codon cho sự biểu hiện trong các tế bào động vật có vú. Phân tử axit nucleic tùy ý còn được tối ưu hóa thêm để ổn định ARN.

Theo một số phương án, trình tự của phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit HA là ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% giống hệt với các nucleotit của 4-1698 của SEQ ID NO: 2 hoặc các nucleotit 4-1701 của SEQ ID NO: 4. Trong các ví dụ cụ thể, trình tự của phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit HA chứa hoặc bao gồm các nucleotit của 4-1698 của SEQ ID NO: 2 hoặc các nucleotit 4-1701 của SEQ ID NO: 4.

Theo các phương án khác, trình tự của phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit HA là ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% giống hệt với các nucleotit của 1-1698 của SEQ ID NO: 2 hoặc các nucleotit 1-1701 của SEQ ID NO: 4. Trong các ví dụ cụ thể, trình tự của phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit HA chứa hoặc bao gồm các nucleotit của 1-1698 của SEQ ID NO: 2 hoặc các nucleotit 1-1701 của SEQ ID NO: 4.

Theo các phương án khác nữa, trình tự của phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit HA là ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% giống hệt với SEQ ID NO: 2 hoặc SEQ ID NO: 4. Trong các ví dụ cụ thể, trình tự của phân tử axit nucleic chứa hoặc bao gồm SEQ ID NO: 2 hoặc SEQ ID NO: 4.

Các vector chứa phân tử axit nucleic mã hóa các polypeptit HA tái tổ hợp cũng được đề xuất bởi phần mô tả này. Vector này có thể là vector thích hợp bất kỳ để biểu hiện polypeptit HA này, như vector biểu hiện ở động vật có vú. Trong các ví dụ cụ thể, vector là vector biểu hiện pTR600 (Công bố đơn patent Mỹ số 2002/0106798, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn; Ross *et al.*, *Nat Immunol.* 1(2):102-103, 2000; Green *et al.*, *Vaccine* 20:242-248, 2001).

Trong một số ví dụ, vector bao gồm gen khởi đầu được liên kết có điều khiển với trình tự axit nucleic mã hóa polypeptit HA này. Trong các ví dụ cụ thể, gen khởi đầu là gen khởi đầu CMV.

Sáng chế còn đề xuất các tế bào được phân lập chứa các vector được mô tả. Trong một số trường hợp, tế bào là loại tế bào thích hợp bất kỳ để sản xuất và biểu hiện các VLP, như tế bào động vật có vú.

Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất các VLP cúm chứa polypeptit HA được tối ưu hóa được bộc lộ ở đây. Các VLP cúm có thể còn bao gồm protein cúm khác bất kỳ cần để tạo thành hạt virus. Theo một số phương án, các VLP cúm còn bao gồm protein neuraminidaza (NA) cúm, protein nền (M1) cúm, hoặc cả hai protein này.

Sáng chế còn đề xuất các VLP cúm chứa polypeptit HA cúm được đề xuất ở đây, được tạo ra bằng cách chuyển nhiễm tế bào chủ bằng vector mã hóa polypeptit HA này, vector mã hóa protein NA cúm và vector mã hóa protein M1 cúm trong các điều kiện đủ để cho phép biểu hiện các protein HA, M1 và NA.

Các protein dung hợp chứa polypeptit HA cúm được tối ưu hóa còn được đề xuất bởi phần bộc lộ sáng chế này.

Đồng thời sáng chế đề xuất hợp phần chứa protein HA cúm được tối ưu hóa như được bộc lộ ở đây, hoặc protein dung hợp hoặc VLP chứa protein HA cúm được tối ưu hóa. Theo một số phương án, hợp phần này còn bao gồm chất mang được dung và /hoặc chất phụ trợ. Ví dụ, chất phụ trợ này có thể là phèn, chất phụ trợ hoàn chỉnh Freund, chất phụ trợ sinh học hoặc các oligonucleotit kích thích miễn dịch (như các oligonucleotit CpG).

Còn được đề xuất là phương pháp kích thích phản ứng miễn dịch đối với virus cúm ở đối tượng bằng cách áp dụng protein HA cúm được tối ưu hóa, protein dung hợp chứa HA cúm được tối ưu hóa, các HA VLP chứa cúm được tối ưu hóa, hoặc các hợp phần chứa chúng, như được bộc lộ ở đây. Theo một số phương án, virus cúm là virus cúm H5N1. Theo một số phương án, protein HA, protein dung hợp hoặc VLP có thể được áp dụng bằng cách sử dụng đường dùng thích hợp bất kỳ, như, ví dụ, dùng trong cơ, trong mũi hoặc trong miệng. Theo một số phương án, protein HA, protein dung hợp hoặc VLP được áp dụng dưới dạng hợp phần còn chứa chất mang và /hoặc chất phụ trợ được dung. Ví dụ, chất phụ trợ này có thể là phèn, chất phụ trợ hoàn chỉnh Freund, chất phụ trợ sinh học hoặc các oligonucleotit kích thích miễn dịch (như các oligonucleotit CpG).

Còn được đề xuất là phương pháp gây miễn dịch đối tượng chống lại virus

cúm bằng cách áp dụng cho đối tượng các VLP chứa protein HA cúm được tối ưu hóa được bộc lộ ở đây, hoặc sử dụng hợp phần chứa chúng. Theo một số phương án của phương pháp, hợp phần này còn chứa chất mang được dùng và / hoặc chất phụ trợ. Ví dụ, chất phụ trợ này có thể là phen, chất phụ trợ hoàn chỉnh Freund, chất phụ trợ sinh học hoặc các oligonucleotit kích thích miễn dịch (như các oligonucleotit CpG). Theo một số phương án, các VLP (hoặc các hợp phần chứa chúng) được áp dụng trong cơ.

Theo một số phương án của các phương pháp để kích thích phản ứng miễn dịch hoặc gây miễn dịch đối tượng, đối tượng được dùng VLP chứa protein HA được tối ưu hóa với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 25 μg . Trong các ví dụ cụ thể, đối tượng được dùng VLP với lượng nằm trong khoảng từ 5 đến 20 μg , hoặc VLP với lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 15 μg . Trong một ví dụ cụ thể không làm giới hạn sáng chế, đối tượng được dùng khoảng 15 μg VLP. Tuy nhiên, chuyên gia trong lĩnh vực có thể xác định được lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị (ví dụ lượng mà tạo ra sự bảo vệ chống lại nhiễm khuẩn virus cúm H5N1) của các VLP để áp dụng cho đối tượng.

IV. Bệnh cúm

Các virus cúm là các virus ARN chiều âm tính được phân mảnh mà thuộc về họ *thomyxoviridae*. Có ba loại virus cúm, A, B và C. Các virus cúm A gây nhiễm khuẩn một loạt chim và động vật có vú, kể cả người, ngựa, sư tử biển, lợn, chồn, và gà. Ở những động vật, hầu hết các virus cúm A gây ra nhiễm khuẩn cục bộ nhẹ đường hô hấp và đường ruột non. Tuy nhiên, các chủng virus cúm A gây bệnh, như H5N1, gây nhiễm khuẩn toàn thân ở gia cầm trong đó tỷ lệ chết có thể đạt đến 100%. Những động vật bị nhiễm cúm A thường hoạt động như là bể chứa cho các virus cúm và các kiểu phụ nhất định đã được thể hiện qua các loài rào cản đối với người.

Các virus cúm A có thể được phân lớp thành các kiểu phụ dựa vào các biến đổi alen trong các vùng kháng nguyên của hai gen mà mã hóa các glycoprotein bề mặt, cụ thể là, ngưng kết tổ hồng cầu (HA) và neuraminidaza (NA) mà cần để gắn virus và giải phóng tế bào. Hiện tại, mười sáu kiểu phụ của HA (H1-H16) và chín biến thể kháng nguyên NA (N1-N9) được biết đến với virus cúm A. Trước đây, chỉ ba kiểu phụ được biết đến luân chuyển ở người (H1N1, H1N2, và H3N2). Tuy nhiên,

trong những năm gần đây, kiểu phụ H5N1 gây cúm A ở chim đã được báo cáo qua các loài ngan, vịt và gây nhiễm khuẩn người như được thống kê ở Hong Kong năm 1997 và 2003, làm chết một vài bệnh nhân.

Trong năm 2009, cúm H1N1 là nguyên nhân thông dụng nhất gây ra cúm ở người. Một chủng mới của H1N1 có nguồn gốc từ lợn xuất hiện trong năm 2009 và được tuyên bố đại dịch bởi tổ chức Y tế thế giới. Chủng này được gọi là "cúm lợn." Các virus cúm H1N1 cũng chịu trách nhiệm đối với đại dịch cúm Tây Ban Nha năm 1918, sự bùng phát Fort Dix vào năm 1976, và đại dịch cúm ở Nga vào năm 1977-1978.

Hệ gen được phân mảnh virus cúm chứa tám mảnh gen ARN chiều âm (nsARN) (PB2, PB1, PA, NP, M, NS, HA và NA) làm mã hóa ít nhất mười polypeptit, bao gồm các protein polymeraza ARN hướng ARN (PB2, PB1 và PA), nucleoprotein (NP), neuraminidaza (NA), ngưng kết tổ hồng cầu (các cấu trúc siêu phân tử HA1 và HA2), protein đệm (M1 và M2) và các protein không cấu trúc (NS1 và NS2) (Krug *et al.*, In "The Influenza Viruses," R. M. Krug, ed., Plenum Press, N.Y., 1989, các trang 89-152).

Khả năng của virus cúm gây ra bệnh rộng là do khả năng của nó tránh hệ miễn dịch bằng cách phải qua sự thay đổi kháng nguyên, mà được cho là xảy ra khi vật chủ bị nhiễm khuẩn đồng thời với cả virus cúm ở động vật và virus cúm ở người. Trong quá trình đột biến và phân loại lại trong vật chủ, virus này có thể hợp chất gen protein bề mặt HA và /hoặc NA từ virus khác nữa vào hệ gen của nó, nhờ đó tạo ra kiểu phụ bệnh cúm mới và tránh khỏi hệ miễn dịch.

HA là glycoprotein bề mặt virus thông thường chứa khoảng 560 axit amin và là 25% tổng cộng protein virus. Nó chịu trách nhiệm đối với sự bám dính của hạt virus vào, và sự thâm nhiễm của nó vào, tế bào chủ ở giai đoạn nhiễm khuẩn sớm. Sự phân cắt của tiền chất HA0 virus vào các phân mảnh HA1 và HA2 là bước cần thiết để cho virus nhiễm tế bào. Như vậy, sự phân cắt cần để chuyển hóa các hạt virus mới trong tế bào chủ vào các virion có khả năng nhiễm các tế bào mới. Sự phân cắt được biết xuất hiện trong quá trình vận chuyển protein màng HA0 đầy đủ từ màng lưới nội chất của tế bào bị nhiễm khuẩn đến màng huyết tương. Trong quá trình vận chuyển, ngưng kết tổ hồng cầu phải trải qua một loạt biến đổi đồng và sau dịch mã bao gồm sự phân

cắt phân giải protein của HA tiền chất vào HA1 mảnh tận cùng amino và HA2 tận cùng carboxy. Một trong những khó khăn ban đầu trong việc phát triển chủng cúm trong môi trường nuôi cấy mô ban đầu hoặc các dòng tế bào được thiết lập xuất phát từ yêu cầu để hoạt hóa sự phân cắt phân giải protein cúm ngưng kết tổ hồng cầu cúm trong tế bào chủ.

Mặc dù được biết rằng HA chưa được tách ra có thể làm trung gian cho việc gắn virus vào các thụ thể chứa axit neuraminic của nó trên bề mặt tế bào, nó không có khả năng trong bước tiếp theo trong chu trình nhiễm khuẩn, mà là dung hợp. Đã được biết rằng cần phải cho đầu tận amino kỵ nước của HA2 qua sự phân cắt sao cho nó có thể được lồng vào tế bào đích, bằng cách đó tạo thành cầu giữa virus và màng tế bào đích. Quy trình này tiếp theo là dung hợp hai màng và đưa virus vào tế bào đích.

Sự hoạt hóa phân giải protein của HA liên quan đến sự phân cắt ở gốc arginin bằng endoproteaza giống như trypsin, mà thường là enzym nội bào tức là phụ thuộc canxi và sự tối ưu độ pH trung tính. Vì các proteaza hoạt hóa là các enzym tế bào, loại tế bào bị nhiễm khuẩn xác định xem là HA có được phân cắt không. HA của các virus cúm ở động vật có vú và các virus cúm ở chim không gây bệnh dễ bị phân cắt phân giải protein chỉ ở trong một số loại tế bào bị hạn chế. Mặt khác, HA của các virus ở chim gây bệnh trong số các kiểu phụ H5 và H7 được phân cắt bởi các proteaza có mặt trong khoảng rộng của các tế bào chủ khác nhau. Như vậy, có những sự khác nhau trong khoảng vật chủ do sự khác biệt về khả năng phân cắt ngưng kết tổ hồng cầu mà có liên quan đến các đặc tính gây bệnh của virus.

Neuraminidaza (NA) là glycoprotein màng thứ hai của các virus cúm. Sự có mặt của NA virus đã cho thấy là quan trọng để tạo ra phản ứng miễn dịch bảo vệ nhiều mặt chống lại nhiễm khuẩn virus. Đối với hầu hết các virus cúm A, NA có chiều dài 413 axit amin, và được mã hóa bởi gen của 1413 nucleotit. Chín kiểu phụ NA khác nhau đã được nhận diện trong các virus cúm (N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8 và N9), tất cả trong số đó đã được tìm thấy ở các con chim hoang dã. NA có liên quan trong việc phá hủy cấu trúc của thụ thể tế bào đối với HA virus bằng cách phân cắt các gốc axit neuraminic tận cùng (còn được gọi là axit sialic) từ các gốc hydrat carbon trên bề mặt của các tế bào bị nhiễm khuẩn. NA còn phân cắt các gốc axit sialic khỏi các protein virus, làm ngăn ngừa sự kết tụ của các virus. Bằng cách sử dụng cơ

chế này, giả thiết rằng NA tạo điều kiện thuận lợi cho sự giải phóng dòng giống virus bằng cách ngăn các hạt virus mới được hình thành khỏi tích tụ cùng với màng tế bào, cũng như bằng cách thúc đẩy sự vận chuyển virus qua dịch nhầy có mặt trên bề mặt niêm mạc. NA là chất xác định kháng nguyên quan trọng tức là đối tượng phải qua biến đổi kháng nguyên.

Ngoài protein bề mặt HA và NA, virus cúm chứa sáu gen trong khác, mà tạo ra tám protein khác nhau, bao gồm các gen polymeraza PB1, PB2 và PA, protein đệm M1 và M2, nucleoprotein (NP), và các protein không cấu trúc NS1 và NS2 (Horimoto *et al.*, *Clin Microbiol Rev.* 14(1):129-149, 2001).

Để được kết hợp vào trong virion con cháu, ARN virus được vận chuyển từ nhân như là phức ribonucleoprotein (RNP) bao gồm ba protein polymeraza virus cúm, nucleoprotein (NP), và ARN virus, liên quan đến protein thể gốc virus cúm 1 (M1) và protein xuất có nhân (Marsh *et al.*, *J Virol*, 82:2295-2304, 2008). Protein M1 mà nằm trong vỏ được cho là có chức năng trong việc cấu trúc và xây dựng. Một số lượng hạn chế của các protein M2 được hợp nhất vào các virion (Zebedee, *J. Virol.* 62:2762-2772, 1988). Chúng tạo thành các tetrame có hoạt tính kênh ion H⁺, và khi được hoạt hóa bằng độ pH thấp trong các thể nhân, axit hóa bên trong virion, tạo điều kiện không bao của nó (Pinto *et al.*, *Cell* 69:517-528, 1992). Amantadin là thuốc chống cúm mà ngăn ngừa nhiễm virus bằng cách làm nhiễu loạn bằng hoạt tính kênh ion M2, như vậy làm ức chế không bao virus.

NS1, protein không cấu trúc, có nhiều chức năng, bao gồm sự điều tiết nối ghép và xuất nhân của các mARN ở tế bào cũng như kích thích sự dịch mã. Chức năng chính của NS1 dường như là làm mất tác dụng hoạt tính interferon của vật chủ, vì virus bất hoạt NS1 có thể tồn tại được mặc dù nó phát triển ít hiệu quả hơn so với virus cha mẹ trong các tế bào interferon không có khiếm khuyết (Garcia- Sastre, *Virology* 252:324-330, 1998).

NS2 đã được phát hiện trong các hạt virus (Richardson *et al.*, *Arch. Virol.* 116:69-80, 1991; Yasuda *et al.*, *Virology* 196:249-255, 1993). Số lượng trung bình của các protein NS2 trong hạt virus được ước tính bằng 130-200 phân tử. Thử nghiệm liên kết *in vitro* thể hiện sự tiếp xúc protein-protein trực tiếp giữa M1 và NS2. Các phức NS2-M1 cũng đã được phát hiện bằng cách kết tủa miễn dịch trong các dịch tan

tế bào bị nhiễm virus. Protein NS2 được cho là đóng vai trò trong việc xuất RNP ra khỏi nhân thông qua sự tương tác với protein M1 (Ward *et al.*, *Arch. Virol.* 140:2067-2073, 1995).

V. Các VLP cúm và dùng chúng

Các VLP cúm chứa HA được tối ưu hóa (như HA có trình tự axit amin được nêu ở SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 3) được đề xuất trong bản mô tả. Các VLP cúm thông thường được tạo thành từ các protein HA, NA và M1. Sự sản sinh các VLP cúm đã được mô tả trong giải pháp đã biết và trong khả năng của chuyên gia trong lĩnh vực. Ví dụ, các VLP cúm có thể được tạo ra bằng cách chuyển nhiễm các tế bào chủ bằng các plasmit mã hóa các protein HA, NA và M1. Sau khi ủ các tế bào đã được chuyển nhiễm trong thời gian thích hợp để cho phép biểu hiện protein (ví dụ trong khoảng 72 giờ), các VLP có thể được phân lập khỏi các dịch nổi môi trường nuôi cấy tế bào. Ví dụ 3 dưới đây đưa ra phương pháp minh họa để tinh chế các VLP cúm từ các dịch nổi tế bào. Trong ví dụ này, các VLP được phân lập bằng cách ly tâm tốc độ chậm (để loại bỏ mảnh vụn tế bào), lọc chân không và siêu ly tâm qua 20% glycerol.

Các VLP cúm được đề xuất ở đây có thể được dùng làm vắc-xin cúm để kích thích phản ứng miễn dịch bảo vệ chống lại virus cúm H5N1 ở người và ở chim.

Các VLP cúm, hoặc các hợp phần chứa chúng, có thể được áp dụng cho đối tượng theo đường bất kỳ thường được sử dụng để đưa virus tái tổ hợp vào đối tượng. Các phương pháp dùng bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, trong chân bì, trong cơ, trong bụng, ngoài đường tiêu hóa, trong tĩnh mạch, dùng dưới da, trong âm đạo, trong trực tràng, trong mũi, xông hít hoặc đường miệng. Dùng ngoài đường tiêu hóa, như dùng dưới da, dùng trong tĩnh mạch hoặc trong cơ, thường được thực hiện bằng cách tiêm. Thuốc tiêm có thể được bào chế ở các dạng thông thường, hoặc là ở trong dung dịch hoặc huyền phù lỏng, các dạng rắn thích hợp cho dung dịch hoặc huyền phù trong chất lỏng trước khi tiêm, hoặc dưới dạng nhũ tương. Các dung dịch và nhũ tương tiêm có thể được chuẩn bị từ thuốc bột vô trùng, thuốc hạt, và viên nén thuộc loại được mô tả trước đây. Việc áp dụng có thể là toàn thân hoặc cục bộ.

Các VLP cúm, hoặc các hợp phần chứa chúng, được áp dụng theo cách thích hợp bất kỳ, như với các chất mang được dụng. Các chất mang được dụng một phần

được xác định bằng hợp phần cụ thể được sử dụng, cũng như bằng phương pháp cụ thể được dùng để sử dụng hợp phần này. Do vậy, có một loạt chế phẩm thích hợp của được phẩm của sáng chế.

Các chế phẩm để dùng ngoài đường tiêu hóa bao gồm dung dịch, huyền phù, nhũ tương vô trùng chứa nước hoặc không chứa nước. Các ví dụ về các dung môi không chứa nước là propylen glycol, polyetylen glycol, dầu thực vật như dầu ôliu, và các este hữu cơ dùng để tiêm như etyl oleat. Các chất mang chứa nước bao gồm nước, dung dịch rượu/chứa nước, nhũ tương hoặc huyền phù, bao gồm nước muối hoặc môi trường đệm. Môi trường dẫn thuốc dùng ngoài đường tiêu hóa bao gồm dung dịch natri clorua, dung dịch dextroza Ringer, dextroza và natri clorua, dung dịch Ringer được lactat hóa, hoặc dầu không bay hơi. Môi trường dẫn thuốc trong tĩnh mạch bao gồm dịch lỏng và chất làm đầy dinh dưỡng, chất làm đầy chất điện giải (như các chất gốc dung dịch dextroza Ringer), và các chất tương tự. Các chất bảo quản và các chất phụ gia khác cũng có thể có mặt như, ví dụ, các chất kháng vi sinh vật, các chất chống oxy hóa, các tác nhân chelat, và khí trơ và các chất tương tự.

Một số trong các hợp phần có thể được áp dụng một cách hiệu nghiệm như muối cộng axit hoặc bazơ được dùng, được tạo thành bằng phản ứng với các axit vô cơ như axit clohydric, axit bromhydric, axit percloric, axit nitric, axit thioxyanic, axit sulfuric, và axit phosphoric, và các axit hữu cơ như axit formic, axit axetic, axit propionic, axit glycolic, axit lactic, axit pyruvic, axit oxalic, axit malonic, axit suxinic, axit maleic, và axit fumaric, hoặc bằng phản ứng với bazơ vô cơ như natri hydroxit, amoni hydroxit, kali hydroxit, và các bazơ hữu cơ như mono-, di-, trialkyl và aryl amin và etanolamin được thể.

Việc áp dụng có thể được thực hiện một liều hoặc nhiều liều. Liều lượng được áp dụng cho đối tượng trong phạm vi của bản mô tả cần phải đủ để tạo ra phản ứng điều trị có lợi ở đối tượng theo thời gian, hoặc để ức chế hoặc ngăn ngừa nhiễm khuẩn virus cúm H5N1. Liều lượng cần thiết sẽ thay đổi theo đối tượng phụ thuộc vào các loài, độ tuổi, thể trọng và tình trạng chung của đối tượng, mức độ nghiêm trọng của nhiễm khuẩn cần được điều trị, hợp phần cụ thể được dùng và cách dùng nó. Liều lượng thích hợp có thể được xác định bởi chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật bằng cách sử dụng chỉ thử nghiệm thông thường.

Sáng chế đề xuất được phẩm mà bao gồm lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị của các VLP cúm một mình hoặc kết hợp với chất mang được dụng. Các chất mang được dụng bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, dung dịch muối, dung dịch muối đậm, dextroza, nước, glyxerol, etanol, và sự kết hợp của nó. Chất mang và hợp phần có thể là vô trùng, và chế phẩm phù hợp với cách dùng. Hợp phần này cũng có thể chứa lượng nhỏ chất làm ẩm hoặc chất tạo nhũ tương, hoặc chất đệm pH. Hợp phần này có thể là dung dịch lỏng, huyền phù, nhũ tương, viên nén, viên tròn, viên nang, chế phẩm giải phóng chậm, hoặc dạng thuốc bột. Hợp phần này có thể được phối trộn dưới dạng viên đạn, với chất gắn kết truyền thống và các chất mang như triglyxerit. Các chế phẩm dùng qua đường miệng có thể bao gồm các chất mang tiêu chuẩn như loại được phẩm mannitol, lactoza, tinh bột, magie stearat, natri sacarin, xenluloza, và magie carbonat. Bất kỳ trong số các chất mang thuốc thông thường, như dung dịch muối vô trùng hoặc dầu vừng, có thể được sử dụng. Môi trường này cũng có thể chứa các nguyên liệu phụ trợ thông thường như, ví dụ, các muối được dụng để điều chỉnh áp suất thẩm thấu, các chất đệm, các chất bảo quản và các chất tương tự. Môi trường khác mà có thể được sử dụng với các hợp phần này và các phương pháp được đề xuất ở đây là dung dịch muối bình thường và dầu vừng.

Các VLP cúm được mô tả trong bản mô tả có thể được áp dụng một mình hoặc kết hợp với các tác nhân điều trị khác để làm tăng cường tính kháng nguyên. Ví dụ, các VLP cúm có thể được áp dụng với chất phụ trợ, như chất phụ trợ không hoàn chỉnh Freund hoặc chất phụ trợ hoàn chỉnh Freund.

Tùy ý là, một hoặc nhiều xytokin, như IL-2, IL-6, IL-12, RANTES, GM-CSF, TNF- α , hoặc IFN- γ , một hoặc nhiều yếu tố phát triển, như GM-CSF hoặc G-CSF; một hoặc nhiều phân tử như OX-40L hoặc 41 BBL, hoặc sự kết hợp của các phân tử này, có thể được dùng làm chất phụ trợ sinh học (ví dụ, xem Salgaller *et al.*, 1998, *J. Surg. Oncol.* 68(2):122-38; Lotze *et al.*, 2000, *Cancer J. Sci. Am.* 6(Suppl 1):S61-6; Cao *et al.*, 1998, *Stem Cells* 16(Suppl 1):251-60; Kuiper *et al.*, 2000, *Adv. Exp. Med. Biol.* 465:381-90). Các phân tử này có thể được áp dụng toàn thân (hoặc cục bộ) vào vật chủ.

Một số biện pháp để kích thích các phản ứng tế bào, cả *in vitro* và *in vivo*, đã được biết. Các lipit đã được xác định là các chất có khả năng trợ giúp việc mời CTL *in vivo* chống lại các kháng nguyên khác nhau. Ví dụ, như được mô tả trong patent

Mỹ số 5,662,907, các gốc axit palmitic có thể được gắn vào các nhóm alpha và epsilon amino của gốc lysin và sau đó được liên kết (ví dụ, thông qua một hoặc nhiều gốc liên kết, như glyxin, glyxin-glyxin, serin, serin-serin, hoặc gốc tương tự) vào peptit sinh miễn dịch. Peptit được lipid hóa sau đó có thể được bơm trực tiếp ở dạng mixen, được đưa vào trong liposom, hoặc được nhũ hóa trong chất phụ trợ. Để làm ví dụ khác nữa, các lipoprotein *E. coli*, như tripalmitoyl-S-glyxerylxysteinlyseryl-serin có thể được sử dụng để môi CTL đặc hiệu khối u khi được gắn kết đồng hóa trị vào peptit thích hợp (xem, Deres *et al.*, *Nature* 342:561, 1989). Ngoài ra, vì sự kích thích các kháng thể trung hòa cũng có thể được môi với cùng phân tử được liên hợp với peptit mà thể hiện epitop thích hợp, hai hợp phần có thể được kết hợp để kích thích cả phản ứng do thể dịch và tế bào gây ra mà ở đó được mong muốn.

Mặc dù việc áp dụng các VLP chứa protein HA được tối ưu hóa được minh họa ở đây, chuyên gia trong lĩnh vực sẽ hiểu rằng cũng có thể áp dụng chính protein HA cúm được tối ưu hóa (khi không có mặt hạt virus) hoặc dưới dạng protein dung hợp để kích thích phản ứng miễn dịch ở đối tượng. Theo một số phương án, mảnh của protein HA được dùng như phân mảnh HA1 hoặc HA2.

Các ví dụ dưới đây được đề xuất để minh họa một số dấu hiệu và/hoặc các phương án được mô tả cụ thể. Các ví dụ này không được hiểu là làm giới hạn phân bố đối với các dấu hiệu cụ thể hoặc các phương án được mô tả.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Sự tạo ra trình tự COBRA cúm H5N1

Ví dụ này mô tả sự tạo ra của trình tự liên ứng HA COBRA cúm H5N1 bằng cách sử dụng 1.989 trình tự HA cúm H5N1 ở người và chim. Trình tự COBRA tạo ra được gọi là “All H5 COBRA.”

Để tạo ra trình tự HA COBRA cúm H5N1 cuối cùng, ba lớp của các trình tự liên ứng được sử dụng (FIG. 1). Đối với lớp đầu tiên, trình tự liên ứng được tạo ra cho từng nhánh gai nổi và nhánh gai nổi phụ H5N1 (các nhánh gai nổi 0, 1, 2.1.1, 2.1.2, 2.1.3, 2.2, 2.3.1, 2.3.2, 2.3.3, 2.3.4, 2.4, 2.5, 3, 4, 5, 6, 7, 8 và 9). Lớp thứ hai bao gồm các trình tự liên ứng cho từng trong số năm nhánh gai nổi phụ của nhánh gai nổi 2 (2.1, 2.2, 2.3, 2.4 và 2.5). Đối với lớp thứ ba, trình tự liên ứng cuối cùng được tạo ra bằng cách sử dụng các trình tự liên ứng của từng trong số 10 nhánh gai

nối (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 và 9). Trình tự H5N1 COBRA được tạo ra theo phương pháp này được thể hiện dưới đây và được nêu ở đây là SEQ ID NO: 1.

HA All H5 COBRA (SEQ ID NO: 1)

MEKIVLLLLAIIVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTHAQDILEKTHNGKLCDL
GVKPLILRDCSVAGWLLGNPMCEFINVPEWSYIVEKASPANDLCYPGDFNDYEELKHLLS
RINHFEKIQIIIPKSSWSNHEASSGVSSACPYQGKSSFFRNVVWLIKNSAYPTIKRSYNN
NQEDLLVLWGIHHPNDAAEQTKLYQNPTTYISVGTSTLNQRLVPKIIATRSKVNQSGRMEF
FWTILKPNDAINFESNGNFIAPEYAYKIVKKGDSAIMKSELEYGNCNTKCQTPMGAINSSM
PFHNIHPLTIGECPKYVKSRLVLAATGLRNSPQRERRRKKRGLFGAIAAGFIEGGWQGMVDG
WYGYHHSNEQSGSYAADKESTQKAIDGVTNKVNSIIDKMNTQFEAVGREFNNLERRIENLN
KKMEDGFLDVWTYNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDNALGNGCFEFYH
KCDNECMESVRNGTYDYPQYSEEARLKREEISGVKLESIGTYQILSIYSTVASSLALAIMV
AGLSLWMCSSNGSLQCRI

Trình tự axit amin COBRA cuối cùng được dịch mã ngược và được tối ưu hóa để biểu hiện trong các tế bào động vật có vú, bao gồm sử dụng codon và sự tối ưu hóa ARN (GeneArt; Regensburg, Đức). Trình tự gen được tối ưu hóa codon được tạo ra dưới đây và được nêu ở đây là SEQ ID NO: 2.

Trình tự gen HA All H5 COBRA được tối ưu hóa codon (SEQ ID NO: 2)

atggaaaagatcgtgctgctgctggccatcgtgtccctggtgaagagcgaccagatttgca
ttggctaccacgccaacaatagcacagagcaggtggacaccatcatggagaaaaacgtgac
cgtgaccacgcccaggacatcctggagaaaacccacaacggcaagctgtgtgacctggac
ggcgtgaagcccctgatcctgagagactgctccgtggccggtggtgctgggcaaccca
tgtgtgacgagttcatcaacgtgcccagtggtgagctacatcgtggagaaggccagccccgc
caacgacctgtgctaccccggcgacttcaacgactacgaggagctgaagcacctgctgtcc
cggatcaaccacttcgagaagatccagatcatccccaagagcagctggagcaaccacgagg
ccagcagcggcgtgtccagcgcctgcccctaccagggaagagcagcttcttcggaacgt
ggtctggctgatcaagaagaactctgcctatcccaccatcaagcggagctacaacaacacc
aaccaggaggatctgctggtcctgtggggcatccaccacccaacgacgcccggagcaga
ccaagctgtaccagaacccaccacctacatcagcgtgggcaccagcaccctgaaccagcg
gctggtgccaagatcgccacccggtccaaagtgaacggccagagcggccggatggaattc
ttctggaccatcctgaagcccaacgatgccatcaacttcgagagcaacggcaacttcacg
ccccgagtagcctacaagatcgtgaagaagggcgacagcgccatcatgaagagcgagct
ggaatacggcaactgcaacaccaagtgccagacccccatgggcgccatcaacagcagcatg
cccttcacaacatccacccctgaccatcgggcagtgcccaagtacgtgaagagcaaca
ggctggtgctggccaccggcctgcggaacagccccagcgggagcggcgagggaagaagcg
gggcctgttcggcgccatcgccggttcacgagggcggtggcagggcatggtggacggg
tggtacggctaccaccacagcaatgagcagggcagcggctacgccgcccgaacaagagagca
cccagaaggccatcgacggcgtcaccaacaaggtgaacagcatcatcgacaagatgaacac
ccagttcgaggccgtgggcccggagttcaacaacctggaacggcggatcgagaacctgaac
aagaaaatggaagatggcttcctggacgtgtggacctacaacgccgaactcctggtgctga
tggaaaacgagcggaccctggacttcacgacagcaacgtgaagaacctgtacgacaaagt
gcggctgcagctgcgggacaacgccaagagctgggcaacggctgcttcgagttctaccac
aagtgcgacaacgagtgcatggaaagcgtgcggaacggcacctacgactacccccagtaca
gcgaggaagcccggctgaagcgggaggaaatcagcggcgtgaaactggaaagcatcggcac
ctaccagatcctgagcatctacagcaccgtggccagcagcctcgctctggccattatgggtg
gccggcctgagcctgtggatgtgcagcaacggcagcctgcagtgccggatcggatccagat

ctgctagcgtcgactctagattaattaa

Cấu trúc được tối ưu hóa codon có thể được cài xen vào vector biểu hiện pTR600 (Công bố đơn patent Mỹ số 2002/0106798; Ross *et al.*, *Nat Immunol.* 1(2):102-103, 2000; Green *et al.*, *Vaccine* 20:242-248, 2001) và được dùng để sản xuất các VLP, như được thảo luận dưới đây trong Ví dụ 3.

Ví dụ 2: Sự tạo ra của trình tự H5N1 COBRA Nhánh gai nối 2 ở người/chim

Ví dụ này mô tả sự tạo ra của trình tự liên ứng HA COBRA cúm H5N1 bằng cách sử dụng 1213 trình tự HA cúm nhánh gai nối 2 H5N1 ở người và cúm. Trình tự COBRA tạo ra được gọi là “COBRA-2 ở người-chim.”

Để tạo ra trình tự HA COBRA cúm ở người/chim cuối cùng, hai lớp của trình tự liên ứng được sử dụng (FIG. 2). Đối với lớp thứ nhất, năm trình tự liên ứng được tạo ra bằng cách sử dụng các trình tự từ 10 nhánh gai nối phụ của nhánh gai nối 2 H5N1 (các nhánh gai nối phụ 2.1.1, 2.1.2, 2.1.3, 2.2, 2.3.1, 2.3.2, 2.3.3, 2.3.4, 2.4 và 2.5). Đối với lớp thứ hai, trình tự liên ứng cuối cùng được tạo ra bằng cách sử dụng năm trình tự liên ứng (nhánh gai nối 2.1, nhánh gai nối 2.2, nhánh gai nối 2.3, nhánh gai nối 2.4 và nhánh gai nối 2.5) được tạo ra trong lớp đầu tiên. Trình tự COBRA nhánh gai nối 2 H5N1 ở người/chim được tạo ra theo phương pháp này được thể hiện dưới đây và được nêu ở đây là SEQ ID NO: 3.

HA COBRA-2 ở người-chim (SEQ ID NO: 3)

MEKIVLLLAIVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTTHAQDILEKTHNGKLCDLG
GVKPLILRDCSVAGWLLGNPMCDEFINVPWSYIVEKANPANDLCYPGNFNDYEELKHLLS
RINHFEKIQIIPKSSWSDHEASSGVSSACPYQGKSSFFRNVVWLIKNSAYPTIKRSYNN
NQEDLLVLWGIHHPNDAAEQTRLQYQNPITYISVGTSTLNQRLVPKIATRISKVNGQSGRMEF
FWTILKPNDAINFESNGNFIAPYAYKIVKKGDSAIMKSELEYGNCNTKCQTPMGAINSSM
PFHNIHPLTIGECPKYVKSRLVLTGLRNSPQRRERRRKRGLFGAIAAGFIEGGWQGMVDGW
YGYHHSNEQSGYAADKESTQKIDGVTNKVNSIIDKMNTQFEAVGREFNNLERRIENLNK
KMEDGFLDVWTYNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDNALGNGCFEFYHK
CDNECMESVRNGTYDYPQYSEEARLKREEISGVKLESIGTYQILSIYSTVASSLALAIMVA
GLSLWMCSNGSLQCRICI

Trình tự axit amin COBRA cuối cùng được dịch mã ngược và được tối ưu hóa để biểu hiện trong các tế bào động vật có vú, bao gồm sử dụng codon và sự tối ưu hóa ARN (GeneArt; Regensburg, Đức). Trình tự gen được tối ưu hóa codon được tạo ra dưới đây và được nêu ở đây là SEQ ID NO: 4.

Trình tự gen HA COBRA-2 ở người-chim được tối ưu hóa codon (SEQ ID NO: 4)

atggagaagatcgtgctgctgctggccatcgtgtccctggtgaagagcgaccagatttgca
tcggctaccacgccaacaatagcaccgagcaagtggacaccatcatggagaaaaacgtgac
cgtgaccacgctcaggacatcctcgaaaaaacccacaacggcaagctgtgcatctggac
ggcgtgaagccctgatcctgagagactgcagcgtggccggctggctgctgggcaatccca
tgtgacgagagttcatcaacgtgcccagtgaggctacatcgtggagaaggccaacccgc
caacgacctgtgctaccccggaacttcaacgactacgaggagctgaagcacctgctgagc
cggatcaaccacttcgagaagatccagatcatccccaagagcagctggagcgaccatgagg
caagcagcggcgtgtccagcgcctgcccctaccagggcaagtccagcttcttccgcaacgt
tgtgtggctgatcaagaagaacagcgcctacccaccatcaagcggagctacaacaacacc
aaccaggaggacctgctggtcctgtggggcatccaccacccaacgacgcgcggcagcaga
cccggctgtaccagaacccaccacctacatctctgtgggcaccagcacctgaaccagcg
gctggtgccaagatcgccacccggagcaaggtgaacggccagagcggccggatggagttc
ttctggaccatcctgaagcccaacgatgccatcaacttcgagagcaacggcaacttcatcg
ccccgagtagcctacaagatcgtgaagaaggcgacagcgccatcatgaagtccgagct
ggagtacggcaactgtaacaccaagtgccagacccccatgggcgccatcaacagcagcatg
cccttcacaacatccacccctgaccatcggcgagtgcaccaagtacgtgaagagcaaca
ggctggtgctggccaccggcctgagaaacagccccagagagcggagaagaaagagagg
cctgttcggcgccattgccggcttcatcgagggcggtggcagggcatggtggacgggtgg
tacggctaccaccactccaacgagcagggcgagcggctacgcgcgcgacaaagagagcacc
agaaagctatcgacggcgtgaccaacaaagtgaacagcatcatcgacaagatgaataccca
gttcgaggccgtgggcagagagttcaacaacctggaaagaagaatcgagaacctgaacaag
aaaatggaagatggcttcttgatgtgtggacctacaacgcgcgagctgctggtgctgatgg
aaaacgagcggacctggacttcacgacagcaacgtgaagaatctgtacgacaagtgcg
gctgcagctgagagacaacgccaagagctgggcaacggctgcttcgagttctaccacaag
tgcgacaatgagtgcacggaaagcgtgcggaacggcacctacgactacccccagtagcgcg
aggaagcccggtgaagagagaagagatttcggcgctgaagctggaaagcatcggcaccta
ccagatcctgagcatctacagcacctggccagcagcctggccctggccatcatggtggcc
ggcctgagcctgtggatgtgcagcaacggcagcctgcagtgccggatctgcatcgatcca
gatctgctagcgtcgactctagattaattaa

Cấu trúc được tối ưu hóa codon có thể được cài xen vào vector biểu hiện pTR600 (Công bố đơn patent Mỹ số 2002/0106798; Ross *et al.*, *Nat Immunol.* 1(2):102-103, 2000; Green *et al.*, *Vaccine* 20:242-248, 2001) và được dùng để sản xuất các VLP, như được thảo luận dưới đây trong Ví dụ 3.

Ví dụ 3: Điều chế và miễn dịch bằng các VLP cúm

Các phương pháp dưới đây có thể được sử dụng để tạo ra và biệt hóa các VLP cúm chứa HA COBRA. Các phương pháp minh họa để gây miễn dịch chuột, chồn và khỉ cũng được mô tả dưới đây (đồng thời xem, Giles and Ross, *Vaccine* 29(16):3043-3054, 2011).

Chế phẩm vắc-xin

Các tế bào 293T được chuyển nhiễm tạm thời bằng các plasmit biểu hiện M1, NA và HA được tối ưu hóa, và được ủ trong 72 giờ ở nhiệt độ 37°C. Các trình tự mã

hóa M1, NA và HA có thể là được tối ưu hóa codon để biểu hiện trong các tế bào động vật có vú. Các dịch nổi được thu gom và mảnh vụn tế bào được loại bỏ bằng cách ly tâm tốc độ chậm tiếp theo là lọc chân không qua thiết bị lọc vô trùng cỡ 0,22µm. Các VLP được tinh chế thông qua siêu ly tâm ($1.000.000 \text{ m/s}^2$ qua 20% glyxerol, khối lượng theo thể tích) trong 4 giờ ở nhiệt độ 4°C. Các viên thuốc nhỏ sau đó được tái huyền phù trong PBS, pH 7,2 và được bảo quản trong các lượng nhỏ sử dụng một lần ở nhiệt độ -80°C cho đến khi sử dụng. Tổng nồng độ protein được xác định bằng bộ kit chất phản ứng thử nghiệm protein Micro BCA™ (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA).

Xác định liều lượng

Hàm lượng HA đặc hiệu có thể được xác định bằng thẩm tách Western và phép đo tỷ trọng. HA COBRA tái tổ hợp được tinh chế và các VLP được tinh chế được điều chế với tổng khối protein tiêu chuẩn và được điện di trên 10% gel SDS-PAGE và được chuyển đến màng PVDF. Thẩm tách này được kiểm tra bằng kháng huyết thanh đa dòng ở chuột từ những con chuột bị nhiễm cúm và các phức HA-kháng thể được phát hiện bằng cách sử dụng IgG ở dê kháng chuột được liên hợp với peroxidaza cây cải ngựa (HRP) (Southern Biotech; Birmingham, AL, USA). HRP được phát hiện bằng chất phát quang hóa học (Pierce Biotechnology; Rockford IL, USA) và được tiếp xúc với màng tia X (ThermoFisher; Pittsburgh, PA, USA). Mật độ của các dải được xác định bằng cách sử dụng phần mềm ImageJ (NIH). Mật độ của các dải HA tái tổ hợp được dùng để tính đường cong tiêu chuẩn và mật độ của các VLP được tinh chế được nội suy bằng cách sử dụng các kết quả từ HA tái tổ hợp.

Nghiên cứu chuột

Chuột BALB/c (*Mus musculus*, giống cái, 6-8 tuần tuổi) có thể mua được từ Harlan Sprague Dawley (Indianapolis, IN, USA). Các con chuột được nhốt trong các lồng vi cách ly và được cho tiếp cận tự do với thực phẩm và nước uống và được chăm sóc theo sự hướng dẫn USDA cho các động vật phòng thí nghiệm. Các con chuột đã được chủng vắc-xin bằng liều được chọn của các VLP HA COBRA được tinh chế (như liều lượng bằng 3,0µg, 1,5µg, 0,6µg, 0,3µg hoặc 0,06µg), dựa vào hàm lượng HA từ thử nghiệm phép đo tỷ trọng, thông qua tiêm trong cơ ở tuần 0 và sau đó được tăng tốc với cùng liều lượng ở tuần 3. Các vắc-xin ở mỗi liều lượng được phối trộn

với chất phụ trợ phèn (Imject Alum, Pierce Biotechnology; Rockford, IL, USA), các oligonucleotit CpG, hoặc chỉ một mình chất dẫn thuốc. Mười bốn đến hai mươi một ngày sau mỗi lần chủng vắc-xin, máu được thu gom từ những con chuột đã được gây mê thông qua đám rối sau hốc mắt và được chuyển đến ống ly tâm. Các ống này được ly tâm và huyết thanh được loại bỏ và được làm đông lạnh ở nhiệt độ $-80 \pm 5^{\circ}\text{C}$. Chuẩn độ kháng thể huyết thanh ức chế ngưng kết tổ hồng cầu (HAI) cho mỗi nhóm vắc-xin được xác định ở tuần 5 bằng cách sử dụng các virus phân loại lại đại diện hoặc các VLP HA COBRA.

Ba tuần sau khi chủng vắc-xin cuối cùng, các con chuột được bị kích thích trong mũi bằng virus cúm H5N1 gây bệnh với thể tích là 50 μl . Sau khi nhiễm khuẩn, các con chuột được theo dõi hằng ngày về giảm cân, các dấu hiệu bệnh và chết trong 14 ngày sau khi nhiễm khuẩn. Thể trọng riêng, các điểm thang ốm (Toapanta and Ross, *Respiratory Research* 10(1):112, 2009) và sự chết được ghi lại cho mỗi nhóm vào mỗi ngày sau khi tiêm chủng.

Nghiên cứu chồn sương

Chồn Fitch (*Mustela putorius furo*, giống cái, 6-12-tháng tuổi), chưa bị cúm và bị ốm, có thể được mua từ trang trại Marshall Farms (Sayre, PA, USA). Chồn được nhốt theo cặp trong các lồng làm bằng thép không gỉ (Shor-line, Kansas City, KS, USA) chứa Sani-chips Laboratory Animal Bedding (P.J. Murphy Forester Products, Montville, NJ, USA). Chồn được cho ăn chế độ ăn cho chồn - Teklad Global Ferret Diet (Harlan Teklad, Madison, WI, USA) và uống nước sạch thoải mái. Các HA COBRA VLP được pha loãng trong PBS, pH 7,2 để đạt được nồng độ cuối cùng. Chồn đã được chủng vắc-xin bằng một trong hai liều COBRA VLP đã được tinh chế (15 μg , 3 μg), dựa vào hàm lượng HA như được xác định bằng thử nghiệm đo tỷ trọng, thông qua tiêm trong cơ trong cơ bốn đầu với thể tích là 0,25 ml ở tuần 0 và sau đó được tăng tốc với cùng liều lượng ở tuần 3. Bảo quản vắc-xin ở nhiệt độ -80°C trước khi dùng và được phối trộn với chất phụ trợ phèn (Imject Alum; Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) ngay trước khi dùng. Các động vật được theo dõi về tác dụng phụ bao gồm giảm cân, nhiệt độ, giảm vận động, chất tiết mũi, hắt hơi và tiêu chảy hằng tuần theo theo chế độ chủng vắc-xin. Trước khi chủng vắc-xin, các động vật được xác nhận bằng thử nghiệm HAI là âm tính với huyết thanh để làm tuần hoàn các virus cúm và cúm B. Mười bốn đến hai mươi một ngày sau mỗi lần

chủng vắc-xin, máu được lấy từ những con chồn bị gây mê thông qua tĩnh mạch chủ ở phía trước và được chuyển đến ống ly tâm. Các ống được ly tâm và huyết thanh được loại bỏ và được làm đông lạnh ở nhiệt độ $-80 \pm 5^{\circ}\text{C}$. Chuẩn độ kháng thể huyết thanh HAI cho mỗi nhóm vắc-xin được xác định ở tuần 5 bằng cách sử dụng các virus phân loại lại đại diện hoặc HA COBRA VLP.

Ba tuần sau khi chủng vắc-xin cuối cùng, chồn được kích thích trong mũi bằng virus cúm H5N1 gây bệnh với thể tích là 1 ml. Sau khi nhiễm khuẩn, chồn được theo dõi hằng ngày về giảm cân, các dấu hiệu bệnh và chết trong 14 ngày sau khi nhiễm khuẩn. Các thể trọng riêng, các điểm thang ốm, và sự chết được ghi cho mỗi nhóm vào mỗi ngày sau khi chủng vắc-xin. Tiến hành rửa mũi bằng cách nhỏ giọt 3 ml PBS vào trong hai lỗ mũi của chồn đã được gây mê mỗi ngày trong 7 ngày sau khi chủng vắc-xin. Các dịch rửa được thu gom và được bảo quản ở nhiệt độ -80°C cho đến khi sử dụng.

Gây miễn dịch động vật linh trưởng

Khỉ *Cynomolgus* (*Macaca fascicularis*, giống đực, 3-5 năm tuổi) có thể được mua từ Harlan Sprague Dawley (Indianapolis, IN, USA). Các con khỉ đã được chủng vắc-xin bằng các HA COBRA VLP đã được tinh chế ($15\mu\text{g}$), dựa vào hàm lượng HA từ thử nghiệm phép đo tỷ trọng, thông qua tiêm trong cơ ở tuần 0 và sau đó được tăng tốc với cùng liều lượng ở các tuần 3 và 6. Các vắc-xin được phối trộn với chất phụ trợ phen (Imject Alum, Pierce Biotechnology; Rockford, IL, USA) ngay trước khi dùng. Hai mươi một ngày sau mỗi lần chủng vắc-xin, máu được thu gom từ các con khỉ đã được gây mê thông qua tĩnh mạch đùi và được chuyển đến ống tách huyết thanh. Các ống được để hoạt hóa cục vón tiếp theo là ly tâm và huyết thanh được loại bỏ và được làm đông lạnh ở nhiệt độ $-80 \pm 5^{\circ}\text{C}$. Chuẩn độ IgG điểm cuối và chuẩn độ kháng thể huyết thanh HAI cho mỗi nhóm vắc-xin được xác định ở tuần 5 bằng cách sử dụng các virus phân loại lại đại diện hoặc các HA COBRA VLP.

Ba tuần sau khi chủng vắc-xin cuối cùng, các con khỉ được kích thích bằng cách tiêm chủng trong mũi, trong khí quản và hốc mắt bằng virus cúm H5N1 gây bệnh với thể tích là 1 ml. Sau khi nhiễm khuẩn, các con khỉ được theo dõi hằng ngày về giảm cân, các dấu hiệu bệnh và chết trong 5 ngày sau khi nhiễm khuẩn. Các thể trọng riêng, các điểm thang ốm và sự chết được ghi cho mỗi nhóm vào mỗi ngày sau

khi chủng vắc-xin.

Ví dụ 4: Tính sinh miễn dịch và hiệu quả bảo vệ của các VLP chứa HA COBRA

Ví dụ này mô tả năm nghiên cứu về chuột để thử nghiệm tính sinh miễn dịch và hiệu quả bảo vệ của VLP All H5 COBRA và các VLP COBRA-2 ở người-chim.

Nghiên cứu COBRA 1A

Nghiên cứu này được tiến hành để thử nghiệm tính sinh miễn dịch của All H5 COBRA và COBRA-2 ở người-chim, và hiệu quả bảo vệ chống lại các thách thức nhánh gai nổi 1 và nhánh gai nổi 2. Các VLP chứa HA COBRA nhánh gai nổi 2 ở người (các VLP COBRA-2 ở người) được sử dụng để so sánh. Các con chuột đã được chủng vắc-xin trong cơ bằng 3µg VLP chứa trình tự HA All H5 COBRA (SEQ ID NO: 1), các VLP chứa trình tự HA COBRA-2 ở người-chim (SEQ ID NO: 3), các VLP chứa trình tự HA COBRA-2 ở người, hoặc các VLP chứa virus cúm HA Whooper Swan (A/Whooper Swan/Mongolia/244/2005). Chủng vắc-xin được thực hiện ở tuần 0 và tuần 3 với tá được (Imject™). Các con chuột đã được thách thức bằng 5000 PFU của virus nhánh gai nổi 2.1 Indonesia (A/Indonesia/5/2005) hoặc 5000 PFU của virus nhánh gai nổi 1 Vietnam (A/Vietnam/1203/2004) trong tuần thứ 5. Các mẫu máu được thu gom ở tuần thứ 3 và tuần thứ 5. Phổi được thu hoạch ở ngày thứ 3 (D3) sau khi kích thích đối với chuẩn độ virus.

Chuẩn độ HAI kháng VLP All H5 COBRA (đối chứng dương), virus nhánh gai nổi 1 Vietnam, virus nhánh gai nổi 2.1.3 Indonesia, virus nhánh gai nổi 2.2 Whooper Swan, virus nhánh gai nổi 2.2 Turkey (Tk/Tk/05), hai virus nhánh gai nổi 2.2.1 Egypt (Eg/321/07 và Eg/3300/08), virus nhánh gai nổi 2.3.4 Anhui (Anhui/1/2005), virus nhánh gai nổi 2.3.4 mắt màu trắng Nhật Bản (JWE/1038/06) và virus nhánh gai nổi 7 Vietnam ở gà (Ck/VN/08) ở các con chuột đã được chủng vắc-xin được thể hiện trong FIG. 3. Các kết quả chứng minh rằng việc chủng vắc-xin bằng các VLP chứa HA All H5 COBRA và COBRA-2 ở người-chim kích thích đáp ứng kháng thể mà có thể nhận ra cả hai virus cúm nhánh gai nổi 1 và nhánh gai nổi 2. Trọng lượng cơ thể của các con chuột đã được chủng vắc-xin và chưa được chủng vắc-xin cho đến ngày thứ 14 (D14) sau khi thách thức bằng nhánh gai nổi 2.1 Indonesia và bằng nhánh gai nổi 1 Vietnam lần lượt được thể hiện trong FIG. 4 và FIG. 5. Tất cả các con chuột đã được chủng vắc-xin thể hiện sự thay đổi rất ít về thể

trọng theo thời gian, trong khi các con chuột chưa được chủng vắc-xin thể hiện giảm cân đáng kể. Ngoài ra, chuẩn độ virus ở những con chuột chưa được chủng vắc-xin sau khi kích thích bằng virus nhánh gai nổi 2.2 Whooper Swan (FIG. 6) hoặc virus nhánh gai nổi 1 Vietnam (FIG. 7) là lớn hơn một cách đáng kể so với chuẩn độ virus ở các con chuột đã được chủng vắc-xin sau khi kích thích.

Nghiên cứu COBRA 2A

Nghiên cứu này được tiến hành để thử nghiệm hiệu quả bảo vệ chống lại thách thức nhánh gai nổi 1 sau khi chủng vắc-xin một lần của các con chuột bằng các VLP chứa All H5 COBRA, COBRA-2 ở người-chim, hoặc HA COBRA-2 ở người. Các con chuột đã được chủng vắc-xin trong cơ bằng 3 μ g của các VLP All H5 COBRA, các VLP COBRA-2 ở người-chim, các VLP COBRA-2 ở người, hoặc các VLP Whooper Swan. Việc chủng vắc-xin được thực hiện với tá dược (Imject™). Các con chuột đã được thách thức bằng 5000 PFU của virus nhánh gai nổi 1 Vietnam trong tuần thứ 4. Các mẫu máu được thu gom ở tuần 3. Phổi được thu hoạch vào ngày thứ 2 (D2) và ngày 3 (D3) sau khi kích thích để chuẩn độ virus.

Như được thể hiện trên FIG. 8, thể trọng của các con chuột đã được chủng vắc-xin không thay đổi một cách đáng kể sau khi kích thích bằng virus nhánh gai nổi 1 Vietnam, trong khi các con chuột chưa được chủng vắc-xin thể hiện giảm cân đáng kể. Chuẩn độ virus vào ngày D2 và D3 ở những con chuột chưa được chủng vắc-xin cũng lớn hơn một cách đáng kể so với các con chuột đã được vắc-xin (FIG. 9).

Nghiên cứu COBRA 4A

Nghiên cứu này được tiến hành để thử nghiệm hiệu quả bảo vệ chống lại virus nhánh gai nổi 1 sau khi chủng vắc-xin một lần khi không có tá dược. Các con chuột đã được chủng vắc-xin trong cơ bằng 3 μ g của VLP All H5 COBRA, các VLP COBRA-2 ở người-chim, các VLP COBRA-2 ở người, hoặc các VLP Whooper Swan. Các con chuột đã được thách thức bằng 5000 PFU của virus nhánh gai nổi 1 Vietnam trong tuần 4. Các mẫu máu được thu gom ở tuần 3. Các phổi được thu hoạch vào các ngày D2 và D3 sau khi kích thích đối với chuẩn độ virus.

Như được thể hiện trên FIG.10, thể trọng của tất cả các con chuột đã được chủng vắc-xin không có tá dược sụt giảm ban đầu sau khi thách thức nhánh gai nổi 1, nhưng trở về bình thường vào ngày D10 sau khi kích thích. Trái lại, khối lượng

của các con chuột chưa được chủng vắc-xin sụt giảm một cách đáng kể và không phục hồi. Các con chuột chưa được chủng vắc-xin chết vì nhiễm khuẩn vào ngày thứ 7, trong khi 40-60% chuột đã được chủng vắc-xin sống sót ngoài ngày thứ 14 (FIG. 11). Đặc biệt là, 60% con chuột đã được chủng vắc-xin bằng VLP All H5 COBRA hoặc thách thức sống sót các VLP COBRA-2 ở người, và 40% con chuột đã được chủng vắc-xin bằng COBRA-2 ở người-chim hoặc các VLP thách thức sống sót Whooper Swan.

Nghiên cứu COBRA 5A

Nghiên cứu này được tiến hành để thử nghiệm hiệu quả bảo vệ chống lại virus nhánh gai nổi 1 sau khi chủng vắc-xin một lần bằng tá dược (Imject™) ở liều lượng thấp hơn là VLP (0,6µg). Các con chuột đã được chủng vắc-xin trong cơ bằng 0,6µg của VLP All H5 COBRA, các VLP COBRA-2 ở người-chim, các VLP COBRA-2 ở người, hoặc các VLP Whooper Swan. Các con chuột đã được thách thức bằng 5000 PFU của virus nhánh gai nổi 1 Vietnam trong tuần 4. Các mẫu máu được thu gom ở tuần 3. Các phổi được thu hoạch vào D2 và D3 sau khi kích thích đối với chuẩn độ virus.

Như được thể hiện trên FIG. 12, thể trọng của các con chuột đã được chủng vắc-xin giảm nhẹ sau khi thách thức virus nhưng trở về mức bình thường vào ngày D10. Trái lại, thể trọng của các con chuột chưa được chủng vắc-xin sụt giảm một cách đáng kể và các con chuột không hồi phục. Chuẩn độ virus ở ngày D2 và D3 ở những con chuột chưa được chủng vắc-xin cũng là lớn hơn so với các con chuột đã được chủng vắc-xin (FIG. 13 và FIG. 14).

Nghiên cứu COBRA 9A

Nghiên cứu này được tiến hành để thử nghiệm hiệu quả bảo vệ chống lại virus nhánh gai nổi 2.2 sau khi chủng vắc-xin một lần với tá dược (Imject™) ở liều lượng thấp hơn là VLP (0,6µg). Các con chuột đã được chủng vắc-xin trong cơ bằng 0,6µg của VLP All H5 COBRA, các VLP COBRA-2 ở người-chim, các VLP COBRA-2 ở người, hoặc các VLP Whooper Swan. Các con chuột đã được thách thức bằng 5000 PFU của virus nhánh gai nổi 2.2 Whooper Swan trong tuần 4. Các mẫu máu được thu gom ở tuần 3. Các phổi được thu hoạch vào D2 và D3 sau khi kích thích đối với chuẩn độ virus.

Như được thể hiện trên FIG. 15, thể trọng của các con chuột đã được chủng vắc-xin giảm nhẹ sau khi thách thức virus nhưng trở về mức bình thường vào ngày D10. Trái lại, thể trọng của các con chuột chưa được chủng vắc-xin sụt giảm một cách đáng kể và các con chuột không hồi phục. Chuẩn độ virus ở D2 và D3 ở những con chuột chưa được chủng vắc-xin cũng tăng lên liên quan đến các con chuột đã được chủng vắc-xin (FIG. 16 và FIG. 17).

Xét về các phương án có thể mà các nguyên tắc của sáng chế được bộc lộ có thể được áp dụng đối với các phương án đó, cần biết rằng các phương án minh họa chỉ là các ví dụ thực hiện được ưu tiên của sáng chế và không được dùng làm giới hạn phạm vi của sáng chế. Hơn nữa, phạm vi của sáng chế được xác định bằng các điểm yêu cầu bảo hộ dưới đây. Do đó, các tác giả sáng chế cho rằng phạm vi và tinh thần của sáng chế nằm trong các điểm yêu cầu bảo hộ sau đây.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Polypeptit ngưng kết tổ hồng cầu (HA) cúm tái tổ hợp, bao gồm trình tự axit amin tương đồng ít nhất 99,6% với SEQ ID NO: 3, hoặc tương đồng ít nhất 99,6% với các gốc 2-567 của SEQ ID NO: 3.
2. Polypeptit HA cúm theo điểm 1, trong đó trình tự axit amin của polypeptit này bao gồm không quá 2 sự thay thế axit amin liên quan đến SEQ ID NO: 3.
3. Polypeptit HA cúm theo điểm 1, trong đó polypeptit này bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 3, hoặc các gốc 2-567 của SEQ ID NO: 3.
4. Hạt giống như virut cúm (VLP) chứa polypeptit HA cúm theo điểm 1.
5. VLP cúm theo điểm 4, trong đó VLP cúm này còn chứa protein neuraminidaza (NA) cúm, protein nền cúm (M1), hoặc cả hai protein này.
6. VLP cúm chứa polypeptit HA cúm theo điểm 1, được tạo ra bằng cách chuyển nhiễm tế bào chủ bằng vector mã hóa polypeptit HA, vector mã hóa protein NA cúm và vector mã hóa protein M1 cúm trong các điều kiện đủ để cho phép biểu hiện các protein HA, M1 và NA.
7. Protein dung hợp chứa polypeptit HA cúm theo điểm 1.
8. Dược phẩm chứa polypeptit HA cúm theo điểm 1 và chất mang dược dụng.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> UNIVERSITY OF PITTSBURGH - OF THE COMMONWEALTH SYSTEM OF
 HIGHER EDUCATION
 Ross, Ted M.
 Crevar, Corey J.
 Giles, Brendan M.

<120> POLYPEPTIT NGUNG KẾT TỔ HỒNG CẦU CÚM TÁI TỔ HỢP VÀ DUỘC PHẨM CHỨA
 POLYPEPTIT NÀY

<130> 8123-88295-02

<150> US 61/597,998
 <151> 2012-02-13

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 566
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Polypeptit tổng hợp

<400> 1

Met Glu Lys Ile Val Leu Leu Leu Ala Ile Val Ser Leu Val Lys Ser
 1 5 10 15

Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Glu Gln Val
 20 25 30

Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile
 35 40 45

Leu Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys
 50 55 60

Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn
 65 70 75 80

Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val
 85 90 95

Glu Lys Ala Ser Pro Ala Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asp Phe Asn
 100 105 110

Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu
 115 120 125

Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys Ser Ser Trp Ser Asn His Glu Ala Ser
 130 135 140

Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Gln Gly Lys Ser Ser Phe Phe
 145 150 155 160

Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Ser Ala Tyr Pro Thr Ile
 165 170 175

Lys Arg Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Gln Glu Asp Leu Leu Val Leu Trp
 180 185 190

Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Lys Leu Tyr Gln
 195 200 205

Asn Pro Thr Thr Tyr Ile Ser Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg
 210 215 220

Leu Val Pro Lys Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly
 225 230 235 240

Arg Met Glu Phe Phe Trp Thr Ile Leu Lys Pro Asn Asp Ala Ile Asn
 245 250 255

Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile
 260 265 270

Val Lys Lys Gly Asp Ser Ala Ile Met Lys Ser Glu Leu Glu Tyr Gly
 275 280 285

Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Met Gly Ala Ile Asn Ser Ser
 290 295 300

Met Pro Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys
 305 310 315 320

Tyr Val Lys Ser Asn Arg Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Ser
 325 330 335

Pro Gln Arg Glu Arg Arg Arg Lys Lys Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile

340	345	350
Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr 355 360 365		
Gly Tyr His His Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys 370 375 380		
Glu Ser Thr Gln Lys Ala Ile Asp Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser 385 390 395 400		
Ile Ile Asp Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe 405 410 415		
Asn Asn Leu Glu Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp 420 425 430		
Gly Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met 435 440 445		
Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu 450 455 460		
Tyr Asp Lys Val Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly 465 470 475 480		
Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu 485 490 495		
Ser Val Arg Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala 500 505 510		
Arg Leu Lys Arg Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly 515 520 525		
Thr Tyr Gln Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala 530 535 540		
Leu Ala Ile Met Val Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met Cys Ser Asn Gly 545 550 555 560		
Ser Leu Gln Cys Arg Ile 565		

<210> 2
 <211> 1736
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Polynucleotit tổng hợp

<400> 2
 atggaaaaga tcgtgctgct gctggccatc gtgtccctgg tgaagagcga ccagatttgc 60
 attggctacc acgccaacaa tagcacagag caggtggaca ccatcatgga gaaaaacgtg 120
 accgtgaccc acgcccagga catcctggag aaaaccaca acggcaagct gtgtgacctg 180
 gacggcgtga agcccctgat cctgagagac tgctccgtgg ccggctggct gctgggcaac 240
 cccatgtgtg acgagttcat caacgtgccc gagtggagct acatcgtgga gaaggccagc 300
 cccgccaacg acctgtgcta ccccggcgac ttcaacgact acgaggagct gaagcacctg 360
 ctgtcccgga tcaaccactt cgagaagatc cagatcatcc ccaagagcag ctggagcaac 420
 cacgaggcca gcagcggcgt gtccagcgcc tgcccctacc agggcaagag cagcttcttc 480
 cggaacgtgg tctggctgat caagaagaac tctgcctatc ccaccatcaa gcggagctac 540
 aacaacacca accaggagga tctgctggtc ctgtggggca tccaccaccc caacgacgcc 600
 gccgagcaga ccaagctgta ccagaacccc accacctaca tcagcgtggg caccagcacc 660
 ctgaaccagc ggctggtgcc caagatcgcc acccggtcca aagtgaacgg ccagagcggc 720
 cggatggaat tcttctggac catcctgaag cccaacgatg ccatcaactt cgagagcaac 780
 ggcaacttca tcgcccccgga gtacgcctac aagatcgtga agaagggcga cagcgccatc 840
 atgaagagcg agctggaata cggcaactgc aacaccaagt gccagacccc catgggcgcc 900
 atcaacagca gcatgccctt ccacaacatc cccccctga ccatcggcga gtgcccgaag 960
 tacgtgaaga gcaacaggct ggtgctggcc accggcctgc ggaacagccc ccagcgggag 1020
 cggcggagga agaagcgggg cctgttcggc gccatcgccg gcttcatcga gggcggctgg 1080
 cagggcatgg tggacgggtg gtacggctac caccacagca atgagcaggg cagcggctac 1140
 gccgccgaca aagagagcac ccagaaggcc atcgacggcg tcaccaacaa ggtgaacagc 1200
 atcatcgaca agatgaacac ccagttcgag gccgtgggccc gggagttcaa caacctggaa 1260
 cggcgggatcg agaacctgaa caagaaaatg gaagatggct tcctggacgt gtggacctac 1320
 aacgccgaac tcctggtgct gatggaaaac gagcggaccc tggacttcca cgacagcaac 1380
 gtgaagaacc tgtacgacaa agtgcggtg cagctgcggg acaacgccaa agagctgggc 1440

aacggctgct tcgagttcta ccacaagtgc gacaacgagt gcatggaaag cgtgcggaac 1500
 ggcacctacg actaccccca gtacagcgag gaagcccggc tgaagcggga ggaaatcagc 1560
 ggcgtgaaac tggaagcat cggcacctac cagatcctga gcatctacag caccgtggcc 1620
 agcagcctcg ctctggccat tatggtggcc ggcctgagcc tgtggatgtg cagcaacggc 1680
 agcctgcagt gccggatcgg atccagatct gctagcgtcg actctagatt aattaa 1736

<210> 3
 <211> 567
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Polypeptit tổng hợp

<400> 3

Met Glu Lys Ile Val Leu Leu Leu Ala Ile Val Ser Leu Val Lys Ser
 1 5 10 15

Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Glu Gln Val
 20 25 30

Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile
 35 40 45

Leu Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys
 50 55 60

Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn
 65 70 75 80

Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val
 85 90 95

Glu Lys Ala Asn Pro Ala Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asn Phe Asn
 100 105 110

Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu
 115 120 125

Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys Ser Ser Trp Ser Asp His Glu Ala Ser
 130 135 140

Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Gln Gly Lys Ser Ser Phe Phe
145 150 155 160

Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Ser Ala Tyr Pro Thr Ile
165 170 175

Lys Arg Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Gln Glu Asp Leu Leu Val Leu Trp
180 185 190

Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Arg Leu Tyr Gln
195 200 205

Asn Pro Thr Thr Tyr Ile Ser Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg
210 215 220

Leu Val Pro Lys Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly
225 230 235 240

Arg Met Glu Phe Phe Trp Thr Ile Leu Lys Pro Asn Asp Ala Ile Asn
245 250 255

Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile
260 265 270

Val Lys Lys Gly Asp Ser Ala Ile Met Lys Ser Glu Leu Glu Tyr Gly
275 280 285

Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Met Gly Ala Ile Asn Ser Ser
290 295 300

Met Pro Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys
305 310 315 320

Tyr Val Lys Ser Asn Arg Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Ser
325 330 335

Pro Gln Arg Glu Arg Arg Arg Lys Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala
340 345 350

Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly
355 360 365

Tyr His His Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys Glu
 370 375 380

Ser Thr Gln Lys Ala Ile Asp Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser Ile
 385 390 395 400

Ile Asp Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe Asn
 405 410 415

Asn Leu Glu Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp Gly
 420 425 430

Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met Glu
 435 440 445

Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr
 450 455 460

Asp Lys Val Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly Asn
 465 470 475 480

Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu Ser
 485 490 495

Val Arg Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala Arg
 500 505 510

Leu Lys Arg Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly Thr
 515 520 525

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

Ala Ile Met Val Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser
 545 550 555 560

Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile
 565

<210> 4

<211> 1739

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

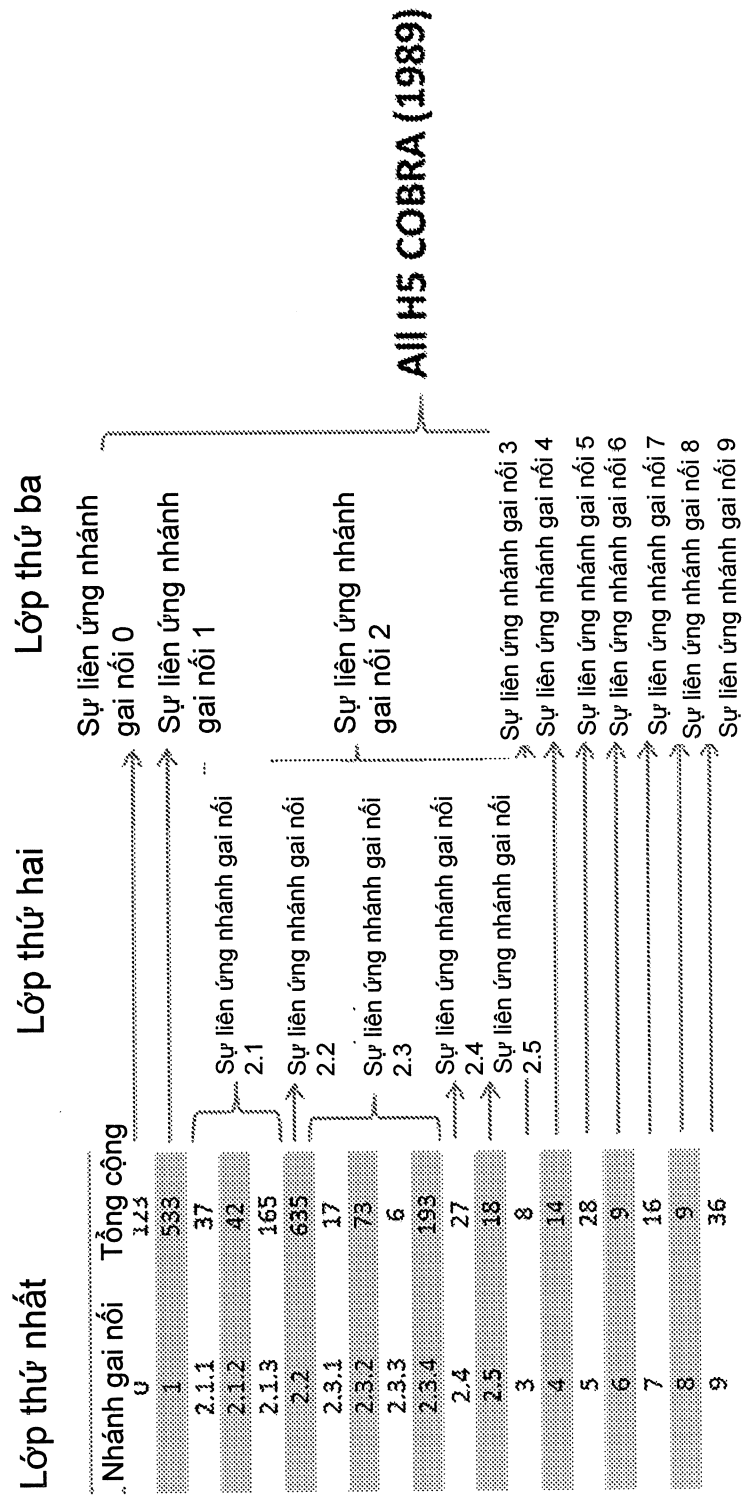
<223> Polynucleotit tổng hợp

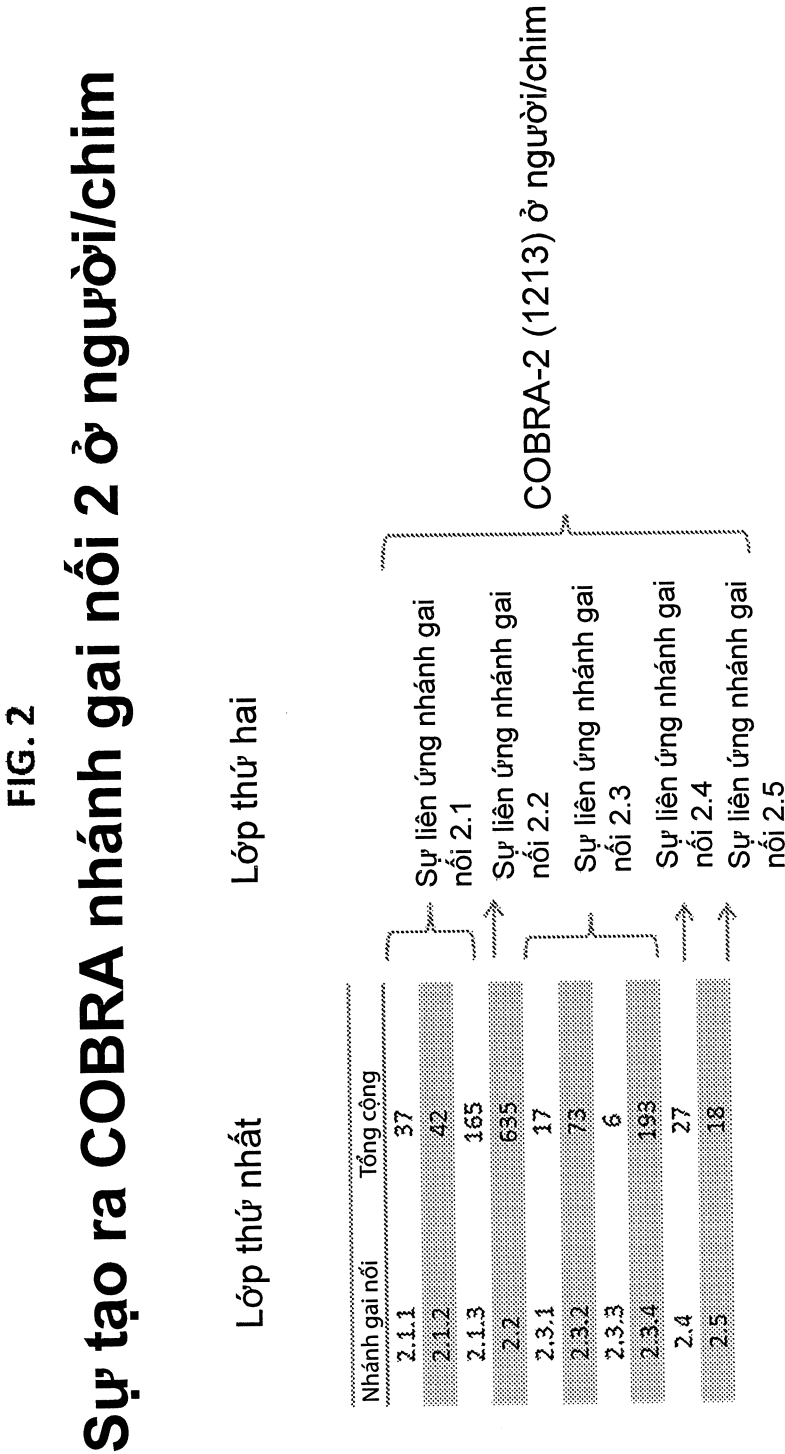
<400> 4

atggagaaga tcgtgctgct gctggccatc gtgtccctgg tgaagagcga ccagatttgc	60
atcggctacc acgccaacaa tagcaccgag caagtggaca ccatcatgga gaaaaacgtg	120
accgtgaccc acgctcagga catcctcgaa aaaacccaca acggcaagct gtgcgatctg	180
gacggcgtga agccccctgat cctgagagac tgcagcgtgg cgggctggct gctgggcaat	240
cccatgtgcg acgagttcat caacgtgccc gagtggagct acatcgtgga gaaggccaac	300
cccgccaacg acctgtgcta ccccggaac ttcaacgact acgaggagct gaagcacctg	360
ctgagccgga tcaaccactt cgagaagatc cagatcatcc ccaagagcag ctggagcgac	420
catgaggcaa gcagcggcgt gtccagcgcc tgcccctacc agggcaagtc cagcttcttc	480
cgcaacgttg tgtggctgat caagaagaac agcgcctacc ccaccatcaa gcggagctac	540
aacaacacca accaggagga cctgctggtc ctgtggggca tccaccaccc caacgacgcc	600
gccgagcaga cccggctgta ccagaacccc accacctaca tctctgtggg caccagcacc	660
ctgaaccagc ggctggtgcc caagatcgcc acccgagca aggtgaacgg ccagagcggc	720
cggatggagt tcttctggac catcctgaag cccaacgatg ccatcaactt cgagagcaac	780
ggcaacttca tcgccccga gtacgcctac aagatcgtga agaagggcga cagcgccatc	840
atgaagtccg agctggagta cggcaactgt aacaccaagt gccagacccc catgggcgcc	900
atcaacagca gcatgccctt ccacaacatc cccccctga ccatcggcga gtgcccgaag	960
tacgtgaaga gcaacaggct ggtgctggcc accggcctga gaaacagccc ccagagagag	1020
cggagaagaa agagaggcct gttcggcgcc attgccggct tcatcgaggg cggctggcag	1080
ggcatggtgg acgggtggta cggctaccac cactccaacg agcagggcag cggctacgcc	1140
gccgacaaag agagcaccca gaaagctatc gacggcgtga ccaacaaagt gaacagcatc	1200
atcgacaaga tgaataccca gttcgaggcc gtgggcagag agttcaacaa cctggaaaga	1260
agaatcgaga acctgaacaa gaaaatggaa gatggctttc tggatgtgtg gacctacaac	1320
gccgagctgc tgggtgctgat ggaaaacgag cggaccctgg acttccacga cagcaacgtg	1380
aagaatctgt acgacaaagt gcggctgcag ctgagagaca acgccaaga gctgggcaac	1440
ggctgcttcg agttctacca caagtgcgac aatgagtgca tggaaagcgt gcggaacggc	1500
acctacgact acccccagta cagcgaggaa gcccggtgta agagagaaga gatttccggc	1560
gtgaagctgg aaagcatcgg cacctaccag atcctgagca tctacagcac cgtggccagc	1620

agcctggccc	tggccatcat	ggtggccggc	ctgagcctgt	ggatgtgcag	caacggcagc	1680
ctgcagtgcc	ggatctgcat	cggatccaga	tctgctagcg	tcgactctag	attaattaa	1739

FIG. 1
Sự tạo ra AII H5 COBRA

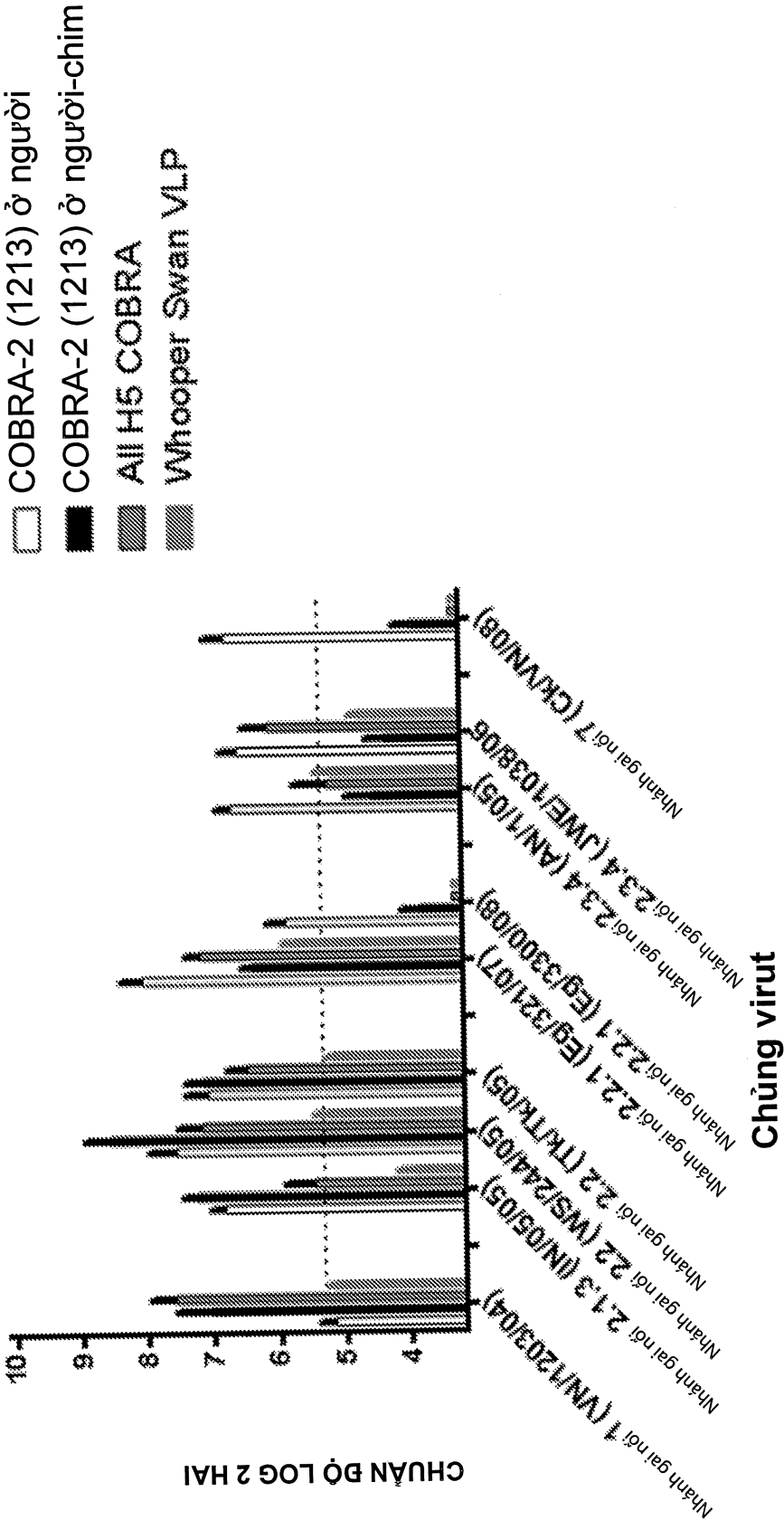




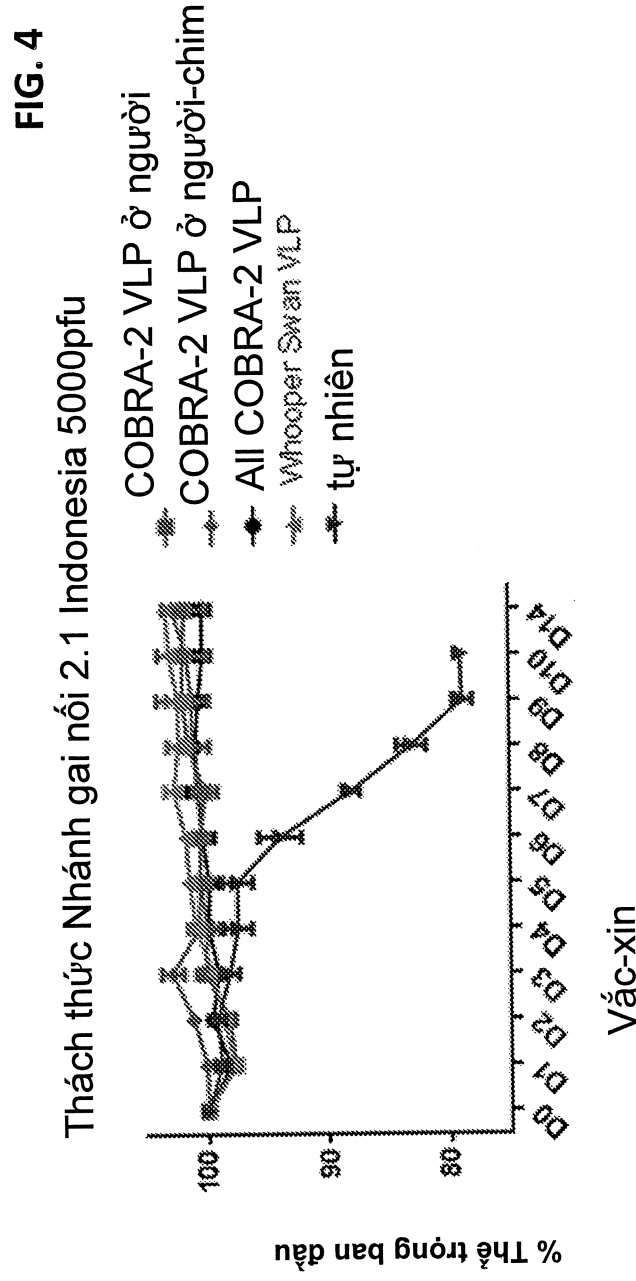
1A HAI

FIG. 3

Chuẩn độ HAI đối với H5N1



THÁCH THỨC NGHIỆN CỨU COBRA 1A INDONESIA

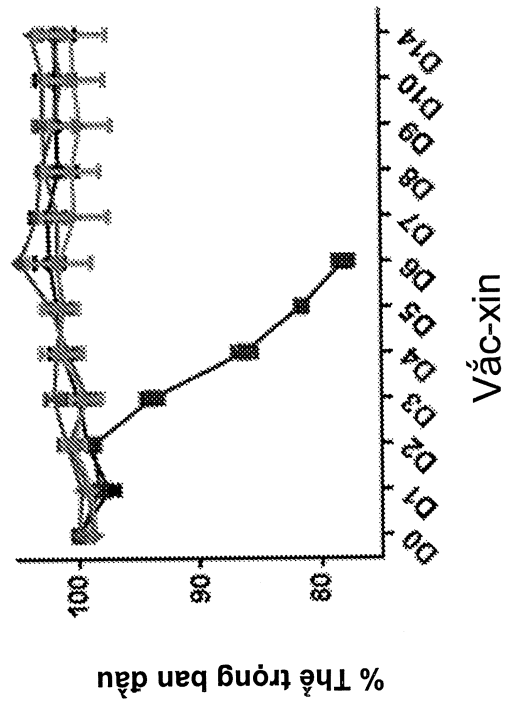


THÁCH THỨC NGHIỆN CỨU COBRA 1A VIETNAM

Thách thức Nhánh gai nói 1 Vietnam 5000pfu

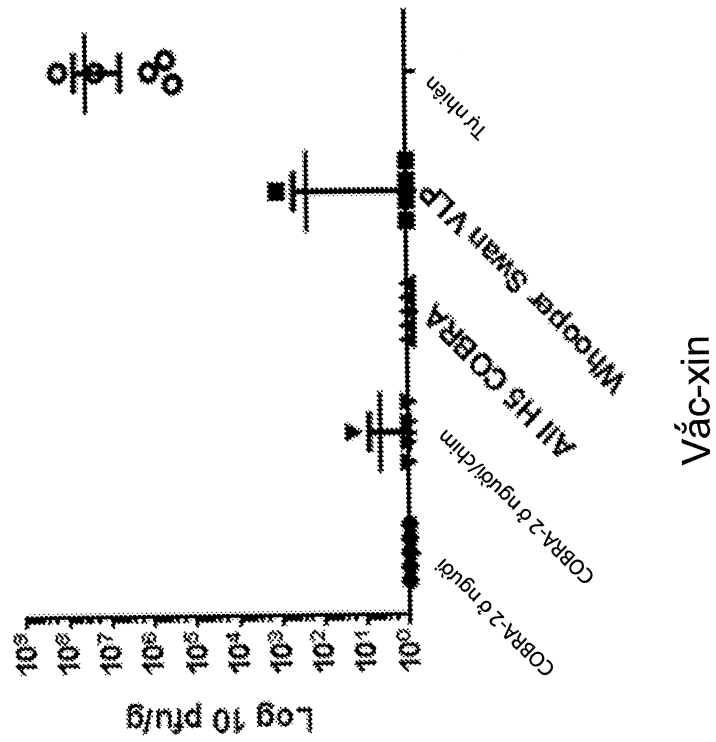
FIG. 5

COBRA-2 VLP ở người
 COBRA-2 VLP ở người-chim
 All H5 COBRA VLP
 Whooper Swan VLP
 tự nhiên



CHUẨN ĐỘ VIRUT NGHIÊN CỨU COBRA 1A INDONESIA NGÀY THỨ 3

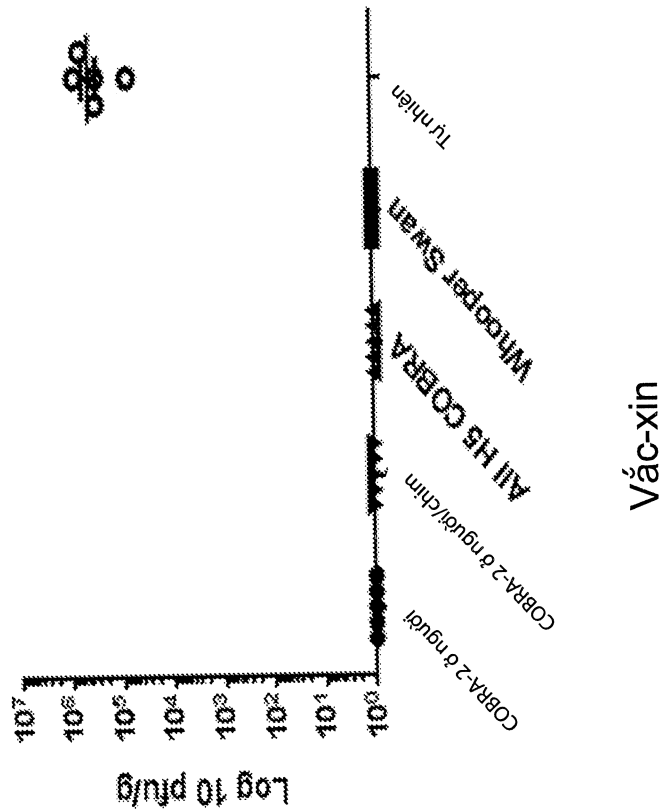
FIG. 6
 Thách thức 1A Whooper Swan 5000pfu D3



CHUẨN ĐỘ VIRUT NGHIÊN CỨU COBRA 1A VIETNAM
NGÀY THỨ 3

FIG. 7

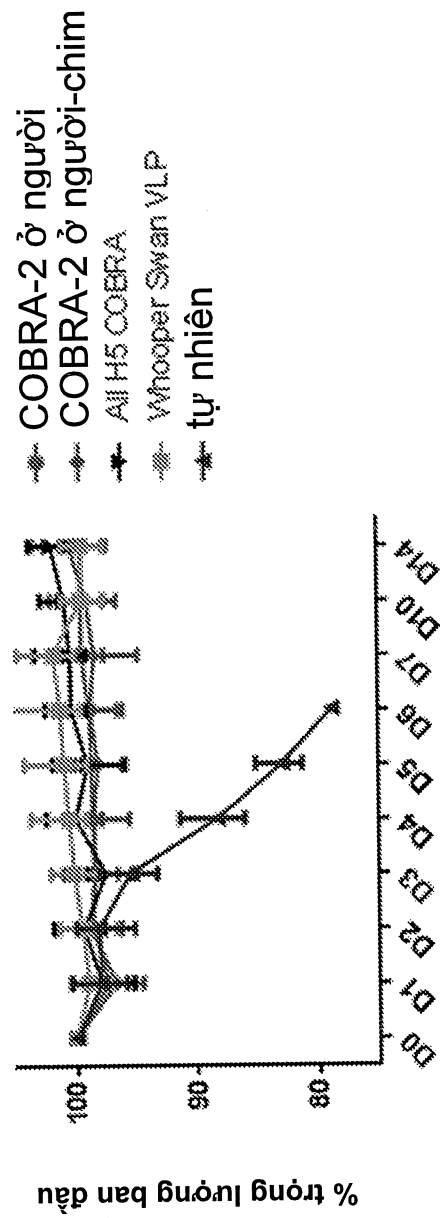
Thách thức 1A Vietnam 5000pfu D3



THÁCH THỨC NGHIỆM CỨU COBRA 2A VIETNAM

FIG. 8

Thách thức nhánh gai nối 1 2A Vietnam 5000pfu

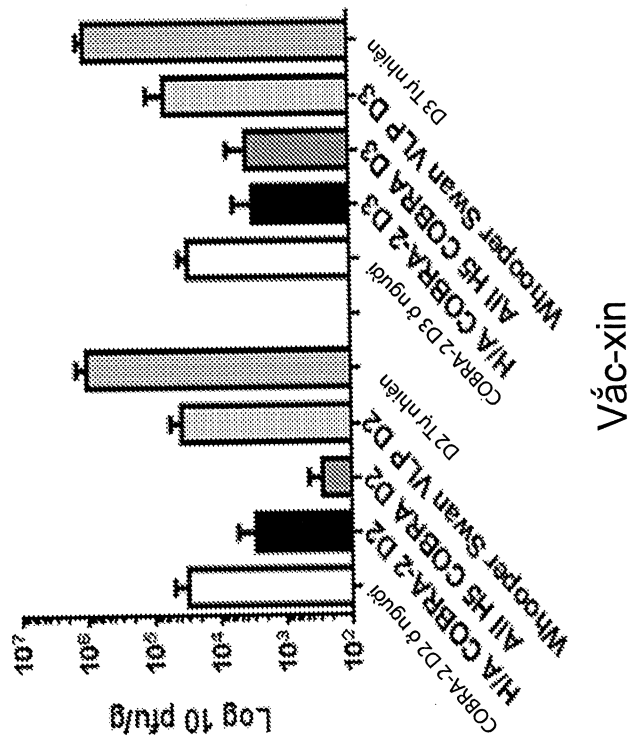


Những ngày sau nhiễm khuẩn

CHUẨN ĐỘ VIRUT NGHIÊN CỨU COBRA 2A VIETNAM
NGÀY THỨ 2 VÀ 3

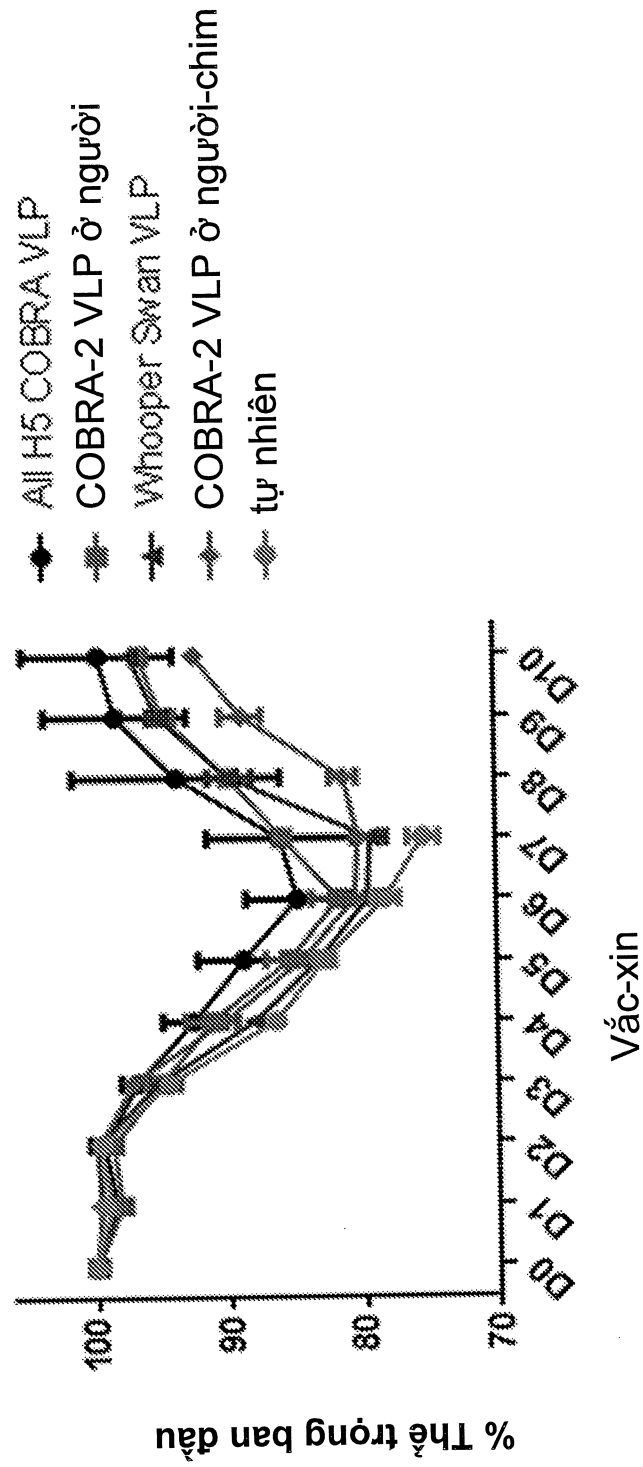
FIG. 9

Thách thức 5000pfu Vietnam



THÁCH THỨC NGHIỆM CỨU COBRA 4A VIETNAM

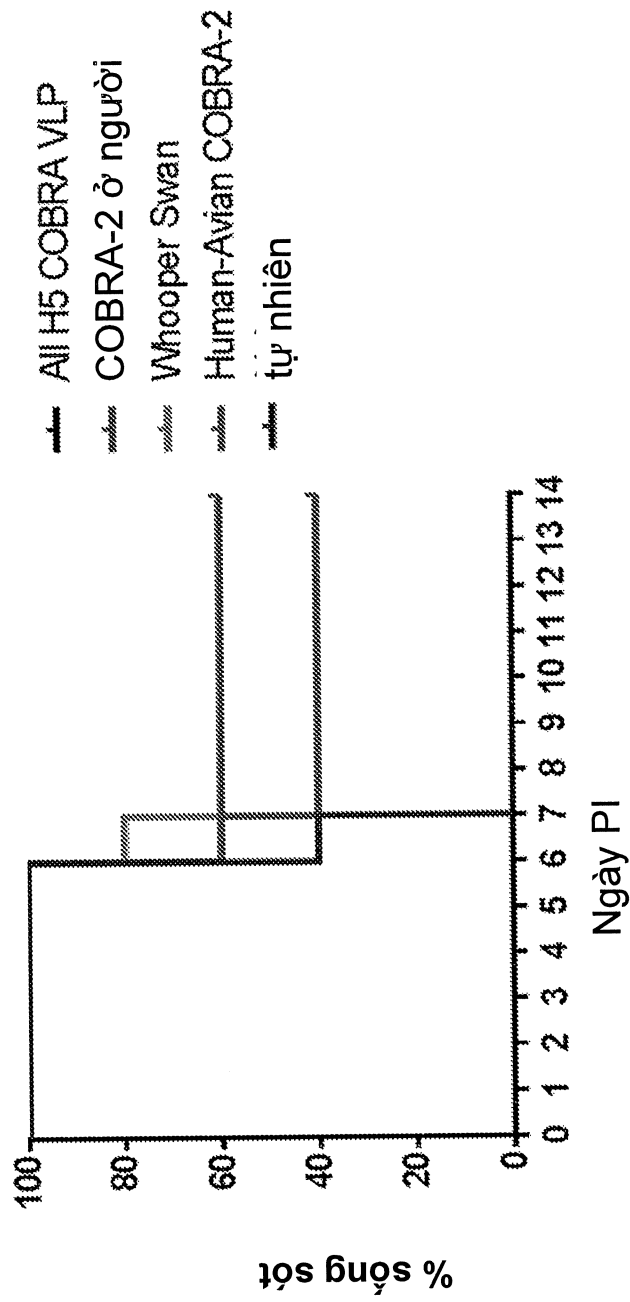
Thách thức nhánh gai nối 1 4A Vietnam 5000pfu **FIG. 10**



PHẦN TRĂM SỐNG SỐT NGHIÊN CỨU COBRA 4A

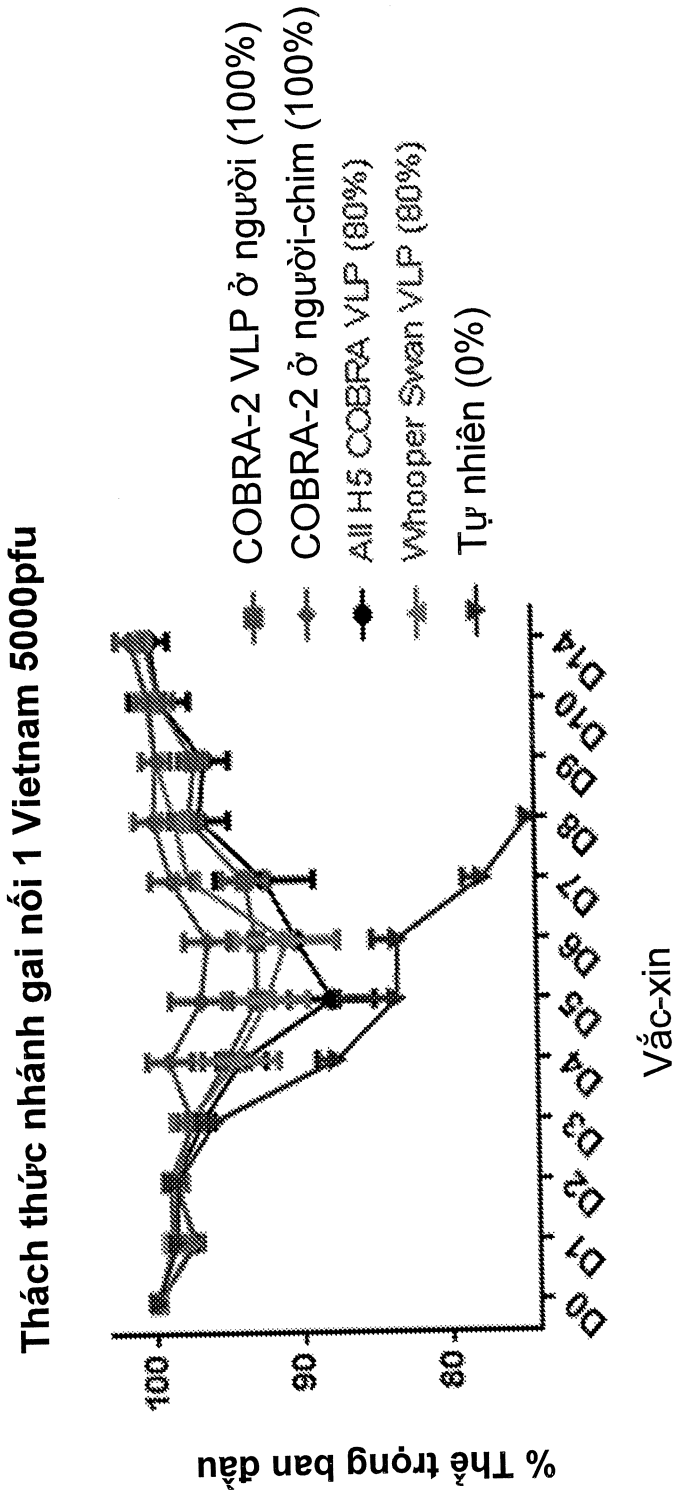
FIG. 11

Phần trăm sống sót nhánh gai nối 1 4A Vietnam



THÁCH THỨC SỐT NGHIÊN CỨU COBRA 5A VIETNAM

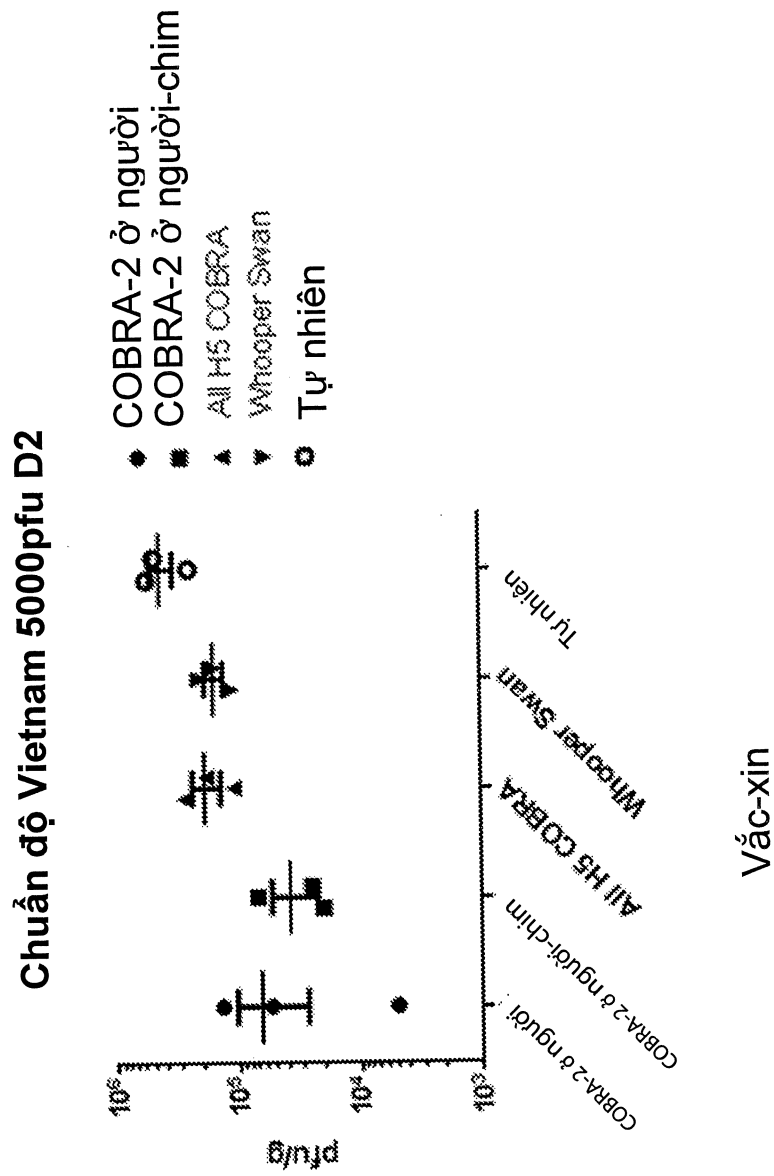
FIG. 12



12/17

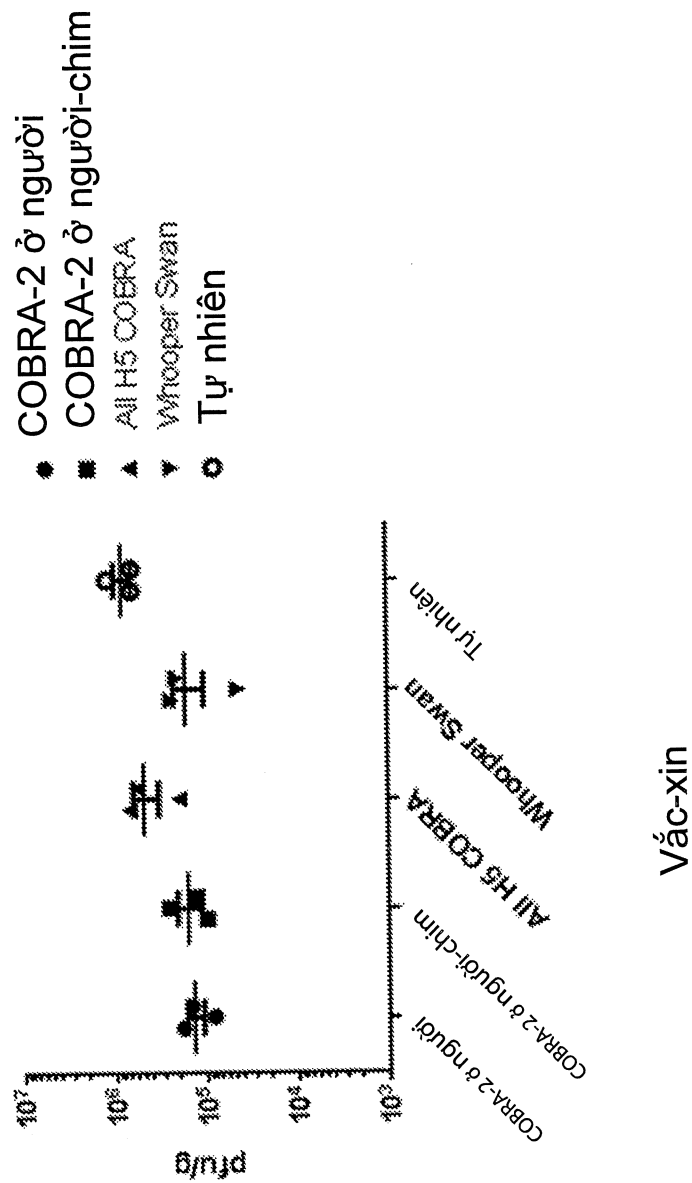
CHUẨN ĐỘ VIRUT NGHIÊN CỨU COBRA 5A
NGÀY THỨ 2

FIG. 13



CHUẨN ĐỘ VIRUT NGHIÊN CỨU COBRA 5A
NGÀY THỨ 3

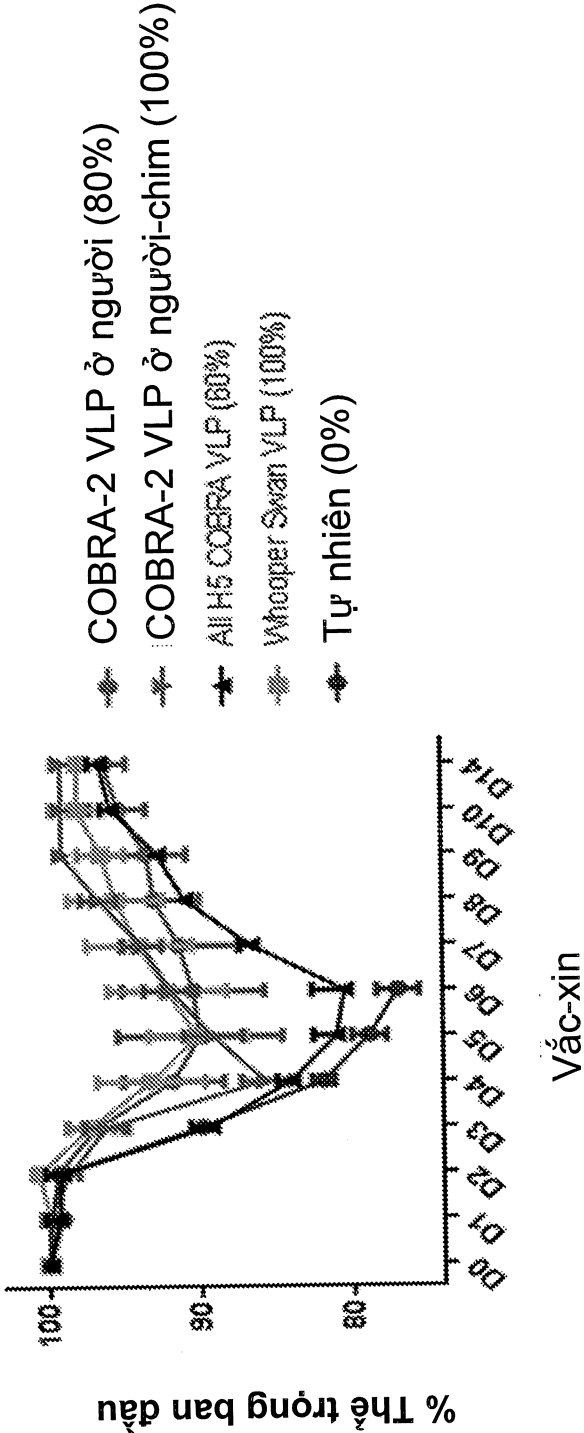
FIG. 14 Chuẩn độ Vietnam 5000pfu D3



THÁCH THỨC NGHIỆN CỨU COBRA 9A
WHOOPER SWAN

FIG. 15

Thách thức nhánh gai nối 2.2 Whooper Swan 5000pfu



CHUẨN ĐỘ VIRUT NGHIÊN CỨU COBRA 9A
NGÀY THỨ 2

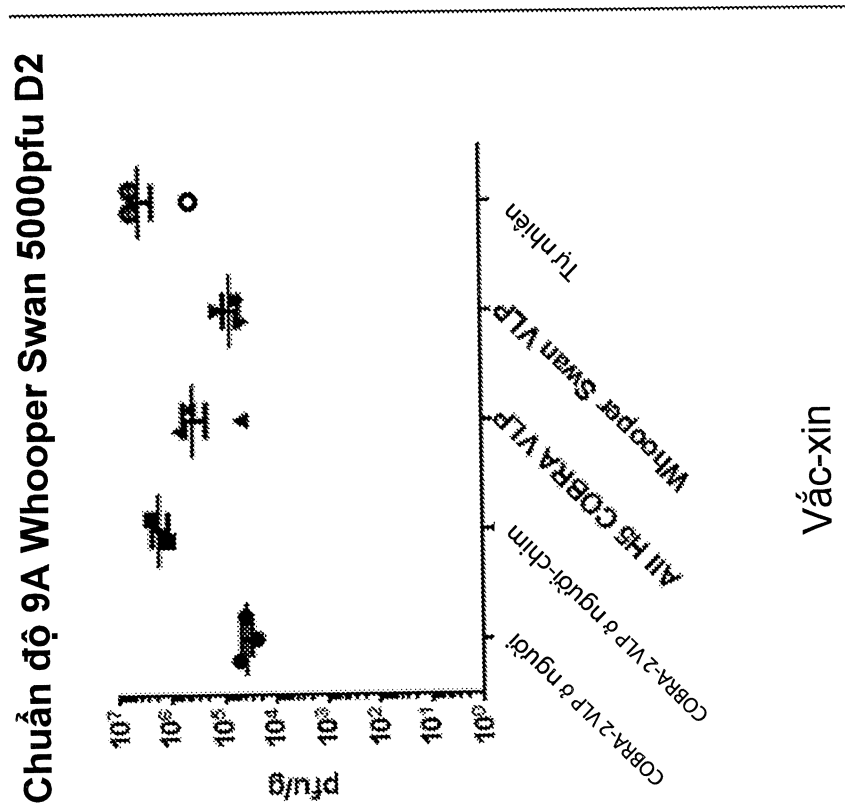


FIG. 16

CHUẨN ĐỘ VIRUT NGHIÊN CỨU COBRA 9A
NGÀY THỨ 3

Chuẩn độ 9A Whooper Swan 5000pfu D3

