



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

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

(11)



1-0035107

(51)⁷ A61K 39/12; C07K 14/08; A61K 39/35 (13) B

(21) 1-2017-01675

(22) 20/10/2015

(86) PCT/EP2015/074269 20/10/2015

(87) WO2016/062720 28/04/2016

(30) 14189897.3 22/10/2014 EP; 15184192.1 08/09/2015 EP

(45) 27/03/2023 420

(43) 25/09/2017 354A

(73) Saiba AG (CH)

Bahnhofstrasse 13, 8808 Pfäffikon, Switzerland

(72) BACHMANN, Martin (CH); ZELTINS, Andris (LV); PUMPENS, Paul (LV).

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

(54) HẠT TƯƠNG TỰ VIRUT ĐƯỢC CẢI BIẾN CỦA VIRUT THỂ KHẢM GÂY BỆNH Ở CÂY DƯA CHUỘT VÀ CHẾ PHẨM CHỨA HẠT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến hạt tương tự virus (virus-like particle-VLP) được cải biến của virus thể khảm gây bệnh ở cây dưa chuột (cucumber mosaic virus-CMV), trong đó hạt tương tự virus được cải biến này chứa ít nhất một polypeptit CMV được cải biến, trong đó polypeptit CMV được cải biến này chứa (a) polypeptit CMV, và (b) epitop tế bào T hỗ trợ; trong đó epitop tế bào T hỗ trợ này thay thế vùng tận cùng N của polypeptit CMV này, trong đó vùng tận cùng N của polypeptit CMV này tương ứng với các axit amin 2-12 của trình tự SEQ ID NO.1; và trong đó polypeptit CMV này chứa (i) trình tự axit amin của protein vỏ của CMV; hoặc (ii) trình tự axit amin đột biến, trong đó trình tự axit amin cần được đột biến là trình tự axit amin của protein vỏ của CMV, và trong đó trình tự axit amin đột biến và protein vỏ của CMV này có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 90%; và chế phẩm chứa hạt này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hạt tương tự virus của virus thực vật, virus thể khảm gây bệnh ở cây dưa chuột, cụ thể sáng chế đề cập đến hạt tương tự virus được cải biến của virus thể khảm gây bệnh ở cây dưa chuột chứa các epitop tế bào T hỗ trợ, cụ thể là các epitop tế bào T hỗ trợ toàn phần. Ngoài ra, tốt hơn nếu hạt tương tự virus được cải biến này được sử dụng làm chất nền vacxin để tạo ra đáp ứng miễn dịch, cụ thể là đáp ứng kháng thể kháng kháng nguyên được liên kết với hạt tương tự virus được cải biến này. Sự có mặt của các epitop tế bào T hỗ trợ, cụ thể là các epitop tế bào T hỗ trợ toàn phần, tăng cường đáp ứng miễn dịch được tạo ra.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Trong ba thập kỷ qua, hạt tương tự virus (virus-like particle-VLP) đã trở thành công nghệ được chấp nhận, cụ thể là trong lĩnh vực phát triển vacxin (Zeltins A, Mol Biotechnol (2013) 53:92-107). Mối quan tâm ngày càng gia tăng về các VLP này được thu hút đặc biệt nhờ sự phát triển và đưa vào thành công kháng nguyên bề mặt virus viêm gan B (hepatitis B virus: HBV) và protein capsit L1 của virus gây u nhú ở người (human papillomavirus: HPV) làm vacxin thương mại phòng bệnh viêm gan B và bệnh ung cổ tử cung do HPV gây ra tương ứng. Hơn nữa, hạt tương tự virus đã được mô tả dưới dạng vật mang miễn dịch có khả năng gây ra đáp ứng miễn dịch mạnh kháng lại kháng nguyên tiếp hợp (Jennings GT and Bachmann MF, Annu Rev Pharmacol Toxicol (2009) 49:303-26, Jennings GT and Bachmann MF, Biol Chem (2008) 389:521-536, WO2002/056905, WO2003/024481). Tiếp đó, sự phát triển của vài ứng viên vacxin được tạo ra chủ yếu từ VLP đã được đưa vào các giai đoạn khác nhau của quá trình đánh giá lâm sàng nhằm phát triển vacxin trên cơ sở VLP dùng cho mục đích y học và thú y trong tương lai gần (Liu F, et al., Research in Veterinary Science (2012) 93:553-559; Roldao A., et al., Expert Review of Vaccines (2010) 9:1149-1176).

Cho đến nay, VLP được phát triển có nguồn gốc từ các virus vi sinh vật, thực vật, côn trùng hoặc động vật có vú. Bên cạnh các hệ VLP nêu trên, các VLP có nguồn gốc từ virus thực vật đã thu hút được sự chú ý gần đây, chủ yếu là do vai trò của thực vật làm nền thay thế rẻ tiền và nhanh chóng để tạo ra các vacxin VLP theo quan điểm về khả

năng tạo ra các cải biến sau dịch mã khác biệt của chúng với chi phí hữu hiệu, tốc độ và quy mô sản xuất (Chen Q and Lai H, *Human Vaccines & Immunotherapeutics* (2013) 9:26-49; Zeltins A, *Mol Biotechnol* (2013) 53:92-107).

Virut thể khảm gây bệnh ở cây dưa chuột (CMV, họ *Bromoviridae*, chi *Cucumovirus*) là virut thực vật có đường kính đều, nghĩa dương, mạch thẳng với khoảng vật chủ rất rộng. Hệ gen của virut gồm có ba ARN sợi đơn (ARN1, ARN2 và ARN3), gen protein vỏ (coat protein: CP) có mặt trong cả ARN3 hệ gen (khoảng 2200nt) và trong ARN4 hệ gen phụ (khoảng nt). Capsit bao gồm 180 bản sao của các loài một protein có chiều dài khoảng 26kDa. Có nhiều chủng khác nhau đã biết từ CMV kết hợp với các triệu chứng thay đổi liên quan đến thực vật chủ như chủng CMV-B, chủng CMV-C, chủng CMV-D, chủng CMV-L, chủng CMV-S, chủng CMV-T, chủng CMV-WL, chủng CMV-V, chủng CMV-Fny, chủng CMV-Ix, chủng CMV-Q, chủng CMV-R hoặc các chủng tương tự (Carrère I, et al., *Arch Virol* (1999) 144:1846-1857; Edwards MC, et al., *Phytopathology* 81983) 73:1117-1120; www.dpvweb.net).

Gần đây, các dạng thể khảm của CMV đã được thiết kế để có chức năng như hệ trình diện và biểu hiện trên các epitop mặt ngoài của chúng có nguồn gốc từ virut viêm gan C (hepatitis C virus: HCV). Cụ thể, dạng giả tái tổ hợp CMV-D/S của CMV đã được thiết kế để mang ARN3 hệ gen từ chủng CMV-S và ARN1 và ARN2 từ chủng CMV-D. Hệ này đã phát triển các triệu chứng của virut như thể khảm nhẹ và làm sạch gân lá ở cây thuốc lá *Xanthi* sau khi cấy. Sau đó, gen CP được thiết kế ở các vị trí khác nhau để mã hoá epitop của virut viêm gan C (HCV). Peptit đã chọn còn được gọi là mimotop R9, peptit tổng hợp có nguồn gốc từ nhiều trình tự vùng siêu biến 1 (hypervariable region 1: HVR1) của protein E2 vỏ của virut HCV. Các mẫu huyết thanh lấy từ bệnh nhân mắc bệnh viêm gan C mạn tính có hoạt tính miễn dịch đáng kể đối với các phần chiết thô của thực vật được gây nhiễm bằng một trong số các dạng thể khảm giả tái tổ hợp được thiết kế đã chọn của CMV. Do đó, đã có đề cập đến rằng các hệ này có thể là vật mang thích hợp cho phép phát triển các chiến lược gây miễn dịch qua đường miệng có triển vọng. Các chiến lược này có thể phù hợp với các khái niệm về thực vật như các vật phản ứng sinh học có thể có của được phẩm dinh dưỡng do chúng sao chép chủ động ở thực vật và do đó có thể nhận biết để dùng làm vacxin ăn được do cần tây, rau diếp, dưa chuột, cà chua, cà rốt, cây hồ tiêu và chuối là các vật chủ của CMV. (Natilla A, et al., *Arch Virol*

(2004) 149:137-154; Piazzolla G, et al., J Clin Immunol (2005) 25:142-152; Nuzzaci M, et al., Arch Virol (2007) 152:915-928; Nuzzaci M, et al., Journal of Virological Methods (2009) 155:118-121; Nuzzaci M, et al., Journal of Virological Methods (2010) 165:211-215; Piazzolla G, et al., J Clin Immunol (2012) 32:866-876).

Sự chèn đoạn của các mimotop R9 được thực hiện ở các vị trí khác nhau trong gen CP của ARN3 CMV-S (AF063610, www.dpvweb.net). Để chèn một mimotop R9 đơn vào gen CP này, trình tự nucleotit của mimotop R9 được chèn vào các vị trí 253, 475, 529 của gen CP, trong khi đó để chèn hai mimotop R9, trình tự nucleotit của mimotop R9 được chèn vào vị trí 392 và 529. Các sản phẩm cuối là hạt thể khảm CMV mang trên 180 hoặc 360 bản sao mặt ngoài của chúng của mimotop R9 của mỗi hạt virus. (Natilla A, et al., Arch Virol (2004) 149:137-154; Piazzolla G, et al., J Clin Immunol (2005) 25:142-152; Nuzzaci M, et al., Arch Virol (2007) 152:915-928; Nuzzaci M, et al., Journal of Virological Methods (2009) 155:118-121; Nuzzaci M, et al., Journal of Virological Methods (2010) 165:211-215; Piazzolla G, et al., J Clin Immunol (2012) 32:866-876).

Đã biết rằng việc chọn các điểm chèn của mimotop R9 vào RNA3 của CMV-S dựa trên việc xem xét một số yếu tố chính i) cần bảo vệ vùng tận cùng N của protein vỏ của CMV (chứa nồng độ axit amin bazơ cao, được gọi là vùng R bên trong, liên quan đến các tương tác protein-ARN làm ổn định CMV (Wikoff WR, et al., Virology (1997) 232: 91-97)) khác biệt bởi chuỗi xoắn đầu tận cùng N khác thường với vai trò làm ổn định thêm trong capsit (Smith TJ, et al., J Virol (2000) 74: 7578-7686)); ii) vị trí bề mặt của epitop ngoại lai để tăng cường cơ hội về khả năng gây miễn dịch giả định của nó; iii) tính sẵn có của các con đường gây đột biến có khả năng tạo ra các dòng vô tính được cải biến. Trên cơ sở các xem xét này, tập trung nghiên cứu vào vùng axit amin từ 70 đến 192 và các vùng nucleotit tương ứng như đã thể hiện trên đây. Do đó, các CMV thể khảm được tạo ra vẫn duy trì được khả năng của chúng trong việc lan toả theo hệ thống trong thực vật chủ, là mục tiêu không thay thế trong việc xây dựng vật mang virus thực vật tiềm năng đối với sự biểu hiện của gen ngoại lai ở thực vật. Các thử nghiệm ELISA và IEM đã chứng minh rằng mimotop R9 được thể hiện theo sơ đồ ở vị trí đúng (Natilla A, et al., Arch Virol (2004) 149:137-154).

Ngoài ra, hệ biểu hiện trên cơ sở virus thể khảm gây bệnh ở cây dưa chuột để sản xuất vacxin đặc hiệu với virus gây còi cọc ở lợn gần đây đã được mô tả (Gellert A, et al.,

PLoS ONE (2012) 7(12): e52688). Cụ thể, các epitop của protein capsit của virus gây còi cọc ở lợn typ 2 (porcine circovirus type 2: PCV2) đã được kết hợp vào protein vỏ của chủng R của virus thực vật là virus thể khảm gây bệnh ở cây dưa chuột (CMV) sau vị trí axit amin 131. Các thể tái tổ hợp được thử nghiệm về tính gây nhiễm và tính ổn định trên các loài *Nicotiana* khác nhau và các hạt virus tái tổ hợp ổn định được tinh chế. Các hạt này được thử nghiệm về tính ổn định của chúng để gắn kết với PCV tạo ra kháng thể của lợn và được dùng để tạo ra kháng thể đặc hiệu ở chuột và lợn. Các kết quả này cho thấy rằng các epitop của PCV được biểu hiện trên bề mặt CMV được nhận biết bởi các kháng thể của lợn và chúng cũng có khả năng gây đáp ứng kháng thể đặc hiệu PCV. Thử nghiệm thách thức với PCV2 được tiến hành ở lợn được gây miễn dịch cho thấy tác dụng bảo vệ một phần đối với sự gây nhiễm.

Cho đến nay, các epitop của protein capsit PCV2 được kết hợp vào protein vỏ của virus thể khảm gây bệnh ở cây dưa chuột (CMV) ở ba điểm chèn epitop ổn định của CMV được báo cáo (Nuzzaci M, et al., Arch Virol (2007) 152:915-928; Vitti A, et al., J Virol Methods (2010) 169:332-340). Các epitop gắn kết ở các điểm này không ức chế sự phát tán của CMV và sự di chuyển khoảng cách dài trong thực vật. Hai trong số chúng được biểu hiện trên mặt ngoài của virion trong khi điểm thứ ba nhô về phía bên trong của virion này. Có sự giới hạn tĩnh điện để biểu hiện các epitop hướng về phía bên trong của virion khi chỉ có sự biểu hiện của các epitop có điện tích dương mà không cản trở sự gắn kết ARN của mặt trong của capsit CMV có thể được thử một cách thành công. Cụ thể, điểm chèn thứ nhất nằm ở vị trí axit amin từ 83 đến 84 và ở đầu vòng $\beta\beta\beta C$ của CP CMV. Các epitop gắn kết được biểu hiện trên bề mặt của virion CMV. Điểm chèn thứ hai nằm ở vị trí axit amin từ 131 đến 132 và ở phần giữa của vòng $\beta E-\alpha EF$ của CP CMV. Các epitop gắn kết cũng được biểu hiện trên bề mặt của virion CMV. Điểm chèn thứ ba nằm ở vị trí axit amin từ 176 đến 177 và ở phần giữa của vòng $\beta G-\beta H$. Trong trường hợp cuối này, các epitop chèn vào được biểu hiện trên mặt trong của virion CMV.

Ngoài ra, việc tạo ra hạt tương tự virus (VLP) thể khảm dựa trên CMV đã được mô tả và việc sử dụng nó làm vaccin động vật được đề cập đến (Natilla, A, et al., Arch Virol (2006) 151:1373-1386; Natilla, A, et al., Protein Expression and Purification (2008) 59:117-121). Tuy nhiên, sự biểu hiện của protein capsit virus (CP) của CMV do hệ biểu hiện *E. coli* truyền thống được sử dụng rộng rãi chỉ dẫn đến các thể vùi không hoà tan

hoặc lượng rất thấp của protein hoà tan (Xu Y, et al., Chem Commun (2008) 49-51). Mặt khác, protein vỏ (CP) được biểu hiện ở virus khoai tây X (Potato virus X-PVX) của VLP tạo ra CMV-Fny, dùng làm vật mang đối với sự biểu hiện bề mặt của các epitop trung hoà khác nhau của virus gây bệnh Newcastle (Newcastle disease virus: NDV), tác nhân gây bệnh gia cầm quan trọng về mặt kinh tế. Nhằm mục đích này, các epitop từ thể dung hợp (F), protein agglutinin hồng cầu-neuraminidaza (hemagglutinin-neuraminidase: NH) và peptit F-NH nối tiếp được dung hợp di truyền vào vòng β H- β I (cấu trúc 5) bên trong của Fny-CMV CP (tương ứng với các axit amin từ 194 đến 199 của nó) và được biểu hiện qua các vật truyền PVX ở thực vật *Nicotiana benthamiana*. Các VLP của CMV thể khả không phân biệt được về mặt hình thái với các hạt CMV kiểu dại. Hơn nữa, gà được gây miễn dịch bằng VLP của NH-CMV tinh chế đã phát triển đáp ứng kháng thể đặc hiệu kháng nguyên, tuy nhiên, gà được gây miễn dịch không được bảo vệ đối với thách thức thử nghiệm với NDV (Natilla, A, et al., Arch Virol (2006) 151:1373-1386; Natilla, A, et al., Protein Expression and Purification (2008) 59:117-121; Chen Q and Lai H, Human Vaccines & Immunotherapeutics (2013) 9: 26-49).

Như đã nêu, sự biểu hiện của protein capsit (CP) virus CMV trong *E. coli* chỉ dẫn đến các thể vùi không hoà tan hoặc lượng rất thấp các protein hoà tan (Xu Y, et al., Chem Commun (2008) 49-51). Mặt khác, giải pháp của Xu và các đồng tác giả có khả năng ghép về mặt di truyền *in vitro* các CP tái tổ hợp của CMV thành các ống nano sinh học được khơi mào bởi các ADN sợi kép có chiều dài khác nhau (Xu Y, et al., Chem Commun (2008) 49-51). Tuy nhiên, nhằm mục đích này, Xu và các đồng tác giả phải tạo ra các CP của CMV hoà tan tinh khiết. Điều này đạt được bằng quy trình tái tổ hợp sau khi biểu hiện CP ở *E.coli*. Quy trình bao gồm việc tách và tinh chế các thể vùi được tạo ra sau khi biểu hiện gen CP có chiều dài đầy đủ gồm 218 gốc axit amin (ID AB008777, www.dpvweb.net), sau đó hoà tan các thể vùi bằng cách làm biến tính và, cuối cùng bằng cách áp dụng quy trình gấp nếp lại cho protein biến tính.

Mặc dù đã có sự tiến triển trong việc phát triển vaccin từ VLP, vẫn cần có thêm các hệ VLP khác. Cụ thể, các vaccin gây ra đáp ứng kháng thể khác nhau ở các đối tượng và cá thể được gây miễn dịch và đáp ứng kháng thể thường mở rộng khoảng thay đổi hơn 100 lần. Ngoài ra, một số vaccin, như vaccin phòng bệnh viêm gan B, gặp phải vấn đề là số lượng không đáp ứng nhất định. Sự không đáp ứng đã được biết là có liên quan đến

một số phân tử MHC nhóm II và được cho là không gây đáp ứng tế bào T hỗ trợ (Th) tốt gây ra đáp ứng kháng thể kém đã biết ở đối tượng này (Goncalves L, et al., Virology (2004) 326:20-28). Ngoài ra, nói chung, người cao tuổi và người già có đáp ứng kháng thể kém và đáp ứng tế bào Th kém lại được cho là nguyên nhân gây ra đáp ứng kháng thể không hiệu quả. Do đó, các vaccin gây đáp ứng tế bào Th tốt hầu như ở toàn bộ các đối tượng là đích quan trọng trong lĩnh vực phát triển vaccin.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các tác giả sáng chế đã bất ngờ phát hiện thấy rằng các protein vỏ của virus thể khảm gây bệnh ở cây dưa chuột (CMV) có thể được cải biến để hợp nhất các epitop tế bào T hỗ trợ (Th) và tốt hơn nếu hợp nhất các epitop tế bào T hỗ trợ toàn phần. Cụ thể, sự hợp nhất này là bất ngờ do các epitop tế bào T hỗ trợ mạnh đã biết là gây ra sự kết tụ và do đó, sẽ được cho là cản trở việc tự ghép khi biểu hiện dẫn đến VLP. Ngoài ra, sáng chế không chỉ đề cập đến các VLP của CMV được cải biến chứa các epitop tế bào T hỗ trợ, tốt hơn nếu các epitop tế bào T hỗ trợ toàn phần, sáng chế còn đề cập đến VLP của CMV được cải biến cũng như VLP của CMV kiểu đại thụ được nhờ sự biểu hiện trong *E.coli*, đây cũng là điều bất ngờ so với các nỗ lực trước đó để tạo ra VLP của CMV trong *E. coli* dẫn đến sự kết tụ chứ không phải VLP. Ngoài ra, VLP theo sáng chế dùng làm nền mang, cụ thể là nền vaccin, trong đó kháng nguyên mà đáp ứng miễn dịch mong muốn tạo ra được liên kết với VLP của sáng chế. Các epitop tế bào T hỗ trợ đưa vào được hợp nhất trong hạt tương tự virus được cải biến của virus thể khảm gây bệnh ở cây dưa chuột theo sáng chế tăng cường tính sinh miễn dịch của các VLP và dẫn đến sự gia tăng đáp ứng miễn dịch chung được tạo ra bởi chế phẩm theo sáng chế, cụ thể là tăng cường đáp ứng kháng thể.

Do đó, theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến hạt tương tự virus được cải biến (VLP) của virus thể khảm gây bệnh ở cây dưa chuột (CMV), trong đó hạt tương tự virus được cải biến này chứa, chủ yếu bao gồm hoặc theo cách khác bao gồm, ít nhất một polypeptit CMV được cải biến, trong đó polypeptit CMV được cải biến này chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ, (a) polypeptit CMV, và (b) epitop tế bào T hỗ trợ; và trong đó polypeptit CMV này chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ, (i) trình tự axit amin của protein vỏ của CMV; hoặc (ii) trình tự axit amin đột biến, trong đó trình tự axit amin cần được đột biến là trình tự axit amin của protein vỏ của CMV, và trong đó trình tự axit amin đột

biến và protein vỏ của CMV này có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 90%, tốt hơn nếu ít nhất bằng 95%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 98% và tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 99%.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến hạt tương tự virut được cải biến (VLP) của virut thể khảm gây bệnh ở cây dưa chuột (CMV), trong đó hạt tương tự virut được cải biến này chứa, chủ yếu bao gồm hoặc theo cách khác bao gồm, ít nhất một polypeptit CMV được cải biến, trong đó polypeptit CMV được cải biến này chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ: (a) polypeptit CMV, và (b) epitop tế bào T hỗ trợ; và trong đó polypeptit CMV này chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ: (i) trình tự axit amin của protein vỏ của CMV; hoặc (ii) trình tự axit amin đột biến, trong đó trình tự axit amin cần được đột biến là trình tự axit amin của protein vỏ của CMV, và trong đó trình tự axit amin đột biến và protein vỏ của CMV này có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 90%, tốt hơn nếu ít nhất bằng 95%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 98% và tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 99%; trong đó epitop tế bào T hỗ trợ này (i) được dung hợp với đầu tận cùng N của polypeptit CMV; (ii) được dung hợp với đầu C của polypeptit CMV; (iii) thay thế vùng axit amin liên tiếp của polypeptit CMV này, trong đó độ tương đồng trình tự giữa vùng được thay thế của các axit amin liên tiếp của polypeptit CMV này và epitop tế bào T hỗ trợ ít nhất bằng 15%, tốt hơn nếu ít nhất bằng 20%; hoặc (iv) thay thế vùng tận cùng N của polypeptit CMV và trong đó vùng tận cùng N đã thay thế của polypeptit CMV bao gồm từ 5 đến 15 axit amin liên tiếp.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến hạt tương tự virut (VLP) của virut thể khảm gây bệnh ở cây dưa chuột (CMV), trong đó VLP của CMV này chứa, chủ yếu bao gồm, hoặc theo cách khác bao gồm, ít nhất một polypeptit CMV chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ: (i) trình tự axit amin của protein vỏ của CMV; hoặc (ii) trình tự axit amin đột biến, trong đó trình tự axit amin cần được đột biến là trình tự axit amin của protein vỏ của CMV, và trong đó trình tự axit amin đột biến và protein vỏ của CMV này có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 90%, tốt hơn nếu ít nhất bằng 95%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 98% và tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 99%; và trong đó VLP của CMV này thu được nhờ sự biểu hiện của polypeptit CMV ở *E.coli.*, và trong đó tốt hơn nếu sự biểu hiện này được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 10°C đến 25°C, tốt hơn nếu ở nhiệt độ 20°C.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa hạt tương tự virut

được cải biến. Ngoài ra, tốt hơn nếu hạt tương tự virus được cải biến này được sử dụng làm nền vaccine để tạo ra đáp ứng miễn dịch, cụ thể là đáp ứng kháng thể, kháng lại các kháng nguyên được liên kết với hạt tương tự virus được cải biến này. Sự có mặt của các epitop tế bào T hỗ trợ, cụ thể là các epitop tế bào T hỗ trợ toàn phần, tăng cường đáp ứng miễn dịch được tạo ra.

Các khía cạnh khác và các phương án ưu tiên của chúng được mô tả chi tiết hơn trong bản mô tả này.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện bản đồ plasmid pET-CMVwt. Các vị trí tương đối của toàn bộ các gen liên quan và các vị trí enzyme giới hạn được thể hiện.

Fig.2 thể hiện kết quả phân tích SDS/PAGE về sự biểu hiện và tinh chế gradient sucroza của protein CMVwt. M - thể hiện kích cỡ protein; S - các protein hoà tan sau khi siêu âm; P - các protein không hoà tan sau khi siêu âm; Ps - các protein hoà tan trong viên amoni sulfat (mẫu dùng cho quá trình siêu ly tâm gradient sucroza); Pp - protein không hoà tan trong viên amoni sulfat; 1, 2, 3, 4, 5, 6 - các phân đoạn gradient sucroza từ đáy ống gradient 35ml.

Fig.3A thể hiện đồ thị tán xạ ánh sáng động của VLP của các CMVwt được tinh chế. Kích cỡ hạt được phát hiện bằng cách sử dụng thiết bị Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., United Kingdom).

Fig.3B thể hiện hình ảnh phân tích bằng kính hiển vi điện tử của VLP của các CMVwt được tinh chế. Để phân tích hình thái học của các VLP, sử dụng kính hiển vi điện tử JEM-1230 (Jeol Ltd., Tokyo, Japan).

Fig.4 thể hiện kết quả phân tích phổ khối của các VLP có nguồn gốc từ CMV. Phép phân tích quá trình giải hấp/ion hóa bằng laze dựa trên cơ chất (matrix-assisted laser desorption/ionization-MALDI)-TOF MS được thực hiện trên thiết bị Autoflex MS (Bruker Daltonik, Germany). Tiêu chuẩn hiệu chỉnh II đối với khối lượng phân tử (molecular mass-MM) của protein (22,3 đến 66,5kDa; Bruker Daltonik) được sử dụng để xác định khối lượng.

Fig.4A thể hiện kết quả phân tích phổ khối của các VLP của CMV kiểu dại ("wt"); MM theo lý thuyết = 24069; MM phát hiện được = 24058

Fig.4B thể hiện kết quả phân tích phổ khối của các VLP của CMV-Npadr; MM

theo lý thuyết = 24161 (không có Met thứ nhất); MM phát hiện được = 24160

Fig.4C thể hiện kết quả phân tích phổ khối của các VLP của CMV-Ntt830; MM theo lý thuyết = 24483 (không có Met thứ nhất); MM phát hiện được = 24477

Fig.5A thể hiện đồ thị tán xạ ánh sáng động của các VLP của CMV-Ntt830 được tinh chế. Kích cỡ hạt được phát hiện bằng cách sử dụng thiết bị Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., United Kingdom).

Fig.5B thể hiện kết quả phân tích bằng kính hiển vi điện tử của các VLP của CMV-Ntt830 được tinh chế. Để phân tích hình thái học của các VLP, sử dụng kính hiển vi điện tử JEM-1230 (Jeol Ltd., Tokyo, Japan).

Fig.6A thể hiện đồ thị tán xạ ánh sáng động của các VLP của CMV-Npadr được tinh chế. Kích cỡ hạt được phát hiện bằng cách sử dụng thiết bị Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., United Kingdom).

Fig.6B thể hiện kết quả phân tích bằng kính hiển vi điện tử của các VLP của CMV-Npadr được tinh chế. Để phân tích hình thái học của các VLP, sử dụng kính hiển vi điện tử JEM-1230 (Jeol Ltd., Tokyo, Japan).

Fig.7A là đồ thị thể hiện mức độ đáp ứng kháng thể xác định được sau khi gây miễn dịch bằng VLP của CMV kiểu dại. Các nhóm chuột được gây miễn dịch bằng 10 μ g, 1 μ g hoặc 0,1 μ g VLP của CMV-wt vào ngày 0 và ngày 7. Tổng độ chuẩn IgG đặc hiệu được xác định vào ngày 0 (trước khi gây miễn dịch), ngày 7, 14 và 28. 4 chuột/nhóm.

Fig.7B là đồ thị thể hiện mức độ đáp ứng kháng thể xác định được sau khi gây miễn dịch bằng VLP của CMV-Npadr. Các nhóm chuột được gây miễn dịch bằng 10 μ g, 1 μ g hoặc 0,1 μ g VLP của CMV-Npadr vào ngày 0 và ngày 7. Tổng độ chuẩn IgG đặc hiệu được xác định vào ngày 0 (trước khi gây miễn dịch), ngày 7, 14 và 28. 4 chuột/nhóm.

Fig.7C là đồ thị thể hiện mức độ đáp ứng kháng thể xác định được sau khi gây miễn dịch bằng VLP của CMV-Ntt830. Các nhóm chuột được gây miễn dịch bằng 10 μ g, 1 μ g hoặc 0,1 μ g VLP của CMV-Ntt830 vào ngày 0 và ngày 7. Tổng độ chuẩn IgG đặc hiệu xác định vào ngày 0 (trước khi gây miễn dịch), ngày 7, 14 và 28. 4 chuột/nhóm.

Fig.8A là đồ thị thể hiện mức độ đáp ứng thể dịch kháng dị nguyên Fel D1 được phát hiện ở chuột. Dị nguyên Fel D1 chủ yếu ở mèo được ghép cặp với CMV Npadr. Chuột được gây miễn dịch bằng 5 μ g Fel D1-VLP vào ngày 0 và ngày 7. Các kháng thể

đặc hiệu Fel D1 được xác định ở các thời điểm đã nêu. 5 chuột/nhóm.

Fig.8B là đồ thị thể hiện mức độ đáp ứng thể dịch kháng dị nguyên Fel D1 được phát hiện ở chuột. Dị nguyên Fel D1 chủ yếu ở mèo được ghép cặp với CMV Ntt830. Chuột được gây miễn dịch bằng 5µg Fel D1-VLP vào ngày 0 và ngày 7. Các kháng thể đặc hiệu Fel D1 được xác định ở các thời điểm đã nêu. 5 chuột/nhóm

Fig.9 là đồ thị thể hiện mức độ đáp ứng thể dịch kháng peptit có nguồn gốc từ α -synuclein. Chuột được gây miễn dịch vào ngày 0 và ngày 14 bằng 20µg peptit có nguồn gốc từ α -synuclein được ghép cặp với CMV Ntt830. Độ chuẩn kháng thể đặc hiệu với peptit được xác định ở các thời điểm đã nêu. Số lượng chuột = 4 con.

Fig.10 là đồ thị thể hiện mức độ đáp ứng kháng thể kháng protein bản thân IL17 được phát hiện ở chuột. Xytokin IL17 được ghép cặp với CMV Ntt830. Chuột được gây miễn dịch bằng 20µg IL17-CMV Ntt830 vào ngày 0 và ngày 14. Các kháng thể đặc hiệu với IL17 được xác định ở các thời điểm đã nêu. Số lượng chuột = 3 con.

Fig.11A thể hiện kết quả phân tích SDS/PAGE về sự biểu hiện và tinh chế protein F12H6GGC từ tế bào *E.coli* C2566, bằng cách sử dụng kit PrepEase (USB). M - thể hiện kích cỡ protein; S - phân đoạn protein hoà tan; P - mảnh vỡ tế bào; F - Dòng qua từ cột Ni-IDA (protein không gắn kết); W1, W2 - Các phân đoạn rửa (2x2ml 1x chất đệm LEW), W3, W4- các phân đoạn rửa (2x2ml 1xLEW + 10mM imidazol); E1, E2 - các phân đoạn rửa giải (2x1,5ml chất đệm E 250mM imidazol).

Fig.11B thể hiện kết quả phân tích phổ khối của F12H6GGC đã tinh chế. Khối lượng trung bình tính được của F12H6GGC tương ứng với 20089,8Da. Khối lượng quan sát được bằng 20105,3 tương ứng với F12H6GGC trong đó một lưu huỳnh của methionin được oxy hoá thành nhóm sulfoxit.

Fig.11C thể hiện kết quả phân tích SDS-PAGE nhuộm xanh Coomassie của sản phẩm tinh chế F12GGC. (A) AmS - chất kết tủa được hoà tan sau 50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Các phân đoạn khác nhau từ quy trình cột DEAE và việc tinh chế tiếp theo bằng MonoQ: FT - chảy qua, A4-A7 - các phân đoạn được rửa giải bằng cách làm tăng gradien NaCl (B) Tinh chế cuối bằng cột Butyl HP (HIC).

Fig.12 là đồ thị thể hiện kết quả thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA) kiểu bánh kẹp do Indoor Biotechnologies cung cấp bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng (mAb) làm tăng sự kháng lại Fel d1 tự nhiên. Các kháng thể mAb nhận biết

F12H6GGC và Fel d1 tự nhiên cũng bằng nhau.

Fig.13A là đồ thị thể hiện kết quả thử nghiệm hoạt hóa bạch cầu ưa kiềm (basophil activation test: BAT) đối với Fel d1 tự nhiên.

Fig.13B là đồ thị thể hiện kết quả thử nghiệm hoạt hóa bạch cầu ưa kiềm (BAT) đối với F12H6GGC. F12H6GGC và Fel d1 tự nhiên gây ra mức độ hoạt hóa bạch cầu ưa kiềm tương đương trong máu của bệnh nhân dị ứng với mèo được thể hiện bằng sự điều hòa tăng của CD63 trên bạch cầu ưa kiềm CCR3+.

Fig.14 là đồ thị thể hiện mức độ đáp ứng kháng thể của chuột khi được cho sử dụng 10µg Fel d1-VLP của CMV (Fel d1-CMV-Ntt830-VLP hoặc Fel d1-CMV-Npadr-VLP) hoặc CMV-VLP (CMV-Ntt830-VLP hoặc CMV-Npadr-VLP) chỉ được trộn với protein dung hợp Fel d1 F12H6GGC vào ngày 0 và ngày 14. Huyết thanh được lấy vào các ngày 0, 14 và 21 và được phân tích bằng phương pháp ELISA đối với các kháng thể IgG đặc hiệu Fel d1 tự nhiên. N=3.

Mô tả chi tiết sáng chế

Trừ khi có quy định khác, toàn bộ các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng trong bản mô tả này có cùng nghĩa như thường được hiểu bởi chuyên gia trong lĩnh vực mà sáng chế này thuộc về.

Thuật ngữ “hạt tương tự virus” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ hạt virus không sao chép hoặc không gây nhiễm, tốt hơn nếu hạt virus không sao chép và không gây nhiễm hoặc dùng được sử dụng trong bản mô tả để chỉ cấu trúc giống hạt virus không sao chép hoặc không gây nhiễm, tốt hơn nếu cấu trúc giống hạt virus không sao chép và không gây nhiễm, tốt hơn nếu capsit của virus. Thuật ngữ “không sao chép” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ việc không có khả năng sao chép hệ gen của VLP. Thuật ngữ “không gây nhiễm” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ việc không có khả năng đi vào tế bào chủ. Hạt tương tự virus theo sáng chế không sao chép và không gây nhiễm do nó thiếu toàn bộ hoặc một phần hệ gen của virus hoặc chức năng của hệ gen. Hạt tương tự virus theo sáng chế có thể chứa axit nucleic khác biệt với hệ gen của chúng. Hạt tương tự virus được tạo ra bằng phương pháp tái tổ hợp thường chứa ARN có nguồn gốc từ tế bào chủ. Phương án điển hình và được ưu tiên của hạt tương tự virus theo sáng chế là capsit virus gồm các polypeptit theo sáng chế. Hạt tương tự virus thường là tập hợp đại phân tử bao gồm protein vỏ virus thường gồm 60, 120, 180, 240, 300, 360 hoặc nhiều hơn 360

cấu trúc dưới phân tử của protein/hạt tương tự virus. Thông thường và tốt hơn nếu sự tương tác của các cấu trúc dưới phân tử này dẫn đến sự hình thành capsit virus hoặc cấu trúc tương tự capsit-virus với tổ chức lặp lại vốn có. Một đặc điểm của hạt tương tự virus là sự bố trí các cấu trúc dưới phân tử lặp lại và theo thứ tự ở mức cao của nó.

Thuật ngữ “hạt tương tự virus của CMV” hoặc “VLP của CMV” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ hạt tương tự virus chứa hoặc tốt hơn nếu chủ yếu bao gồm hoặc tốt hơn nếu bao gồm ít nhất một polypeptit CMV. Tốt hơn, nếu hạt tương tự virus của CMV chứa polypeptit CMV nêu trên làm thành phần chủ yếu và đặc biệt tốt hơn nữa là làm thành phần protein duy nhất của cấu trúc capsit. Thông thường và tốt hơn nếu hạt tương tự virus của CMV giống cấu trúc của capsit của CMV. Hạt tương tự virus của CMV không sao chép và/hoặc không gây nhiễm và không có ít nhất một hoặc nhiều gen mã hoá đối với cơ chế sao chép của CMV và thông thường cũng không có một hoặc nhiều gen mã hoá một hoặc nhiều protein gây ra sự liên kết của virus với hoặc đi vào vật chủ. Định nghĩa này cũng bao gồm hạt tương tự virus trong đó một hoặc nhiều gen nêu trên vẫn có mặt nhưng không có hoạt tính. Các phương pháp được ưu tiên để hạt tương tự virus của CMV không sao chép và/hoặc không gây nhiễm là phương pháp bất hoạt vật lý hoặc hoá học, như chiếu tia tử ngoại, xử lý bằng formaldehyt. Tốt hơn, nếu các VLP của CMV không có một hoặc nhiều gen mã hoá đối với cơ chế sao chép của CMV và cũng không có một hoặc nhiều gen mã hoá một hoặc nhiều protein gây ra sự liên kết của virus với hoặc đi vào vật chủ. Tốt hơn nữa nếu các hạt tương tự virus không sao chép và/hoặc không gây nhiễm thu được bằng công nghệ gen tái tổ hợp. Hạt tương tự virus của CMV theo sáng chế được tạo ra bằng phương pháp tái tổ hợp thông thường và tốt hơn nếu không chứa hệ gen của virus. Hạt tương tự virus chứa nhiều hơn một loại polypeptit, thường được gọi là các VLP thể khảm cũng thuộc phạm vi của sáng chế. Do đó, theo một phương án, hạt tương tự virus theo sáng chế chứa ít nhất hai loại polypeptit khác nhau, trong đó ít nhất một trong số các loại polypeptit này là polypeptit CMV. Tốt hơn, nếu VLP của CMV là tập hợp đại phân tử gồm protein vỏ của CMV thường chứa 180 cấu trúc dưới phân tử của protein vỏ/VLP. Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thông thường và tốt hơn nếu VLP của CMV chứa, chủ yếu bao gồm, hoặc theo cách khác bao gồm, ít nhất một polypeptit CMV chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ (i) trình tự axit amin của protein vỏ của CMV; hoặc (ii) trình tự axit amin đột biến, trong đó trình tự axit

amin cần được đột biến là trình tự axit amin của protein vỏ của CMV, và trong đó trình tự axit amin đột biến và trình tự axit amin cần được đột biến này có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 90%, tốt hơn nếu ít nhất bằng 95%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 98% và tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 99%.

Thuật ngữ “polypeptit” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ polyme bao gồm các monome axit amin được liên kết thẳng bởi các liên kết peptit (còn được gọi là các liên kết amit). Thuật ngữ polypeptit được sử dụng trong bản mô tả để chỉ chuỗi axit amin liên tiếp và không dùng được sử dụng trong bản mô tả để chỉ chiều dài cụ thể của sản phẩm này. Do đó, các peptit và protein có trong định nghĩa của polypeptit.

Thuật ngữ “polypeptit của virus thể khảm gây bệnh ở cây dưa chuột (CMV)” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ polypeptit chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ: (i) trình tự axit amin của protein vỏ của virus thể khảm gây bệnh ở cây dưa chuột (CMV), hoặc (ii) trình tự axit amin đột biến, trong đó trình tự axit amin cần được đột biến là trình tự axit amin của protein vỏ của CMV, và trong đó trình tự axit amin đột biến và trình tự axit amin cần được đột biến này, nghĩa là protein vỏ của CMV nêu trên, có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 90%, tốt hơn nếu ít nhất bằng 95%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 98% và tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 99%. Thông thường và tốt hơn nếu polypeptit CMV có khả năng tạo ra hạt tương tự virus của CMV khi biểu hiện bằng cách tự ghép.

Thuật ngữ “protein vỏ (CP) của virus thể khảm gây bệnh ở cây dưa chuột (CMV)” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ protein vỏ của virus thể khảm gây bệnh ở cây dưa chuột có trong tự nhiên. Do khoảng vật chủ của virus thể khảm gây bệnh ở cây dưa chuột là rất lớn, nhiều chủng khác nhau và các thể phân lập của CMV là đã biết và các trình tự protein vỏ của các chủng hoặc thể phân lập này đã được xác định và do đó đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Các trình tự của protein vỏ (CP) của CMV nêu trên được mô tả và có thể truy cập từ các cơ sở dữ liệu đã biết như Genbank, www.dpvweb.net, hoặc www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/. Các ví dụ về CP của CMV được mô tả là CAD92034.1, CDO33961.2, AHZ89404.1, CDO33963.1, ACN60036.1, CAC18660.1, CAC18661.1, CAC18658.1, CAC18657.1, CAC18659.1, AFS64321.1, AFS64320.1, ABG76792.1, CAI68015.1, AAQ22992.1, AEM36051.1, AEM36048.1, ADA77134.1, AIS22690.1, AGT15706.1, AFR44555.1, AHY22574.1, ACM89097.1, AAB07137.1, AAD17927.1, AAM81371.1, AAM81365.1, AAM81374.1, AAM81372.1,

AAM81368.1, ABC18318.1, AAX70966.1, AAU14864.1, AHJ11230.1, AHJ11229.1, AHJ11228.1, O40980.1, CAB43510.1, Q66143.1, CAA77065.1, CAB77390.1, CAC18666.1, NP_040777.1, P16489.1, AGV39216.1, AGW51600.1, AGN56074.1, AGN56050.1, AGG16159.1, AGG16145.1, AGG16143.1, AFZ99011.1, 1407131A, CAA71834.1, CAA07411.1, CAC18665.1, Q66135.1, 1F15_A, O40983.1, Q00259.1, AER25350.1, AER25348.1, ADN84922.1, ABU95611.1, BAF93916.1, BAF93914.1, AAY46239.1, AAY46233.1, AAY46235.1, AAY46231.1, AAY46230.1, AAY46237.1, BAF45130.1, ABM46611.1, ABC00925.1, AAY42625.1, CAH25533.1, CAH25541.1, CAH25539.1, AAV63980.1, AAQ89596.1, AAQ89571.1, AAQ89570.1, AAQ83697.1, AAQ83689.1, AAK52423.1, CCN27449.1, CEF39516.1, CAE51926.1, CAC13146.1, BAM15840.1, AEK33396.1, ABY21417.1, ABM89156.1, CAI84629.1, AGA20617.1, AAO17725.1, CAD42338.1, ABO18585.1, CDF77337.1, CAG25710.1, CAG25430.1, CAE30336.1, BAF45378.1, AAD17925.1, AGV39211.1, BAA07858.1, Q66141.1, O40981.1, ACB87210.1, CAI77626.1, CAH25521.1, ABG89138.1, AGT15712.1, AGT15703.1, AII01134.1, AIC76579.1, AIC76576.1, AIC76574.1, AIC76573.1, AIB09173.1, AIB09172.1, ADF81043.1, ACQ99349.1, ACQ99348.1, CBF03403.1, CBF03405.1, CAX45872.1, CAX45871.1, ACH48048.1, AAG01451.1, AAA46409.1, AAD45249.1, AAG25053.1, AAA46410.1, AAA46411.1, AAA46412.1, ABB89052.1, AAY19285.1, AAW21981.1, AAW21983.1, AAA74483.1, AHL30195.1, BAA95601.1, Q00261.1, CAB89799.1, AGZ63887.1, BAN67666.1, AFZ62498.1, AFZ62495.1, AFZ62494.1, AGN56098.1, AGN56028.1, AGG16155.1, AGG16151.1, ACS83814.1, ACS83810.1, ACS83800.1, ACS83791.1, CCM80413.1, CCM80411.1, CCM80409.1, AFX68432.1, AFX68428.1, CAI39235.1, CAJ20021.1, CAE51924.1, AAS57946.1, Q66154.1, Q00260.1, CAA61802.1, P21368.1, BAB11693.1, AFV99523.1, AFV99515.1, AER25351.1, AFM56037.1, AFJ92022.1, AFH88687.1, AFC40207.1, BAL63166.1, AFA53169.1, AFA53167.1, BAL61194.1, AEU12505.1, AER35119.1, AEK86513.1, AEK69525.1, AEK69524.1, AEK33395.1, AEK33393.1, AEG79911.1, ADZ54767.1, ADZ54111.1, ADX86746.1, ADN84923.1, ACR14828.1, ACR14827.1, ABU62578.1, ACA13281.1, ABZ80826.1, ABY47903.1, ABY21424.1, ABY21420.1, ABY21419.1, ABY21418.1, ABY21413.1, ABX38992.1, ABV55389.1, ABV49618.1, ABO18588.1, ABO18589.1, ABN72590.1, ABN72591.1, ABN12319.1, ABN12316.1,

BAF44939.1, ABM46612.1, CAJ15158.1, ABC00922.1, ABC00921.1, ABC00928.1, ABC00923.1, ABI94145.1, ABI94151.1, ABI94129.1, ABI94150.1, BAF33384.1, ABI93181.1, ABE68905.1, ABC00927.1, AAS48545.1, AAR89470.1, AAR23529.1, AAQ82698.1, AAM95241.1, AAM97677.1, AAK52977.1, AAW71967.1, ABJ55780.1, CAH17693.1, CAH17700.1, CAH17692.1, Q66140.1, ABM63376.1, AGT15704.1, CAB41491.1, AAR89478.1, CCJ09634.1, AEK69527.1, ACS83801.1, AIC76582.1, AHJ58884.1, AHJ11231.1, AGJ94707.1, ACS83798.1, ACS83793.1, ABK81652.1, AAS57945.1, AAN04483.1, ADO66659.1, AAN17777.1, ADG26754.1, AFV99520.1, ABD73006.1, ACE07024.1, ABD64220.1, ABD72575.1, ABP87978.1, ABN13961.1, AAY85627.1, AGG16139.1, ACS83811.1, CAH17699.1, CAH17694.1, AFV69240.1, ACB56602.1, ADJ10637.1, ABM46614.1, AAY45749.1, AAA74484.1, CAH17697.1, ADA63484.1, ADA63482.1, ADA63480.1, Q83251.1, AIC76584.1, AIC76583.1, AAK27169.1, ABC00924.1, ACD62520.1, ABO18591.1, AAO62575.1, AAL48223.1, AIA99525.1, CAH17698.1, AAZ38725.1, AAF09246.2, CAH17701.1, ACB58305.1, AGG16158.1, CAH17695.1, AHJ58883.1, AEZ03836.1, BAB63959.1, ACD62519.1, BAF93912.1, AAZ78354.1, ACN38326.1, AFV99522.1, ADZ54109.1, CAA46151.1, AGV39213.1. Các ví dụ khác về protein vỏ của CMV được đề cập đến trong các trình tự từ SEQ ID NO.1 đến 3.

Cần lưu ý rằng các chủng và thể phân lập này có các trình tự protein vỏ tương đồng ở mức cao ở các vùng protein khác nhau, kể cả đầu tận cùng N của protein vỏ. Cụ thể, 98,1% trong số toàn bộ các thể phân lập CMV có trình tự hoàn chỉnh có độ tương đồng trình tự hơn 85% trong 28 axit amin thứ nhất của trình tự protein vỏ của chúng và thậm chí 79,5% trong số toàn bộ các thể phân lập CMV có trình tự hoàn chỉnh có độ tương đồng trình tự cao hơn 90% trong 28 axit amin thứ nhất của trình tự protein vỏ của chúng.

Thông thường và tốt hơn nếu protein vỏ của CMV được sử dụng theo sáng chế có khả năng tạo ra hạt tương tự virus của CMV khi biểu hiện bằng cách tự ghép. Tốt hơn, nếu protein vỏ của CMV được sử dụng theo sáng chế có khả năng tạo ra hạt tương tự virus của CMV khi biểu hiện bằng cách tự ghép trong *E.coli*.

Trình tự SEQ ID NO.1 tương ứng với trình tự axit amin của CP được phân lập và tách dòng từ lá cây hoa loa kèn được nhiễm bằng CMV có nguồn gốc từ vườn riêng ở

Riga, Latvia. Do đó, khi được sử dụng trong bản mô tả này, tốt hơn nếu thuật ngữ “protein vỏ của virus thể khảm gây bệnh ở cây dưa chuột (CMV)” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ trình tự axit amin của protein vỏ của CMV, trong đó trình tự axit amin này chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ, SEQ ID NO.1 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 75%, tốt hơn nếu ít nhất bằng 80%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 85%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 90%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 95%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 98% và tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 99% so với SEQ ID NO.1.

Theo phương án ưu tiên khác, protein vỏ của CMV nêu trên là trình tự axit amin của protein vỏ của CMV, trong đó trình tự axit amin này chứa SEQ ID NO.21 là các axit amin liên tiếp từ 2 đến 27 của SEQ ID NO.1 hoặc trình tự axit amin của protein vỏ của CMV chứa vùng trình tự axit amin, trong đó vùng trình tự axit amin này có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 75%, tốt hơn nếu ít nhất bằng 80%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 85%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 90%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 95%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 98% và tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 99% so với SEQ ID NO.21. Cụ thể, phương án này được ưu tiên do tốt hơn nếu epitop tế bào T hỗ trợ thay thế vùng tận cùng N của polypeptit CMV theo sáng chế. Tốt hơn, nếu độ tương đồng trình tự cao ở đầu tận cùng N của các CP của CMV với trình tự được sử dụng trong phần ví dụ thực hiện sáng chế, hiện nay bảo đảm rằng việc ghép thích hợp khi sự biểu hiện các CP có thể diễn ra bên cạnh sự thay thế của vùng tận cùng N nhờ epitop tế bào Th thường gây ra sự kết tụ.

Theo phương án ưu tiên khác, protein vỏ của CMV là (a) trình tự axit amin của protein vỏ của CMV, trong đó trình tự axit amin này chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ SEQ ID NO.1, hoặc (b) trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 75%, tốt hơn nếu ít nhất bằng 80%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 85%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 90%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 95%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 98% và tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 99% so với SEQ ID NO.1; và trong đó trình tự axit amin như được xác định trong mục (a) hoặc (b) chứa SEQ ID NO.21 là các axit amin liên tiếp từ 2 đến 27 của SEQ ID NO.1; hoặc trong đó trình tự axit amin như được xác định trong (a) hoặc (b) chứa vùng trình tự axit amin, trong đó vùng trình tự axit amin này có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 75%, tốt hơn nếu ít nhất bằng 80%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 85%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 90%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 95%, tốt hơn nữa nếu ít nhất

bằng 98% và tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 99% so với SEQ ID NO.21.

Hạt tương tự virus (VLP) được cải biến của virus thể khả gây bệnh ở cây dưa chuột (CMV): Thuật ngữ “hạt tương tự virus (VLP) được cải biến của virus thể khả gây bệnh ở cây dưa chuột (CMV)” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ VLP của CMV được cải biến theo cách sao cho nó chứa hoặc tốt hơn nếu chủ yếu bao gồm hoặc tốt hơn nếu bao gồm ít nhất một polypeptit CMV được cải biến, trong đó polypeptit CMV được cải biến này chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ, polypeptit CMV, và epitop tế bào T hỗ trợ. Thông thường và tốt hơn nếu epitop tế bào T hỗ trợ này (i) được dung hợp với đầu tận cùng N của polypeptit CMV, (ii) được dung hợp với đầu C của polypeptit CMV, (iii) thay thế vùng axit amin liên tiếp của polypeptit CMV, trong đó độ tương đồng trình tự giữa vùng được thay thế của axit amin liên tiếp của polypeptit CMV và epitop tế bào T hỗ trợ ít nhất bằng 15%, tốt hơn nếu ít nhất bằng 20%, hoặc (iv) thay thế vùng tận cùng N của polypeptit CMV và trong đó vùng tận cùng N được thay thế của polypeptit CMV này bao gồm từ 5 đến 15 axit amin liên tiếp. Tốt hơn, nếu epitop tế bào T hỗ trợ thay thế vùng tận cùng N của polypeptit CMV và trong đó vùng tận cùng N được thay thế của polypeptit CMV bao gồm từ 5 đến 15 axit amin liên tiếp, tốt hơn nếu từ 9 đến 14 axit amin liên tiếp, tốt hơn nữa là từ 11 đến 13 axit amin liên tiếp, và tốt nhất là 11, 12 hoặc 13 axit amin liên tiếp. Tốt hơn, nếu VLP được cải biến của CMV của sáng chế là VLP được cải biến tái tổ hợp của CMV.

Thuật ngữ “polypeptit CMV được cải biến” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ polypeptit CMV được cải biến theo cách như được xác định trong bản mô tả này, polypeptit CMV được cải biến chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ, polypeptit CMV, và epitop tế bào T hỗ trợ. Thông thường, polypeptit CMV được cải biến có khả năng tạo ra hạt tương tự virus của CMV khi biểu hiện bằng cách tự ghép. Tốt hơn, nếu polypeptit CMV được cải biến là polypeptit tái tổ hợp được cải biến của CMV và có khả năng tạo ra hạt tương tự virus của CMV khi biểu hiện bằng cách tự ghép ở *E.coli*.

Thuật ngữ “vùng tận cùng N của polypeptit CMV” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ đầu tận cùng N của polypeptit CMV, và cụ thể là đầu tận cùng N của protein vỏ của CMV hoặc vùng tận cùng N của polypeptit CMV hoặc protein vỏ của CMV nhưng bắt đầu với axit amin thứ hai của đầu tận cùng N của polypeptit CMV hoặc protein vỏ của CMV này nếu polypeptit CMV hoặc protein vỏ chứa gốc methionin ở đầu tận cùng

N. Tốt hơn, nếu theo quan điểm thực tiễn, trong trường hợp polypeptit CMV hoặc protein vỏ chứa gốc methionin ở đầu tận cùng N, bộ ba khởi đầu mã hoá methionin sẽ thường được loại bỏ và được bổ sung vào đầu tận cùng N của epitop tế bào T hỗ trợ. Tốt hơn nữa nếu một, hai hoặc ba axit amin bổ sung, tốt hơn nếu một axit amin, tùy ý có thể được chèn vào giữa methionin khởi đầu và epitop tế bào T hỗ trợ đối với mục đích tách dòng. Thuật ngữ “vùng tận cùng N của trình tự axit amin đột biến của polypeptit CMV hoặc protein vỏ của CMV” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ đầu tận cùng N của trình tự axit amin đột biến của polypeptit CMV hoặc protein vỏ của CMV, hoặc vùng tận cùng N của trình tự axit amin đột biến của polypeptit CMV hoặc protein vỏ của CMV nhưng khởi đầu với axit amin thứ hai ở đầu tận cùng N của trình tự axit amin đột biến của polypeptit CMV hoặc protein vỏ của CMV, nếu trình tự axit amin đột biến này chứa gốc methionin ở đầu tận cùng N. Tốt hơn, nếu theo quan điểm thực tiễn, trong trường hợp polypeptit CMV hoặc protein vỏ chứa gốc methionin ở đầu tận cùng N, bộ ba khởi đầu mã hoá methionin thường sẽ được loại bỏ và được bổ sung vào đầu tận cùng N của epitop tế bào T hỗ trợ. Tốt hơn nữa nếu một, hai hoặc ba axit amin bổ sung, tốt hơn nếu một axit amin, tùy ý có thể được chèn vào giữa methionin khởi đầu và epitop tế bào T hỗ trợ đối với mục đích tách dòng.

Thuật ngữ “polypeptit tái tổ hợp” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ polypeptit thu được bằng quy trình bao gồm ít nhất một bước của công nghệ ADN tái tổ hợp. Thông thường và tốt hơn nếu polypeptit tái tổ hợp được tạo ra trong hệ biểu hiện của sinh vật có nhân nguyên thủy. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng các polypeptit được tạo ra bằng phương pháp tái tổ hợp được biểu hiện trong hệ biểu hiện của sinh vật có nhân nguyên thủy như *E. coli* có thể chứa gốc methionin ở đầu tận cùng N. Gốc methionin ở đầu tận cùng N thường được phân cắt khỏi polypeptit tái tổ hợp ở vật chủ biểu hiện trong quá trình trưởng thành của polypeptit tái tổ hợp. Tuy nhiên, sự phân cắt methionin ở đầu tận cùng N có thể không hoàn toàn. Do đó, việc tạo ra chế phẩm polypeptit tái tổ hợp có thể bao gồm bước trộn hỗn hợp gồm các polypeptit giống nhau khác có và không có gốc methionin ở đầu tận cùng N. Thông thường và tốt hơn nếu việc tạo ra polypeptit tái tổ hợp chứa ít hơn 10%, tốt hơn nữa nếu ít hơn 5% và tốt hơn nữa nếu ít hơn 1% polypeptit tái tổ hợp với gốc methionin ở đầu tận cùng N.

Thuật ngữ “polypeptit tái tổ hợp của CMV” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ

polypeptit CMV như được xác định trên đây, thu được bằng quy trình bao gồm ít nhất một bước của công nghệ ADN tái tổ hợp. Thông thường và tốt hơn nếu tạo ra polypeptit tái tổ hợp của CMV chứa ít hơn 10%, tốt hơn nữa nếu ít hơn 5% và tốt hơn nữa nếu ít hơn 1% polypeptit tái tổ hợp của CMV với gốc methionin ở đầu tận cùng N. Do đó, hạt tương tự virus tái tổ hợp của sáng chế có thể chứa các polypeptit tái tổ hợp giống nhau khác có và không có gốc methionin ở đầu tận cùng N.

Thuật ngữ “polypeptit CMV được cải biến tái tổ hợp” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ polypeptit CMV được cải biến như được xác định trên đây thu được bằng quy trình bao gồm ít nhất một bước của công nghệ ADN tái tổ hợp. Thông thường và tốt hơn nếu tạo ra polypeptit CMV được cải biến tái tổ hợp chứa ít hơn 10%, tốt hơn nữa nếu ít hơn 5% và tốt hơn nữa nếu ít hơn 1% polypeptit CMV được cải biến tái tổ hợp với gốc methionin ở đầu tận cùng N. Do đó, hạt tương tự virus tái tổ hợp của sáng chế có thể chứa các polypeptit tái tổ hợp giống nhau khác có và không có gốc methionin ở đầu tận cùng N.

Thuật ngữ “hạt tương tự virus tái tổ hợp” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ hạt tương tự virus (VLP) thu được bằng quy trình bao gồm ít nhất một bước của công nghệ ADN tái tổ hợp. Thông thường và tốt hơn nếu hạt tương tự virus tái tổ hợp chứa ít nhất một polypeptit tái tổ hợp, tốt hơn nếu polypeptit tái tổ hợp của CMV hoặc polypeptit CMV được cải biến tái tổ hợp. Tốt nhất, nếu hạt tương tự virus tái tổ hợp bao gồm hoặc chứa các polypeptit CMV tái tổ hợp hoặc polypeptit CMV được cải biến tái tổ hợp. Do đó, sự định nghĩa về các VLP tái tổ hợp theo sáng chế được đưa ra có dựa vào các trình tự axit amin đặc hiệu chứa gốc methionin ở đầu tận cùng N, phạm vi của các VLP tái tổ hợp của sáng chế bao gồm các VLP được tạo ra bởi các trình tự axit amin đặc hiệu này không có gốc methionin ở đầu tận cùng N, mặc dù thường với lượng nhỏ như được thể hiện trong bản mô tả này, các VLP được tạo ra bởi các trình tự axit amin đặc hiệu với methionin đầu tận cùng N. Ngoài ra, vẫn sẽ nằm trong phạm vi bảo hộ của sáng chế nếu định nghĩa về các VLP tái tổ hợp của sáng chế được đưa ra có dựa vào các trình tự axit amin đặc hiệu chứa các VLP của gốc methionin ở đầu tận cùng N có cả trình tự axit amin vẫn chứa cả gốc methionin ở đầu tận cùng N và trình tự axit amin không có gốc methionin ở đầu tận cùng N.

Thuật ngữ “trình tự axit amin đột biến” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ

trình tự axit amin thu được bằng cách đưa tập hợp thể đột biến xác định vào trình tự axit amin cần được đột biến. Theo sáng chế, trình tự axit amin cần được đột biến thông thường và tốt hơn nếu trình tự axit amin của protein vỏ của CMV. Do đó, trình tự axit amin đột biến khác với trình tự axit amin của protein vỏ của CMV về ít nhất một gốc axit amin, trong đó trình tự axit amin đột biến và trình tự axit amin cần được đột biến này có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 90%. Thông thường và tốt hơn nếu trình tự axit amin đột biến và trình tự axit amin cần được đột biến này có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%. Tốt hơn, nếu trình tự axit amin đột biến và trình tự cần được đột biến này khác nhau nhiều nhất về 11, 10, 9, 8, 7, 6, 4, 3, 2, hoặc 1 gốc axit amin, trong đó tốt hơn nữa nếu sự khác nhau này được chọn từ sự chèn đoạn, khuyết đoạn và trao đổi axit amin. Tốt hơn, nếu trình tự axit amin đột biến khác với trình tự axit amin của protein vỏ của CMV về ít nhất một axit amin, trong đó tốt hơn nếu sự khác nhau này là sự trao đổi axit amin.

Vị trí tương ứng với gốc...: vị trí trên trình tự axit amin tương ứng với các gốc nhất định của trình tự axit amin khác có thể được xác định bằng cách dóng thẳng hàng trình tự, thông thường và tốt hơn nếu bằng cách sử dụng thuật toán BLASTP, tốt nhất là bằng cách sử dụng các thiết lập tiêu chuẩn. Các thiết lập tiêu chuẩn thông thường và được ưu tiên là: ngưỡng dự kiến: 10; cỡ chữ: 3; mức độ phù hợp tối đa trong khoảng truy vấn: 0; ma trận: BLOSUM62; chi phí khoảng trống: tồn tại 11, mở rộng 1; điều chỉnh bố cục: điều chỉnh ma trận điểm số theo bố cục điều kiện.

Độ tương đồng trình tự của hai trình tự axit amin nhất định được xác định dựa trên việc dóng thẳng hàng của hai trình tự. Các thuật toán để xác định độ tương đồng trình tự là sẵn có đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Tốt hơn, nếu độ tương đồng trình tự của hai trình tự axit amin được xác định bằng cách sử dụng chương trình tương đồng trên máy tính sẵn có công cộng như chương trình “BLAST” (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) hoặc “CLUSTALW” (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>) và theo đó tốt hơn nếu chương trình “BLAST” được cung cấp trên trang chủ NCBI ở <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, bằng cách sử dụng các thiết lập mặc định được trên đó. Các thiết lập tiêu chuẩn thông thường và được ưu tiên là: ngưỡng dự kiến: 10; cỡ chữ: 3; mức độ phù hợp tối đa trong khoảng truy vấn: 0; ma trận: BLOSUM62; chi phí khoảng trống: tồn tại 11, mở rộng 1; điều chỉnh bố

cục: điều chỉnh ma trận điểm số theo bộ cục điều kiện.

Thuật ngữ “sự trao đổi axit amin” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ sự trao đổi của gốc axit amin nhất định trong trình tự axit amin bằng gốc axit amin khác bất kỳ có cấu trúc hoá học khác nhau, tốt hơn nếu bằng gốc axit amin sinh protein khác. Do đó, trái với sự chèn đoạn hoặc làm khuyết đoạn axit amin, sự trao đổi axit amin không làm thay đổi tổng số axit amin của trình tự axit amin. Rất được ưu tiên theo sáng chế là sự trao đổi gốc axit amin của trình tự axit amin cần được đột biến bằng gốc lysin hoặc gốc xystein.

Thuật ngữ “epitop” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ các phần liên tục hoặc gián đoạn của kháng nguyên, tốt hơn nếu polypeptit, trong đó các phần này có thể được gắn kết đặc hiệu bởi kháng thể hoặc thụ thể tế bào T trong ngữ cảnh về phân tử MHC. Đối với các kháng thể, sự gắn kết đặc hiệu loại trừ sự gắn kết không đặc hiệu nhưng không nhất thiết phải loại trừ khả năng phản ứng chéo. Epitop thường bao gồm từ 5 đến 20 axit amin trong cấu hình không gian là duy nhất với vị trí kháng nguyên.

Thuật ngữ “epitop tế bào T hỗ trợ (Th)” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ epitop có khả năng nhận biết bởi tế bào Th hỗ trợ.

Thuật ngữ “epitop tế bào T hỗ trợ toàn phần” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ epitop tế bào T hỗ trợ có khả năng gắn kết với ít nhất một, tốt hơn nếu nhiều hơn một phân tử MHC nhóm II. Cách đơn giản nhất để xác định xem trình tự peptit có phải là epitop tế bào T hỗ trợ toàn phần hay không để xác định khả năng gắn kết của peptit với các phân tử MHC nhóm II riêng biệt. Điều này có thể được xác định theo khả năng của peptit cạnh tranh với sự gắn kết của peptit epitop tế bào T hỗ trợ đã biết với phân tử MHC nhóm II. Việc lựa chọn đại diện của các phân tử HLA-DR được mô tả trong tài liệu, ví dụ: Alexander J, et al., *Immunity* (1994) 1:751-761. Ái lực của các epitop tế bào T hỗ trợ đối với các phân tử MHC nhóm II cần phải ít nhất bằng 10^{-5} M. Cách khác, dài hơn nhưng cũng là cách thích hợp hơn để xác định “tính gốc” của epitop tế bào T hỗ trợ là chứng minh phần lớn người (>30%) tạo ra đáp ứng tế bào T có thể xác định được khi gây miễn dịch và một tháng sau đó nhắc lại bằng protein chứa epitop tế bào T hỗ trợ được bào chế trong IFA. Tập hợp các phân tử MHC nhóm II làm đại diện có mặt trong các đối tượng khác nhau được đưa ra trong tài liệu: Panina-Bordignon P, et al., *Eur J Immunol* (1989) 19:2237-2242. Do đó, tốt hơn nếu thuật ngữ “epitop tế bào T hỗ trợ toàn phần” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ epitop tế bào T

hỗ trợ tạo ra đáp ứng tế bào T có thể xác định được khi gây miễn dịch và nhắc lại (sau đó một tháng bằng protein chứa epitop tế bào T hỗ trợ được bào chế trong IFA) là hơn 30% nhóm đối tượng được chọn như được mô tả trong tài liệu: Panina-Bordignon P, et al., Eur J Immunol (1989) 19:2237-2242. Ngoài ra và được ưu tiên hơn nữa, khi được sử dụng trong bản mô tả này, tốt hơn nếu thuật ngữ “epitop tế bào T hỗ trợ toàn phần” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ epitop tế bào T hỗ trợ có khả năng gắn kết với ít nhất một, tốt hơn nếu với ít nhất hai và thậm chí tốt hơn nữa là với ít nhất ba alen DR được chọn từ DR1, DR2w2b, DR3, DR4w4, DR4w14, DR5, DR7, DR52a, DRw53, DR2w2a; và tốt hơn nếu được chọn từ DR1, DR2w2b, DR4w4, DR4w14, DR5, DR7, DRw53, DR2w2a, với ái lực ít nhất bằng 500nM (như được mô tả trong tài liệu: Alexander J, et al., Immunity (1994) 1:751-761 được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn); thử nghiệm gắn kết được ưu tiên để đánh giá các ái lực nêu trên là thử nghiệm được mô tả trong tài liệu: Sette A, et al., J Immunol (1989) 142:35-40. Theo cách được ưu tiên đặc biệt hơn nữa, Thuật ngữ “epitop tế bào T hỗ trợ toàn phần” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ epitop tế bào T hỗ trợ có khả năng gắn kết với ít nhất một, tốt hơn nếu với ít nhất hai và đặc biệt tốt hơn nữa là với ít nhất ba alen DR được chọn từ DR1, DR2w2b, DR4w4, DR4w14, DR5, DR7, DRw53, DR2w2a, với ái lực ít nhất bằng 500nM (như được mô tả trong tài liệu: Alexander J, et al., Immunity (1994) 1:751-761 được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn); thử nghiệm gắn kết được ưu tiên để đánh giá các ái lực nêu trên là thử nghiệm được mô tả trong tài liệu: Sette A, et al., J Immunol (1989) 142:35-40.

Các epitop tế bào T hỗ trợ toàn phần được mô tả và đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, như trong tài liệu: Alexander J, et al., Immunity (1994) 1:751-761, Panina-Bordignon P, et al., Eur J Immunol (1989) 19:2237-2242, Calvo-Calle JM, et al., J Immunol (1997) 159:1362-1373, và Valmori D, et al., J Immunol (1992) 149:717-721.

Theo phương án ưu tiên của sáng chế, epitop tế bào T hỗ trợ được chọn từ HA 307-319 (SEQ ID NO.26), HBVnc 50-69 (SEQ ID NO.27), TT 830-843 (SEQ ID NO.4), CS 378-398 (SEQ ID NO.28), MT 17-31 (SEQ ID NO.29), TT 947-967 (SEQ ID NO.30) và PADRE (SEQ ID NO.5). Theo phương án ưu tiên khác, epitop tế bào T hỗ trợ toàn phần được chọn từ HA 307-319 (SEQ ID NO.26), HBVnc 50-69 (SEQ ID NO.27), TT 830-843 (SEQ ID NO.4), CS 378-398 (SEQ ID NO.28), MT 17-31 (SEQ ID NO.29), TT

947-967 (SEQ ID NO.30) và PADRE (SEQ ID NO.5). Theo phương án ưu tiên, epitop tế bào T hỗ trợ là TT 830-843 (SEQ ID NO.4) hoặc PADRE (SEQ ID NO.5). Theo phương án ưu tiên khác, epitop tế bào T hỗ trợ toàn phần là TT 830-843 (SEQ ID NO.4) hoặc PADRE (SEQ ID NO.5). Do đó, theo phương án ưu tiên, epitop tế bào T hỗ trợ nêu trên là TT 830-843 (SEQ ID NO.4). Theo phương án ưu tiên khác, epitop tế bào T hỗ trợ nêu trên là PADRE (SEQ ID NO.5). Theo phương án ưu tiên khác, epitop tế bào T hỗ trợ toàn phần là TT 830-843 (SEQ ID NO.4). Theo phương án ưu tiên khác, epitop tế bào T hỗ trợ toàn phần là PADRE (SEQ ID NO.5). Các epitop của SEQ ID NO.4 và SEQ ID NO.5 là đã biết và thậm chí các ứng dụng của nó đã được mô tả (Alexander J, et al., *Immunity* (1994) 1:751-761; Panina-Bordignon P, et al., *Eur J Immunol* (1989) 19:2237-2242; Valmori D, et al., *J Immunol* (1992) 149:717-721; Lanzavecchia A, et al. *Eur J Immunol* (1983) 13:733-738; Jemon K, et al., *PLoS ONE* (2013) 8(6): e66866; Jagu S, et al., *PLoS ONE* (2012) 8(1): e55538.

Hiệu quả ghép cặp của hạt tương tự virus với kháng nguyên đặc hiệu được xác định bằng phương pháp SDS-PAGE của các phản ứng ghép cặp. Cường độ của các dải chất nhuộm xanh Coomassie tương ứng với các thành phần của phản ứng ghép cặp được xác định bằng phương pháp đo mật độ và được sử dụng để tính hiệu quả ghép cặp. Hiệu quả ghép cặp được xác định theo tỷ lệ polypeptit của VLP được ghép cặp với kháng nguyên nêu trên với tổng lượng polypeptit của VLP.

Thuật ngữ “tá được” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ các tác nhân kích thích không đặc hiệu của đáp ứng miễn dịch hoặc các chất cho phép tạo ra kho chứa ở vật chủ mà khi được kết hợp tương ứng với vắc xin và dược phẩm của sáng chế có thể tạo ra đáp ứng miễn dịch thậm chí được gia tăng nhiều hơn. Các tá được được ưu tiên là tá được Freund toàn vẹn và không toàn vẹn, tá được chứa nhôm, tốt hơn nếu nhôm hydroxit và muramyldipeptit được cải biến. Các tá được được ưu tiên khác là các gel khoáng như nhôm hydroxit, chất hoạt động bề mặt như lyso lexitin, pluronic polyol, polyanion, peptit, nhũ tương dầu, hemoxyanin hòa, dinitrophenol và các tá được dùng cho người như BCG (*bacille Calmette Guérin*) và *Corynebacterium parvum*. Các tá được này cũng đã được biết rõ trong lĩnh vực này. Các tá được khác có thể được sử dụng với chế phẩm của sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chất điều biến miễn dịch monophosphoryl lipid, AdjuVax 100a, QS-21, QS-18, CRL1005, các muối nhôm (Alum), MF-59, OM-174,

OM-197, OM-294, và công nghệ tá dược virosom. Các tá dược cũng có thể bao gồm hỗn hợp của các chất này. Hạt tương tự virus được mô tả chung như tá dược. Tuy nhiên, Thuật ngữ “tá dược” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ tá dược không phải là hạt tương tự virus theo sáng chế. Tốt hơn, nếu “tá dược” đề cập đến thành phần bổ sung khác biệt của chế phẩm, vaccin hoặc dược phẩm của sáng chế.

Thuật ngữ “kháng nguyên” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ phân tử có khả năng được gắn kết bởi kháng thể hoặc thụ thể tế bào T (T-cell receptor : TCR) nếu được thể hiện bởi các phân tử MHC. Thuật ngữ “kháng nguyên” cũng được sử dụng trong bản mô tả để chỉ các epitop của tế bào T. Kháng nguyên còn có khả năng được nhận biết bởi hệ miễn dịch và/hoặc có khả năng gây đáp ứng miễn dịch thể dịch và/hoặc đáp ứng miễn dịch tế bào dẫn đến sự hoạt hoá của các tế bào lympho B và/hoặc T. Tuy nhiên, việc này có thể cần phải có, ít nhất bằng trong các trường hợp nhất định, kháng nguyên chứa hoặc được liên kết với epitop tế bào Th và được đưa vào tá dược. Kháng nguyên có thể có một hoặc nhiều epitop (epitop B và T). Phản ứng đặc hiệu nêu trên có nghĩa là thể hiện rằng tốt hơn nếu kháng nguyên sẽ phản ứng, thường theo cách chọn lọc ở mức cao, với kháng thể hoặc TCR tương ứng của nó và không phản ứng với nhiều kháng thể khác hoặc các TCR có thể được kích hoạt bởi các kháng nguyên khác. Khi được sử dụng trong bản mô tả này, các kháng nguyên cũng có thể là hỗn hợp của vài kháng nguyên riêng biệt. Polypeptit theo sáng chế tạo ra hạt tương tự virus của sáng chế, có thể chứa kháng nguyên. Cụ thể, polypeptit theo sáng chế có thể là sản phẩm dung hợp chứa kháng nguyên. Tuy nhiên, thuật ngữ kháng nguyên không bao gồm trình tự axit amin đột biến được cấu thành bởi polypeptit này. Thông thường và tốt hơn nếu Thuật ngữ “kháng nguyên” không bao gồm hạt tương tự virus theo sáng chế. Thông thường và tốt hơn nếu thuật ngữ “kháng nguyên” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ thành phần bổ sung của các chế phẩm, vaccin và dược phẩm của sáng chế có các đặc tính kháng nguyên, trong đó kháng nguyên này có thể được kết hợp, gắn kết, trộn với hoặc liên kết với hạt tương tự virus bằng các phương tiện bất kỳ được mô tả trong bản mô tả này.

Thuật ngữ “được kết hợp” hoặc “kết hợp” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ toàn bộ các cách có thể thực hiện được, tốt hơn nếu các tương tác hoá học mà khi đó hai phân tử được kết hợp cùng nhau. Các tương tác hoá học bao gồm tương tác cộng hoá trị và tương tác không cộng hoá trị. Các ví dụ điển hình về tương tác không cộng hoá trị là

tương tác ion, tương tác kỵ nước hoặc liên kết hydro, trong khi đó các tương tác cộng hoá trị trên cơ sở, ví dụ, các liên kết cộng hoá trị như este, ete, phosphoeste, liên kết cacbon-phospho, liên kết cacbon-lưu huỳnh như thioete hoặc liên kết imit.

Thuật ngữ “vị trí liên kết thứ nhất” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ phần tử có trong tự nhiên với hạt tương tự virus hoặc được bổ sung bằng phương pháp nhân tạo vào hạt tương tự virus, và với vị trí liên kết thứ hai mà nó có thể được liên kết với. Tốt hơn, nếu vị trí liên kết thứ nhất là protein, polypeptit, axit amin, peptit, đường, polynucleotit, polyme tự nhiên hoặc tổng hợp, chất chuyển hoá thứ cấp hoặc hợp chất (biotin, fluorescein, retinol, digoxigenin, các ion kim loại, phenylmethylsulfonyl florua) hoặc nhóm có khả năng phản ứng hoá học như nhóm amin, nhóm carboxyl, nhóm sulfhydryl, nhóm hydroxyl, nhóm guanidiny, nhóm histidiny hoặc hỗn hợp của chúng. Phương án ưu tiên của nhóm có khả năng phản ứng hoá học ở vị trí liên kết thứ nhất là nhóm amin của gốc axit amin, tốt hơn nếu gốc lysin. Vị trí liên kết thứ nhất thường nằm trên bề mặt và tốt hơn nếu trên mặt ngoài của VLP. Nhiều vị trí liên kết thứ nhất có mặt trên bề mặt, tốt hơn nếu trên mặt ngoài của VLP, thường là trong cấu hình lặp lại. Theo phương án ưu tiên, vị trí liên kết thứ nhất được kết hợp với VLP, bằng ít nhất một liên kết cộng hoá trị, tốt hơn nếu bằng ít nhất một liên kết peptit. Theo phương án ưu tiên khác, vị trí liên kết thứ nhất có trong tự nhiên với VLP. Theo cách khác, theo phương án ưu tiên, vị trí liên kết thứ nhất được bổ sung bằng phương pháp nhân tạo vào VLP. Theo phương án ưu tiên, vị trí liên kết thứ nhất nêu trên là nhóm amin của gốc lysin của trình tự axit amin của polypeptit của VLP.

Thuật ngữ “vị trí liên kết thứ hai” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ phần tử có trong tự nhiên với hoặc được bổ sung bằng phương pháp nhân tạo vào kháng nguyên và vị trí liên kết thứ nhất mà nó có thể được liên kết với. Tốt hơn, nếu vị trí liên kết thứ hai của kháng nguyên là protein, polypeptit, peptit, axit amin, đường, polynucleotit, polyme tự nhiên hoặc tổng hợp, chất chuyển hoá thứ cấp hoặc hợp chất (biotin, fluorescein, retinol, digoxigenin, ion kim loại, phenylmethylsulfonyl florua), hoặc nhóm có khả năng phản ứng hoá học như nhóm amin, nhóm carboxyl, nhóm sulfhydryl, nhóm hydroxyl, nhóm guanidiny, nhóm histidiny hoặc hỗn hợp của chúng. Phương án ưu tiên của nhóm có khả năng phản ứng hoá học ở vị trí liên kết thứ hai là nhóm sulfhydryl, tốt hơn nếu nhóm sulfhydryl của cystein của axit amin, tốt nhất nếu là nhóm sulfhydryl của gốc

xystein. Do đó, thuật ngữ “kháng nguyên với ít nhất một vị trí liên kết thứ hai” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ cấu trúc chứa kháng nguyên và ít nhất một vị trí liên kết thứ hai. Tuy nhiên, cụ thể là đối với vị trí liên kết thứ hai, thành phần không xuất hiện tự nhiên trong kháng nguyên, như cấu trúc thông thường và tốt hơn nếu còn bao gồm “gốc liên kết”. Theo phương án ưu tiên khác, vị trí liên kết thứ hai được kết hợp với kháng nguyên bằng ít nhất một liên kết cộng hoá trị, tốt hơn nếu bằng ít nhất một liên kết peptit. Theo phương án khác, vị trí liên kết thứ hai xuất hiện tự nhiên trong kháng nguyên. Theo phương án ưu tiên khác, vị trí liên kết thứ hai được bổ sung bằng phương pháp nhân tạo vào kháng nguyên qua gốc liên kết, trong đó gốc liên kết này chứa hoặc theo cách khác bao gồm xystein. Tốt hơn, nếu gốc liên kết được dung hợp với kháng nguyên bằng liên kết peptit.

Thuật ngữ “được liên kết” hoặc “liên kết” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ toàn bộ cách có thể thực hiện được, tốt hơn nếu các tương tác hoá học, mà nhờ đó ít nhất một vị trí liên kết thứ nhất và ít nhất một vị trí liên kết thứ hai được kết hợp cùng nhau. Các tương tác hoá học bao gồm tương tác cộng hoá trị và tương tác không cộng hoá trị. Các ví dụ thông thường về tương tác không cộng hoá trị là tương tác ion, tương tác kỵ nước hoặc liên kết hydro, trong khi các tương tác cộng hoá trị được dựa trên, ví dụ, liên kết cộng hoá trị như este, ete, phosphoeste, liên kết cacbon-phospho, liên kết cacbon-lưu huỳnh như thioete hoặc liên kết imit. Theo một số phương án ưu tiên nhất định, vị trí liên kết thứ nhất và vị trí liên kết thứ hai được liên kết bằng ít nhất một liên kết cộng hoá trị, tốt hơn nếu qua ít nhất một liên kết không peptit và thậm chí tốt hơn nữa là chỉ qua (các) liên kết không peptit. Tuy nhiên, Thuật ngữ “được liên kết” sẽ không chỉ dùng được sử dụng trong bản mô tả để chỉ sự liên kết trực tiếp của ít nhất một vị trí liên kết thứ nhất và ít nhất một vị trí liên kết thứ hai mà ngoài ra, theo cách khác và tốt hơn, nếu sự liên kết gián tiếp của ít nhất một vị trí liên kết thứ nhất và ít nhất một vị trí liên kết thứ hai qua (các) phân tử trung gian và nhờ đó thông thường và tốt hơn nếu bằng cách sử dụng ít nhất một, tốt hơn nếu một gốc liên kết chéo có hai chức khác nhau. Theo các phương án ưu tiên khác, vị trí liên kết thứ nhất và vị trí liên kết thứ hai được liên kết thông qua ít nhất một liên kết cộng hoá trị, tốt hơn nếu qua ít nhất một liên kết peptit và thậm chí tốt hơn nữa là chỉ qua (các) liên kết peptit.

Thuật ngữ “gốc liên kết”, kết hợp vị trí liên kết thứ hai với kháng nguyên hoặc đã

bao gồm, chủ yếu gồm có hoặc gồm có vị trí liên kết thứ hai. Tốt hơn nếu thuật ngữ “gốc liên kết” đã bao gồm vị trí liên kết thứ hai, thông thường và tốt hơn nếu - nhưng không nhất thiết - như một gốc axit amin, tốt hơn nếu như gốc xystein. Các gốc liên kết được ưu tiên là các gốc liên kết axit amin, nghĩa là các gốc liên kết chứa ít nhất một gốc axit amin. Thuật ngữ gốc liên kết axit amin không ngụ ý rằng gốc liên kết chỉ gồm có gốc axit amin. Tuy nhiên, gốc liên kết chỉ gồm có gốc axit amin là phương án ưu tiên của sáng chế. Tốt hơn, nếu các gốc axit amin của gốc liên kết gồm có axit amin có trong tự nhiên hoặc axit amin không có trong tự nhiên đã biết trong lĩnh vực này, toàn bộ các dạng L hoặc toàn bộ các dạng D hoặc hỗn hợp của chúng. Do đó, các phương án ưu tiên hơn của gốc liên kết theo sáng chế là các phân tử chứa nhóm sulfhydryl hoặc gốc xystein và các phân tử này cũng thuộc phạm vi của sáng chế. Các gốc liên kết khác hữu ích theo sáng chế là các phân tử bao gồm gốc C1-C6alkyl-, xycloalkyl như xyclopentyl hoặc xyclohexyl, xycloalkenyl, aryl hoặc heteroaryl. Ngoài ra, tốt hơn nếu các gốc liên kết bao gồm gốc C1-C6alkyl-, xycloalkyl-(C5,C6), aryl- hoặc heteroaryl- và (các) axit amin bổ sung cũng có thể được sử dụng làm gốc liên kết theo sáng chế và sẽ thuộc phạm vi bảo hộ của sáng chế. Tốt hơn, nếu sự kết hợp của gốc liên kết với kháng nguyên qua ít nhất một liên kết cộng hoá trị, tốt hơn nữa là qua ít nhất một liên kết peptit.

Thuật ngữ “dãy kháng nguyên theo thứ tự và lặp lại” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ mẫu lặp lại của kháng nguyên mà thông thường và tốt hơn nếu khác biệt bởi tính đồng nhất ở mức cao theo cách bố trí trong không gian của các kháng nguyên tương đối với VLP. Theo một phương án của sáng chế, mẫu lặp lại có thể là mẫu hình học. Các phương án nhất định của sáng chế, như các kháng nguyên được ghép cặp với VLP của sáng chế, là các ví dụ thông thường và được ưu tiên của các dãy kháng nguyên có thứ tự và lặp lại thích hợp, ngoài ra, có thứ tự kháng nguyên tiền tinh thể lặp lại nghiêm ngặt, tốt hơn nếu với khoảng cách từ 1 đến 30nm, tốt hơn nếu từ 2 đến 15nm, tốt hơn nữa là từ 2 đến 10nm, đặc biệt tốt hơn nữa là từ 2 đến 8nm và tốt hơn nữa là từ 1,6 đến 7nm.

Thuật ngữ “protein Fel d1” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ protein chứa hoặc theo cách khác bao gồm chuỗi 1 của Fel d1 và chuỗi 2 của Fel d1. Tốt hơn, nếu chuỗi 1 của Fel d1 và chuỗi 2 của Fel d1 được liên kết cộng hoá trị. Theo một phương án ưu tiên, chuỗi 1 của Fel d1 và chuỗi 2 của Fel d1 được liên kết thông qua ít nhất một liên kết disulfua. Theo phương án ưu tiên khác, chuỗi 1 và chuỗi 2 được dung hợp trực tiếp hoặc

qua đoạn đệm mà trong trường hợp đó protein Fel d1 còn chứa hoặc theo cách khác bao gồm đoạn đệm. Tốt hơn, nếu khi được xác định trong bản mô tả này, protein Fel d1 gồm tối đa 300, thậm chí tốt hơn nữa là tổng số tối đa 200 axit amin. Thông thường và tốt hơn nếu protein Fel d1 theo sáng chế có khả năng gây ra kháng thể gắn kết đặc hiệu *in vivo* với Fel d1 có trong tự nhiên hoặc Fel d1 tái tổ hợp như được tạo ra theo Ví dụ 8 của sáng chế.

Thuật ngữ “chuỗi 1 của Fel d1” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ polypeptit chứa hoặc theo cách khác bao gồm trình tự axit amin như của SEQ ID NO.37 hoặc trình tự tương đồng của nó. Thuật ngữ “trình tự tương đồng của SEQ ID NO.37” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ polypeptit có mức độ giống với SEQ ID NO.37 lớn hơn 80%, tốt hơn nữa là lớn hơn 90% và đặc biệt tốt hơn nữa là lớn hơn 95%. Thuật ngữ “chuỗi 1 của Fel d1” cũng sẽ dùng được sử dụng trong bản mô tả để chỉ polypeptit bao gồm ít nhất một quá trình cải biến sau dịch mã bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ít nhất một quá trình glycosyl hoá, của chuỗi 1 của Fel d1, khi được xác định trong bản mô tả này. Tốt hơn, nếu khi được xác định trong bản mô tả này, chuỗi 1 của Fel d1 cấu thành tối đa từ 130, thậm chí tốt hơn nữa nếu tối đa tổng số có 100 axit amin.

Thuật ngữ “chuỗi 2 của Fel d1” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ polypeptit chứa hoặc theo cách khác bao gồm trình tự axit amin như của SEQ ID NO.38, SEQ ID NO.39 hoặc SEQ ID NO.40, hoặc trình tự tương đồng của nó. Thuật ngữ “trình tự tương đồng của SEQ ID NO.38, SEQ ID NO.39 hoặc SEQ ID NO.40” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ polypeptit có mức độ giống với SEQ ID NO.38, SEQ ID NO.39 hoặc SEQ ID NO.40 lớn hơn 80%, tốt hơn nữa là lớn hơn 90% và đặc biệt tốt hơn nữa là lớn hơn 95%. Thuật ngữ “chuỗi 2 của Fel d1” cũng cần dùng được sử dụng trong bản mô tả để chỉ polypeptit bao gồm ít nhất một quá trình sửa đổi sau dịch mã, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, ít nhất một quá trình glycosyl hoá, của chuỗi 2 của Fel d1, khi được xác định trong bản mô tả này. Tốt hơn, nếu khi được xác định trong bản mô tả này, chuỗi 2 của Fel d1 bao gồm nhiều nhất 150, thậm chí tốt hơn nữa là nhiều nhất 130, tốt hơn nữa nếu tối đa tổng số có 100 axit amin.

Thuật ngữ “chất kích thích miễn dịch” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ chất có khả năng gây ra và/hoặc tăng cường đáp ứng miễn dịch. Khi được sử dụng trong bản mô tả này, chất kích thích miễn dịch bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chất hoạt hoá

thụ thể tương tự toll và các chất gây tiết xytokin. Chất hoạt hoá thụ thể tương tự toll bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, axit nucleic kích thích miễn dịch, peptideoglycan, lipopolysacarit, axit lipoteichonic, các hợp chất imidazoquinolin, flagelin, lipoprotein và các chất hữu cơ kích thích miễn dịch như taxol.

Thuật ngữ axit nucleic kích thích miễn dịch được sử dụng trong bản mô tả để chỉ axit nucleic có khả năng gây ra và/hoặc tăng cường đáp ứng miễn dịch. Axit nucleic kích thích miễn dịch bao gồm các axit ribonucleic và cụ thể là axit desoxyribonucleic, trong đó cả axit ribonucleic và axit desoxyribonucleic có thể là sợi kép hoặc sợi đơn. ISS-NA được ưu tiên là axit desoxyribonucleic, trong đó tốt hơn nữa nếu axit desoxyribonucleic là sợi đơn. Tốt hơn, nếu các axit nucleic kích thích miễn dịch chứa ít nhất một cấu trúc CpG chứa C không được metyl hoá. Các axit nucleic kích thích miễn dịch rất được ưu tiên chứa ít nhất một cấu trúc CpG, trong đó ít nhất một cấu trúc CpG chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ ít nhất một, tốt hơn nếu một, dinucleotit CG, trong đó C không được metyl hoá. Tốt hơn, nếu nhưng không nhất thiết, dinucleotit CG này là một phần của trình tự ngược xuôi giống nhau. Thuật ngữ axit nucleic kích thích miễn dịch được sử dụng trong bản mô tả để chỉ axit nucleic chứa các bazơ được cải biến, tốt hơn nếu 4-bromoxytosin. Được ưu tiên đặc biệt trong bản mô tả này là ISS-NA có khả năng kích thích sự tạo ra IFN-alpha trong tế bào có tua. Các axit nucleic kích thích miễn dịch hữu ích đối với mục đích của sáng chế được mô tả, ví dụ, trong công bố đơn quốc tế số WO2007/068747A1.

Thuật ngữ “oligonucleotit” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ trình tự axit nucleic chứa 2 hoặc nhiều nucleotit, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 6 đến 200 nucleotit và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 20 đến 100 nucleotit và tốt nhất là nằm trong khoảng từ 20 đến 40 nucleotit. Rất được ưu tiên là các oligonucleotit chứa khoảng 30 nucleotit, tốt hơn nữa nếu oligonucleotit bao gồm chính xác 30 nucleotit và tốt nhất nếu các oligonucleotit bao gồm chính xác 30 nucleotit. Các oligonucleotit là polyribonucleotit hoặc polydeoxribonucleotit và tốt hơn nếu được chọn từ (a) ARN hoặc ADN không được cải biến và (b) ARN hoặc ADN cải biến. Việc cải biến có thể bao gồm thể tương tự khung chính hoặc nucleotit. Tốt hơn, nếu oligonucleotit được chọn từ nhóm bao gồm (a) ADN sợi đơn và sợi kép, (b) ADN là hỗn hợp của các vùng sợi đơn và sợi kép, (c) ARN sợi đơn và sợi kép, (d) ARN là hỗn hợp của các vùng sợi đơn và sợi kép và (e) các phân

tử lai chứa ADN và ARN là sợi đơn hoặc tốt hơn nếu sợi kép hoặc hỗn hợp của các vùng sợi đơn và sợi kép. Các cải biến/thể tương tự nucleotit được ưu tiên được chọn từ nhóm bao gồm (a) axit peptit nucleic, (b) inosin, (c) các bazơ được trityl hoá, (d) phosphorothioat, (e) alkylphosphorothioat, (f) 5-nitroindol desoxyribofliranosyl, (g) 5-metyldesoxyxytosin và (h) 5,6-dihydro-5,6-dihydroxydesoxythymidin. Các nucleotit được phosphothioat hoá được bảo vệ đối với quá trình thoái biến trong tế bào hoặc sinh vật và do đó là các cải biến nucleotit được ưu tiên. Các oligonucleotit không được cải biến chỉ bao gồm phosphodiester gắn kết nucleotit, thường có hoạt tính cao hơn so với các nucleotit được cải biến và do đó thường được ưu tiên theo sáng chế. Được ưu tiên nhất là các oligonucleotit chỉ bao gồm phosphodiester gắn kết deoxinucleotit, trong đó tốt hơn nữa nếu các oligonucleotit này là sợi đơn. Được ưu tiên hơn là các oligonucleotit có khả năng kích thích sự tạo ra IFN-alpha trong tế bào, tốt hơn nếu trong tế bào có tua. Các oligonucleotit rất được ưu tiên có khả năng kích thích sự tạo ra IFN-alpha trong tế bào được chọn từ các CpG typ A và CpG typ C. Được ưu tiên hơn là các phân tử ARN không có Cap.

Thuật ngữ “cấu trúc CpG được sử dụng trong bản mô tả để chỉ mẫu nucleotit bao gồm CpG ở giữa không được metyl hoá, nghĩa là CpG dinucleotit không được metyl hoá, trong đó C không được metyl hoá, được bao quanh bởi ít nhất một bazơ, tốt hơn nếu một hoặc hai nucleotit, chặn (ở phía đầu 3’ và 5’ của) CpG ở giữa. Thông thường và tốt hơn nếu khi được sử dụng trong bản mô tả này, cấu trúc CpG chứa hoặc theo cách khác bao gồm CpG dinucleotit không được metyl hoá và hai nucleotit ở các đầu 5’ và 3’ của nó. Không muốn bị giới hạn bởi lý thuyết, các bazơ chặn CpG tạo ra phân hoạt tính đáng kể đối với CpG oligonucleotit.

Thuật ngữ “oligonucleotit chứa CpG không được metyl hoá” hoặc “CpG” dùng được sử dụng trong bản mô tả để chỉ oligonucleotit, tốt hơn nếu oligodesoxynucleotit, chứa ít nhất một cấu trúc CpG. Do đó, CpG chứa ít nhất một xytosin không được metyl hoá, guanin dinucleotit. Các CpG được ưu tiên kích thích/hoạt hoá, ví dụ, có tác dụng phân chia tế bào hoặc cảm ứng hoặc tăng cường mức độ biểu hiện xytokin, bởi tế bào có nguồn gốc từ tủy xương của động vật có xương sống. Ví dụ, các CpG có thể hữu ích để hoạt hoá tế bào B, tế bào NK và tế bào trình diện kháng nguyên, như tế bào có tua, bạch cầu đơn nhân to và đại thực bào. Tốt hơn, nếu CpG được sử dụng trong bản mô tả để chỉ

oligodesoxynucleotit, tốt hơn nếu oligodesoxynucleotit sợi đơn, chứa xytosin không được metyl hoá sau đầu 3' của guanosin, trong đó xytosin không được metyl hoá và guanosin này được liên kết bởi liên kết phosphat, trong đó tốt hơn nữa nếu liên kết phosphat là liên kết phosphodiester hoặc liên kết phosphothioat và trong đó tốt hơn nữa nếu liên kết phosphat là liên kết phosphodiester. Các CpG có thể bao gồm thể tương tự nucleotit như các thể tương tự chứa liên kết phosphorothio ester và có thể là sợi kép hoặc sợi đơn. Thông thường, các phân tử sợi kép ổn định hơn *in vivo*, trong khi các phân tử sợi đơn có hoạt tính miễn dịch gia tăng. Khi được sử dụng trong bản mô tả này, tốt hơn nếu CpG là oligonucleotit có chiều dài ít nhất khoảng mười nucleotit và chứa ít nhất một cấu trúc CpG, trong đó tốt hơn nữa nếu CpG có chiều dài từ 10 đến 60 nucleotit, tốt hơn nữa là từ 15 đến 50 nucleotit, tốt hơn nữa là từ 20 đến 40 nucleotit, tốt hơn nữa là khoảng 30 nucleotit và tốt nhất là có chiều dài chính xác gồm 30 nucleotit. CpG có thể bao gồm các nucleotit được metyl hoá và/hoặc không được metyl hoá, trong đó ít nhất một cấu trúc CpG chứa ít nhất một CG dinucleotit trong đó C không được metyl hoá. CpG cũng có thể chứa các đoạn trình tự được metyl hoá và không được metyl hoá, trong đó ít nhất một cấu trúc CpG chứa ít nhất một CG dinucleotit trong đó C không được metyl hoá. Rất tốt hơn, nếu CpG được sử dụng trong bản mô tả để chỉ oligodesoxynucleotit sợi đơn chứa xytosin không được metyl hoá sau đầu 3' của guanosin, trong đó xytosin không được metyl hoá và guanosin này được liên kết bởi liên kết phosphodiester. Các CpG có thể bao gồm các thể tương tự nucleotit như các thể tương tự chứa liên kết phosphorothioester và có thể là sợi đôi hoặc sợi đơn. Nói chung, các CpG phosphodiester là CpG typ A như được thể hiện dưới đây, trong khi các CpG được ổn định phosphothioester là CpG typ B. CpG oligonucleotit được ưu tiên theo sáng chế là CpG typ A.

Thuật ngữ “CpG typ A” hoặc “CpG typ D” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ oligodesoxynucleotit (ODN) chứa ít nhất một cấu trúc CpG. Tốt hơn nếu các CpG typ A kích thích sự hoạt hoá tế bào T và sự trưởng thành của tế bào có tua và có khả năng kích thích sự tạo ra IFN-alpha. Trong các CpG typ A, các nucleotit của ít nhất một cấu trúc CpG được liên kết bởi ít nhất một liên kết phosphodiester. Các CpG typ A chứa ít nhất một cấu trúc CpG liên kết phosphodiester có thể được chặn ở đầu 5' của nó và/hoặc, tốt hơn nếu ở đầu 3' của nó bởi các nucleotit gắn kết phosphorothioat. Tốt hơn, nếu cấu trúc CpG, và do đó tốt hơn nếu CG dinucleotit và các vùng chặn trung gian của nó chứa ít

nhất một, tốt hơn nếu hai nucleotit, bao gồm các phosphodiester nucleotit. Các CpG typ A được ưu tiên chỉ bao gồm các nucleotit gắn kết phosphodiester (PO). Thông thường và tốt hơn nếu cấu trúc poly G chứa hoặc theo cách khác bao gồm ít nhất một, tốt hơn nếu ít nhất bằng ba, ít nhất bằng 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, hoặc 15 G (guanosin), tốt nhất nếu ít nhất bằng 10 G. Tốt hơn, nếu CpG typ A theo sáng chế chứa hoặc theo cách khác bao gồm trình tự ngược xuôi giống nhau.

Thuật ngữ “hạt tương tự virus” được sử dụng trong bản mô tả được sử dụng trong bản mô tả để chỉ hạt virus không sao chép hoặc không gây nhiễm, tốt hơn nếu hạt virus không sao chép và không gây nhiễm hoặc được sử dụng trong bản mô tả để chỉ hạt virus không sao chép hoặc không gây nhiễm, tốt hơn nếu cấu trúc giống hạt virus không sao chép và không gây nhiễm, tốt hơn nếu capsit của virus. Thuật ngữ “không sao chép” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ việc không có khả năng sao chép hệ gen của VLP. Thuật ngữ “không gây nhiễm” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ việc không có khả năng đi vào tế bào chủ. Hạt tương tự virus theo sáng chế là hạt virus không sao chép và không gây nhiễm do nó thiếu toàn bộ hoặc một phần hệ gen của virus hoặc chức năng của hệ gen. Hạt tương tự virus theo sáng chế có thể chứa axit nucleic khác biệt với hệ gen của chúng. Các hạt tương tự virus được tạo ra bằng phương pháp tái tổ hợp thường chứa ARN có nguồn gốc từ tế bào chủ. Phương án điển hình và được ưu tiên về hạt tương tự virus theo sáng chế là capsit virus bao gồm các polypeptit theo sáng chế. Hạt tương tự virus là tập hợp đại phân tử bao gồm protein vỏ virus thường chứa 60, 120, 180, 240, 300, 360, hoặc nhiều hơn 360 cấu trúc dưới phân tử của protein/hạt tương tự virus. Thông thường và tốt hơn nếu các tương tác của các cấu trúc dưới phân tử này dẫn đến sự hình thành capsit virus hoặc cấu trúc tương tự capsit virus với tổ chức lặp lại vốn có. Một đặc điểm của hạt tương tự virus là sự bố trí của các cấu trúc dưới phân tử của nó lặp lại và theo thứ tự ở mức cao. Hạt tương tự virus chứa nhiều hơn một loại polypeptit, thường được gọi là các VLP thể khả cũng thuộc phạm vi của sáng chế. Do đó, theo một phương án, hạt tương tự virus theo sáng chế chứa ít nhất hai loại polypeptit khác nhau, trong đó ít nhất một trong số các loại polypeptit này là VLP-polypeptit chứa epitop tế bào T hỗ trợ pan.

Thuật ngữ “bao gói” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ trạng thái của các đại phân tử đa ion hoặc chất kích thích miễn dịch liên quan đến VLP. Thuật ngữ “bao gói” bao gồm sự liên kết có thể là liên kết cộng hoá trị, ví dụ, bằng cách ghép cặp hoá học

hoặc liên kết không cộng hoá trị, ví dụ, tương tác ion, tương tác kỵ nước, liên kết hydro, v.v.. Thuật ngữ này cũng bao gồm việc bao quanh hoặc bao quanh một phần, của đại phân tử đa anion. Do đó, đại phân tử đa anion hoặc chất kích thích miễn dịch có thể được bao quanh bởi VLP mà không cần phải có sự tồn tại của sự liên kết thực, cụ thể là liên kết cộng hoá trị. Theo các phương án ưu tiên, ít nhất một đại phân tử đa anion hoặc chất kích thích miễn dịch được bao gói bên trong VLP, tốt nhất là theo cách không cộng hoá trị. Trong trường hợp chất kích thích miễn dịch này là axit nucleic, tốt hơn nếu ADN, thuật ngữ bao gói ngụ ý rằng axit nucleic không bị ảnh hưởng bởi sự thủy phân bằng nucleaza, tốt hơn nếu không bị ảnh hưởng bởi sự thủy phân bằng DNAaza (ví dụ, DNazaI hoặc Benzonaza), trong đó tốt hơn nếu khả năng bị ảnh hưởng này được thử nghiệm như được mô tả trong các ví dụ từ 11 đến 17 của Công bố đơn quốc tế số WO2003/024481A2.

Sáng chế đề cập đến hạt tương tự virus của virus thực vật, virus thể khảm gây bệnh ở cây dưa chuột (CMV) và cụ thể là hạt tương tự virus được cải biến của virus thể khảm gây bệnh ở cây dưa chuột chứa các epitop tế bào T hỗ trợ, cụ thể là các epitop tế bào T hỗ trợ toàn phần.

Do đó, theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến hạt tương tự virus được cải biến (VLP) của virus thể khảm gây bệnh ở cây dưa chuột (CMV), trong đó VLP được cải biến của CMV chứa, chủ yếu bao gồm, hoặc theo cách khác bao gồm, ít nhất một polypeptit CMV được cải biến, trong đó polypeptit CMV được cải biến chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ: (a) polypeptit CMV, và (b) epitop tế bào T hỗ trợ; và trong đó polypeptit CMV này chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ: (i) trình tự axit amin của protein vỏ của CMV; hoặc (ii) trình tự axit amin đột biến, trong đó trình tự axit amin cần được đột biến là trình tự axit amin của protein vỏ của CMV, và trong đó trình tự axit amin đột biến và protein vỏ của CMV này có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 90%, tốt hơn nếu ít nhất bằng 95%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 98% và tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 99%.

Theo phương án ưu tiên, polypeptit CMV chứa, tốt hơn nếu bao gồm, trình tự axit amin của protein vỏ của CMV. Theo phương án khác, polypeptit CMV chứa, tốt hơn nếu bao gồm trình tự axit amin đột biến, trong đó trình tự axit amin cần được đột biến là trình tự axit amin của protein vỏ của CMV, và trong đó trình tự axit amin đột biến và protein vỏ của CMV này có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 90%, tốt hơn nếu ít nhất bằng 95%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 98% và tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 99%; trong đó tốt

hơn nếu trình tự axit amin đột biến và trình tự axit amin cần được đột biến này khác nhau ít nhất một và tối đa 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, hoặc 2 gốc axit amin, và trong đó tốt hơn nữa nếu sự khác nhau này được chọn từ (i) sự chèn đoạn, (ii) làm khuyết đoạn, (iii) trao đổi axit amin, và (iv) tổ hợp bất kỳ của các dấu hiệu từ (i) đến (iii). Các đột biến có thể được đưa vào trình tự axit amin cần được đột biến để cải biến các đặc điểm nhất định của hạt tương tự virus như độ ổn định và/hoặc hiệu quả liên kết. Việc đưa vào các gốc cystein vào có thể tăng cường độ ổn định của các cầu cystein được tạo ra giữa các cấu trúc dưới phân tử và việc đưa lysin vào bề mặt của các VLP có thể tăng cường hiệu quả liên kết.

Theo phương án ưu tiên khác, polypeptit CMV chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ: (i) (a) trình tự axit amin của protein vỏ của CMV, trong đó trình tự axit amin này chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ SEQ ID NO.1, hoặc (b) trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 75%, tốt hơn nếu ít nhất bằng 80%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 85%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 90%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 95%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 98% và tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 99% so với SEQ ID NO.1; hoặc (ii) trình tự axit amin đột biến, trong đó trình tự axit amin cần được đột biến là trình tự axit amin như được xác định trong mục (i) của điểm này và trong đó trình tự axit amin đột biến và trình tự axit amin cần được đột biến này có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 95%, tốt hơn nếu ít nhất bằng 98%, và tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 99%.

Theo phương án ưu tiên, polypeptit CMV chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ: (a) trình tự axit amin của protein vỏ của CMV, trong đó trình tự axit amin này chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ SEQ ID NO.1, hoặc (b) trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 75%, tốt hơn nếu ít nhất bằng 80%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 85%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 90%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 95%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 98% và tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 99% so với SEQ ID NO.1.

Theo phương án ưu tiên khác, polypeptit CMV chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ: (i) (a) trình tự axit amin của protein vỏ của CMV, trong đó trình tự axit amin này chứa SEQ ID NO.21, hoặc (b) trình tự axit amin của protein vỏ của CMV chứa vùng trình tự axit amin, trong đó vùng trình tự axit amin này có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 75%, tốt hơn nếu ít nhất bằng 80%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 85%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 90%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 95%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 98% và tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 99% so với SEQ ID NO.21; hoặc (ii) trình tự axit amin đột

biến, trong đó trình tự axit amin cần được đột biến là trình tự axit amin như được xác định trong mục (i) của điểm này và trong đó trình tự axit amin đột biến và trình tự axit amin cần được đột biến này có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 95%, tốt hơn nếu ít nhất bằng 98%, và tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 99%.

Theo phương án ưu tiên khác, polypeptit CMV chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ: (a) trình tự axit amin của protein vỏ của CMV, trong đó trình tự axit amin này chứa SEQ ID NO.21, hoặc (b) trình tự axit amin của protein vỏ của CMV chứa vùng trình tự axit amin, trong đó vùng trình tự axit amin này có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 75%, tốt hơn nếu ít nhất bằng 80%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 85%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 90%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 95%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 98% và tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 99% so với SEQ ID NO.21.

Theo phương án ưu tiên khác, polypeptit CMV chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ: (i) (a) trình tự axit amin của protein vỏ của CMV, trong đó trình tự axit amin này chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ SEQ ID NO.1, hoặc (b) trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 75%, tốt hơn nếu ít nhất bằng 80%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 85%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 90%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 95%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 98% và tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 99% với SEQ ID NO.1; và trong đó trình tự axit amin như được xác định trong mục (a) hoặc (b) của điểm này chứa SEQ ID NO.21; hoặc trong đó trình tự axit amin như được xác định trong mục (a) hoặc (b) trong điểm này chứa vùng trình tự axit amin, trong đó vùng trình tự axit amin này có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 75%, tốt hơn nếu ít nhất bằng 80%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 85%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 90%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 95%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 98% và tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 99% so với SEQ ID NO.21; hoặc (ii) trình tự axit amin đột biến, trong đó trình tự axit amin cần được đột biến là trình tự axit amin như được xác định trong mục (i) của điểm này và trong đó trình tự axit amin đột biến và trình tự axit amin cần được đột biến này có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 98%, tốt hơn nếu ít nhất bằng 99%.

Theo phương án ưu tiên khác nữa, polypeptit CMV chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ: (a) trình tự axit amin của protein vỏ của CMV, trong đó trình tự axit amin này chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ SEQ ID NO.1, hoặc (b) trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 90% so với SEQ ID NO.1; và trong đó trình tự axit amin như

được xác định trong (a) hoặc (b) trong điểm này bao gồm SEQ ID NO.21; hoặc trong đó trình tự axit amin như được xác định trong mục (a) hoặc (b) trong điểm này bao gồm vùng trình tự axit amin, trong đó vùng trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 90% so với SEQ ID NO.21.

Thông thường và tốt hơn nếu epitop tế bào T hỗ trợ (i) được dung hợp với đầu tận cùng N của polypeptit CMV, (ii) được dung hợp với đầu C của polypeptit CMV, (iii) thay thế vùng axit amin liên tiếp của polypeptit CMV, trong đó độ tương đồng trình tự giữa vùng được thay thế của các axit amin liên tiếp của polypeptit CMV và epitop tế bào T hỗ trợ ít nhất bằng 15%, tốt hơn nếu ít nhất bằng 20%, hoặc (iv) thay thế vùng tận cùng N của polypeptit CMV, và trong đó vùng tận cùng N được thay thế của polypeptit CMV bao gồm từ 5 đến 15 axit amin liên tiếp.

Theo phương án ưu tiên, epitop tế bào T hỗ trợ thay thế vùng tận cùng N của polypeptit CMV, trong đó tốt hơn nếu số lượng axit amin của vùng tận cùng N được thay thế bằng số lượng axit amin mà epitop tế bào T hỗ trợ chứa hoặc với lượng ít hơn. Theo cách khác, vùng tận cùng N của polypeptit CMV bao gồm số lượng axit amin thứ nhất và epitop tế bào T hỗ trợ bao gồm số lượng axit amin thứ hai, và theo phương án ưu tiên, số lượng axit amin thứ nhất bằng hoặc ít hơn số lượng axit amin thứ hai.

Theo phương án ưu tiên khác, vùng tận cùng N được thay thế của polypeptit CMV bao gồm từ 5 đến 15 axit amin liên tiếp, tốt hơn nếu từ 9 đến 14 axit amin liên tiếp, tốt hơn nữa là từ 11 đến 13 axit amin liên tiếp. Theo phương án ưu tiên, vùng tận cùng N của polypeptit CMV tương ứng với các axit amin từ 2 đến 12 của SEQ ID NO.1.

Do đó, theo phương án ưu tiên, polypeptit CMV chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ: (i) (a) trình tự axit amin của protein vỏ của CMV, trong đó trình tự axit amin này chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ SEQ ID NO.1, hoặc (b) trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 75%, tốt hơn nếu ít nhất bằng 80%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 85%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 90%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 95%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 98% và tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 99% so với SEQ ID NO.1; hoặc (ii) trình tự axit amin đột biến, trong đó trình tự axit amin cần được đột biến là trình tự axit amin như được xác định trong mục (i) của điểm này và trong đó trình tự axit amin đột biến và trình tự axit amin cần được đột biến này có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 95%, tốt hơn nếu ít nhất bằng 98%, và tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 99%, và trong

đó epitop tế bào T hỗ trợ thay thế vùng tận cùng N của polypeptit CMV, trong đó tốt hơn nếu số lượng axit amin của vùng tận cùng N được thay thế bằng hoặc ít hơn số lượng axit amin của vùng tận cùng N này được chứa bởi epitop tế bào T hỗ trợ.

Do đó, theo phương án ưu tiên, polypeptit CMV chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ: (i) (a) trình tự axit amin của protein vỏ của CMV, trong đó trình tự axit amin này chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ SEQ ID NO.1, hoặc (b) trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 75%, tốt hơn nếu ít nhất bằng 80%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 85%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 90%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 95%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 98% và tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 99% so với SEQ ID NO.1; hoặc (ii) trình tự axit amin đột biến, trong đó trình tự axit amin cần được đột biến là trình tự axit amin như được xác định trong mục (i) của điểm này và trong đó trình tự axit amin đột biến và trình tự axit amin cần được đột biến này có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 95%, tốt hơn nếu ít nhất bằng 98%, và tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 99%, trong đó epitop tế bào T hỗ trợ thay thế vùng tận cùng N của polypeptit CMV và trong đó vùng tận cùng N được thay thế của polypeptit CMV bao gồm từ 5 đến 15 axit amin liên tiếp, tốt hơn nếu từ 9 đến 14 axit amin liên tiếp, tốt hơn nữa là từ 11 đến 13 axit amin liên tiếp.

Do đó, theo phương án ưu tiên, polypeptit CMV chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ: (i) (a) trình tự axit amin của protein vỏ của CMV, trong đó trình tự axit amin này chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ SEQ ID NO.1, hoặc (b) trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 75%, tốt hơn nếu ít nhất bằng 80%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 85%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 90%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 95%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 98% và tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 99% với SEQ ID NO.1; hoặc (ii) trình tự axit amin đột biến, trong đó trình tự axit amin cần được đột biến là trình tự axit amin như được xác định trong mục (i) của điểm này và trong đó trình tự axit amin đột biến và trình tự axit amin cần được đột biến này có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 95%, tốt hơn nếu ít nhất bằng 98%, và tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 99%, trong đó epitop tế bào T hỗ trợ thay thế vùng tận cùng N của polypeptit CMV và trong đó vùng tận cùng N của polypeptit CMV tương ứng với các axit amin từ 2 đến 12 của SEQ ID NO.1.

Do đó, theo phương án ưu tiên, polypeptit CMV chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ: (a) trình tự axit amin của protein vỏ của CMV, trong đó trình tự axit amin này chứa

hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ SEQ ID NO.1, hoặc (b) trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 75%, tốt hơn nếu ít nhất bằng 80%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 85%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 90%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 95%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 98% và tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 99% so với SEQ ID NO.1, và trong đó epitop tế bào T hỗ trợ thay thế vùng tận cùng N của polypeptit CMV, trong đó tốt hơn nếu số lượng axit amin của vùng tận cùng N được thay thế bằng hoặc ít hơn số lượng axit amin của vùng tận cùng N này được chứa bởi epitop tế bào T hỗ trợ.

Do đó, theo phương án ưu tiên, polypeptit CMV chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ: (a) trình tự axit amin của protein vỏ của CMV, trong đó trình tự axit amin này chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ SEQ ID NO.1, hoặc (b) trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 75%, tốt hơn nếu ít nhất bằng 80%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 85%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 90%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 95%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 98% và tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 99% so với SEQ ID NO.1, trong đó epitop tế bào T hỗ trợ thay thế vùng tận cùng N của polypeptit CMV và trong đó vùng tận cùng N được thay thế của polypeptit CMV bao gồm từ 5 đến 15 axit amin liên tiếp, tốt hơn nếu từ 9 đến 14 axit amin liên tiếp, tốt hơn nữa là từ 11 đến 13 axit amin liên tiếp.

Do đó, theo phương án ưu tiên, polypeptit CMV chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ: (a) trình tự axit amin của protein vỏ của CMV, trong đó trình tự axit amin này chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ SEQ ID NO.1, hoặc (b) trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 75%, tốt hơn nếu ít nhất bằng 80%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 85%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 90%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 95%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 98% và tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 99% so với SEQ ID NO.1, trong đó epitop tế bào T hỗ trợ này thay thế vùng tận cùng N của polypeptit CMV và trong đó vùng tận cùng N của polypeptit CMV tương ứng với các axit amin từ 2 đến 12 của SEQ ID NO.1.

Do đó, theo phương án ưu tiên, polypeptit CMV chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ: (a) trình tự axit amin của protein vỏ của CMV, trong đó trình tự axit amin này chứa SEQ ID NO.21, hoặc (b) trình tự axit amin của protein vỏ của CMV chứa vùng trình tự axit amin, trong đó vùng trình tự axit amin này có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 75%, tốt hơn nếu ít nhất bằng 80%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 85%, tốt hơn nữa nếu ít

nhất bằng 90%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 95%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 98% và tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 99% so với SEQ ID NO.21, và trong đó epitop tế bào T hỗ trợ thay thế vùng tận cùng N của polypeptit CMV, trong đó tốt hơn nếu số lượng axit amin của vùng tận cùng N được thay thế bằng hoặc ít hơn số lượng axit amin của vùng tận cùng N này được chứa bởi epitop tế bào T hỗ trợ.

Do đó, theo phương án ưu tiên, polypeptit CMV chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ: (a) trình tự axit amin của protein vỏ của CMV, trong đó trình tự axit amin này chứa SEQ ID NO.21, hoặc (b) trình tự axit amin của protein vỏ của CMV chứa vùng trình tự axit amin, trong đó vùng trình tự axit amin này có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 75%, tốt hơn nếu ít nhất bằng 80%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 85%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 90%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 95%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 98% và tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 99% so với SEQ ID NO.21, trong đó epitop tế bào T hỗ trợ thay thế vùng tận cùng N của polypeptit CMV và trong đó vùng tận cùng N được thay thế của polypeptit CMV bao gồm từ 5 đến 15 axit amin liên tiếp, tốt hơn nếu từ 9 đến 14 axit amin liên tiếp, tốt hơn nữa là 11 đến 13 axit amin liên tiếp.

Do đó, theo phương án ưu tiên, polypeptit CMV chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ: (a) trình tự axit amin của protein vỏ của CMV, trong đó trình tự axit amin này chứa SEQ ID NO.21, hoặc (b) trình tự axit amin của protein vỏ của CMV chứa vùng trình tự axit amin, trong đó vùng trình tự axit amin này có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 75%, tốt hơn nếu ít nhất bằng 80%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 85%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 90%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 95%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 98% và tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 99% so với SEQ ID NO.21, trong đó epitop tế bào T hỗ trợ thay thế vùng tận cùng N của polypeptit CMV và trong đó vùng tận cùng N của polypeptit CMV tương ứng với các axit amin từ 2 đến 12 của SEQ ID NO.1.

Do đó, theo phương án ưu tiên, polypeptit CMV chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ: (a) trình tự axit amin của protein vỏ của CMV, trong đó trình tự axit amin này chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ SEQ ID NO.1, hoặc (b) trình tự axit amin này có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 90% so với SEQ ID NO.1; và trong đó trình tự axit amin như được xác định trong mục (a) hoặc (b) của điểm này chứa SEQ ID NO.21; hoặc trong đó trình tự axit amin như được xác định trong mục (a) hoặc (b) của điểm này chứa vùng trình tự axit amin, trong đó vùng trình tự axit amin này có độ tương đồng trình tự ít nhất

bằng 90% so với SEQ ID NO.21, và trong đó epitop tế bào T hỗ trợ thay thế vùng tận cùng N của polypeptit, trong đó tốt hơn nếu số lượng axit amin của vùng tận cùng N được thay thế bằng hoặc ít hơn số lượng axit amin của vùng tận cùng N này được chứa bởi epitop tế bào T hỗ trợ.

Do đó, theo phương án ưu tiên, polypeptit CMV chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ: (a) trình tự axit amin của protein vỏ của CMV, trong đó trình tự axit amin này chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ SEQ ID NO.1, hoặc (b) trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 90% so với SEQ ID NO.1; và trong đó trình tự axit amin như được xác định trong mục (a) hoặc (b) của điểm này chứa SEQ ID NO.21; hoặc trong đó trình tự axit amin như được xác định trong mục (a) hoặc (b) của điểm này chứa vùng trình tự axit amin, trong đó vùng trình tự axit amin này có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 90% so với SEQ ID NO.21, trong đó epitop tế bào T hỗ trợ thay thế vùng tận cùng N của polypeptit CMV và trong đó vùng tận cùng N được thay thế của polypeptit CMV bao gồm từ 5 đến 15 axit amin liên tiếp, tốt hơn nếu từ 9 đến 14 axit amin liên tiếp, tốt hơn nữa là từ 11 đến 13 axit amin liên tiếp.

Do đó, theo phương án ưu tiên, polypeptit CMV chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ: (a) trình tự axit amin của protein vỏ của CMV, trong đó trình tự axit amin này chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ SEQ ID NO.1. hoặc (b) trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 90% với SEQ ID NO.1; và trong đó trình tự axit amin như được xác định trong mục (a) hoặc (b) của điểm này chứa SEQ ID NO.21; hoặc trong đó trình tự axit amin như được xác định trong mục (a) hoặc (b) của điểm này chứa vùng trình tự axit amin, trong đó vùng trình tự axit amin này có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 90% so với SEQ ID NO.21, trong đó epitop tế bào T hỗ trợ thay thế vùng tận cùng N của polypeptit của và trong đó vùng tận cùng N của polypeptit CMV tương ứng với các axit amin từ 2 đến 12 của SEQ ID NO.1.

Tốt hơn nữa nếu epitop tế bào T hỗ trợ là epitop tế bào T hỗ trợ toàn phần, trong đó tốt hơn nếu epitop tế bào T hỗ trợ cấu thành tối đa từ 20 axit amin.

Theo phương án ưu tiên hơn, epitop tế bào T hỗ trợ nêu trên có trình tự PADRE. Theo phương án ưu tiên hơn nữa, epitop tế bào T hỗ trợ nêu trên chứa, tốt hơn nếu bao gồm, trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.5.

Theo phương án ưu tiên khác, epitop tế bào T hỗ trợ có nguồn gốc từ vacxin của

người. Tốt hơn, nếu epitop tế bào T hỗ trợ nêu trên có nguồn gốc từ độc tố uốn ván. Tốt hơn nữa nếu epitop tế bào T hỗ trợ nêu trên có, tốt hơn nếu bao gồm, trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.4.

Theo phương án ưu tiên, polypeptit CMV chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ trình tự axit amin của protein vỏ của CMV, trong đó trình tự axit amin này chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ SEQ ID NO.1 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 95% so với SEQ ID NO.1; và trong đó trình tự axit amin này chứa SEQ ID NO.21, và trong đó epitop tế bào T hỗ trợ thay thế vùng tận cùng N của polypeptit CMV, và trong đó vùng tận cùng N được thay thế của polypeptit CMV bao gồm từ 11 đến 13 axit amin liên tiếp, tốt hơn nếu 11 axit amin liên tiếp và trong đó tốt hơn nữa nếu vùng tận cùng N của polypeptit CMV tương ứng với các axit amin từ 2 đến 12 của SEQ ID NO.1.

Theo phương án ưu tiên khác, polypeptit CMV được cải biến chứa, tốt hơn nếu bao gồm, trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.6. Theo phương án ưu tiên nữa, polypeptit CMV được cải biến chứa, tốt hơn nếu bao gồm, trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.7.

Các VLP theo sáng chế có thể được biểu hiện trong hệ biểu hiện của sinh vật có nhân nguyên thủy hoặc sinh vật có nhân điển hình. Các hệ được ưu tiên là *E.coli*, nấm men, tế bào côn trùng, cũng như các dòng tế bào của động vật có vú. VLP được cải biến của CMV hoặc VLP của CMV rất được ưu tiên thu được nhờ sự biểu hiện của polypeptit CMV được cải biến hoặc polypeptit CMV trong *E.coli*., và trong đó tốt hơn nếu sự biểu hiện nêu trên được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 10°C đến 25°C, tốt hơn nếu ở nhiệt độ 20°C. Như được thể hiện trên đây, các polypeptit được tạo ra bằng phương pháp tái tổ hợp có thể chứa gốc methionin ở đầu tận cùng N. Do đó, theo một phương án, polypeptit CMV hoặc polypeptit CMV được cải biến nêu trên chứa gốc methionin ở đầu tận cùng N. Tuy nhiên, thông thường và tốt hơn nếu gốc methionin ở đầu tận cùng N được phân cắt từ polypeptit CMV hoặc polypeptit CMV được cải biến nêu trên.

Do đó, theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến hạt tương tự virus (VLP) của virus thể khả năng gây bệnh ở cây dưa chuột (CMV), trong đó VLP của CMV này chứa, chủ yếu bao gồm, hoặc theo cách khác bao gồm, ít nhất một polypeptit CMV chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ: (i) trình tự axit amin của protein vỏ của CMV; hoặc (ii) trình tự axit amin đột biến, trong đó trình tự axit amin cần được đột biến là trình tự axit amin của

protein vỏ của CMV, và trong đó trình tự axit amin đột biến và protein vỏ của CMV có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 90%, tốt hơn nếu ít nhất bằng 95%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 98% và tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 99%; và trong đó VLP của CMV thu được nhờ sự biểu hiện của polypeptit CMV ở *E.coli.*, và trong đó tốt hơn nếu sự biểu hiện được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 10°C đến 25°C, tốt hơn nếu ở nhiệt độ 20°C.

Sáng chế đề cập đến chế phẩm trong đó các VLP của sáng chế có dấu hiệu bất kỳ trong số các dấu hiệu kỹ thuật như được mô tả trong bản mô tả này, một mình hoặc ở dạng kết hợp bất kỳ.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa hạt tương tự virus được cải biến. Ngoài ra, tốt hơn nếu hạt tương tự virus được cải biến này được sử dụng làm nền vaccin để tạo ra đáp ứng miễn dịch, cụ thể là đáp ứng kháng thể, kháng kháng nguyên được liên kết với hạt tương tự virus được cải biến này. Sự có mặt của các epitop tế bào T hỗ trợ, cụ thể là các epitop tế bào T hỗ trợ toàn phần, tăng cường đáp ứng miễn dịch được tạo ra.

Do đó, theo phương án ưu tiên khác, chế phẩm nêu trên chứa (a) ít nhất một hạt tương tự virus được cải biến theo sáng chế, trong đó hạt tương tự virus được cải biến này chứa ít nhất một vị trí liên kết thứ nhất; và (b) ít nhất một kháng nguyên, trong đó kháng nguyên này chứa ít nhất một vị trí liên kết thứ hai; trong đó các thành phần (a) và (b) được liên kết thông qua ít nhất một vị trí liên kết thứ nhất và ít nhất một vị trí liên kết thứ hai. Các phương pháp liên kết hạt tương tự virus được cải biến và kháng nguyên này qua vị trí liên kết thứ nhất và thứ hai nêu trên được mô tả, ví dụ, trong WO2002/056905A2 và WO2004/084940A1.

Theo phương án ưu tiên khác, vị trí liên kết thứ nhất nêu trên được liên kết với vị trí liên kết thứ hai nêu trên qua ít nhất một liên kết cộng hoá trị. Theo phương án ưu tiên khác, vị trí liên kết thứ nhất và vị trí liên kết thứ hai nêu trên được liên kết thông qua ít nhất một liên kết peptit cộng hoá trị. Theo phương án ưu tiên khác, liên kết cộng hoá trị nêu trên là liên kết không peptit. Do đó, theo phương án ưu tiên khác, vị trí liên kết thứ nhất và vị trí liên kết thứ hai nêu trên được liên kết thông qua ít nhất một liên kết không peptit cộng hoá trị. Theo phương án ưu tiên khác, vị trí liên kết thứ nhất nêu trên là nhóm amin, tốt hơn nếu nhóm amin của lysin.

Sự liên kết giữa hạt tương tự virus được cải biến và kháng nguyên nhờ các liên kết

disulfua là không bền, cụ thể là với phân tử chứa gốc sulfhydryl và ngoài ra, kém ổn định trong huyết thanh, ví dụ, so với các vị trí liên kết thioete (Martin FJ. and Papahadjopoulos D. (1982) J. Biol. Chem. 257: 286-288). Do đó, theo phương án ưu tiên hơn của sáng chế, sự kết hợp hoặc liên kết của VLP được cải biến và ít nhất một kháng nguyên không chứa liên kết disulfua. Tốt hơn, nếu ít nhất một vị trí liên kết thứ hai chứa hoặc tốt hơn nếu nhóm sulfhydryl. Ngoài ra, tốt hơn nếu sự kết hợp hoặc liên kết của VLP được cải biến và ít nhất một kháng nguyên không chứa liên kết lưu huỳnh-lưu huỳnh. Tốt hơn nữa nếu ít nhất một vị trí liên kết thứ hai chứa hoặc tốt hơn nếu nhóm sulfhydryl. Theo phương án ưu tiên hơn, ít nhất một vị trí liên kết thứ nhất không là hoặc không chứa nhóm sulfhydryl. Theo phương án ưu tiên hơn nữa, ít nhất một vị trí liên kết thứ nhất không là hoặc không chứa nhóm sulfhydryl của xystein. Theo phương án ưu tiên khác, vị trí liên kết thứ hai nêu trên là nhóm sulfhydryl, tốt hơn nếu nhóm sulfhydryl của xystein.

Theo phương án ưu tiên, ít nhất một vị trí liên kết thứ nhất là nhóm amin, tốt hơn nếu nhóm amin của gốc lysin và ít nhất một vị trí liên kết thứ hai là nhóm sulfhydryl, tốt hơn nếu nhóm sulfhydryl của gốc xystein hoặc nhóm sulfhydryl đã được liên kết về mặt hoá học với kháng nguyên. Theo phương án ưu tiên khác, chỉ một trong số các vị trí liên kết thứ hai kết hợp với vị trí liên kết thứ nhất nêu trên qua ít nhất một liên kết cộng hoá trị không peptit dẫn đến dạng liên kết đơn hoặc đồng nhất của kháng nguyên với hạt tương tự virus được cải biến này, trong đó chỉ một vị trí liên kết thứ hai kết hợp với vị trí liên kết thứ nhất nêu trên là nhóm sulfhydryl và trong đó kháng nguyên và hạt tương tự virus được cải biến này tương tác nhờ sự kết hợp này để tạo ra dây kháng nguyên theo thứ tự và lặp lại.

Theo một phương án ưu tiên, kháng nguyên được liên kết với VLP được cải biến bằng cách tạo liên kết chéo hoá học, thông thường và tốt hơn nếu bằng cách sử dụng gốc liên kết chéo có hai chức khác nhau. Theo các phương án ưu tiên, gốc liên kết chéo có hai chức khác nhau chứa nhóm chức có thể phản ứng với các vị trí liên kết thứ nhất được ưu tiên, tốt hơn nếu với nhóm amin, tốt hơn nữa là với các nhóm amin của (các) gốc lysin của VLP được cải biến và nhóm chức còn lại có thể phản ứng với vị trí liên kết thứ hai được ưu tiên, nghĩa là nhóm sulfhydryl, tốt hơn nếu (các) gốc xystein vốn có của hoặc được bổ sung bằng phương pháp nhân tạo vào kháng nguyên và tùy ý cũng có thể được

mua dễ dàng dùng cho phản ứng bằng cách khử. Vài gốc liên kết chéo có hai chức khác nhau là đã biết trong lĩnh vực này. Các gốc liên kết chéo này bao gồm các gốc liên kết chéo được ưu tiên SMPH (Pierce), Sulfo-MBS, Sulfo-EMCS, Sulfo-GMBS, Sulfo-SIAB, Sulfo-SMPB, Sulfo-SMCC, Sulfo-KMUS SVSB, SIA, và các gốc liên kết chéo khác, ví dụ, từ công ty Pierce Chemical Company và có một nhóm chức có khả năng phản ứng đối với nhóm amin và một nhóm chức có khả năng phản ứng đối với các nhóm sulfhydryl. Các gốc liên kết chéo nêu trên dẫn đến sự hình thành liên kết amit sau khi phản ứng với nhóm amin và liên kết thioete với nhóm sulfhydryl. Nhóm bao gồm các gốc liên kết chéo khác thích hợp để thực hiện sáng chế khác biệt bởi việc đưa liên kết disulfua vào giữa kháng nguyên và VLP được cải biến khi ghép cặp. Các gốc liên kết chéo được ưu tiên thuộc nhóm này bao gồm, ví dụ, SPDP và Sulfo-LC-SPDP (Pierce).

Sự tạo liên kết của kháng nguyên với VLP được cải biến bằng cách sử dụng gốc liên kết chéo có hai chức khác nhau theo các phương pháp được ưu tiên đã được mô tả trên đây cho phép liên kết kháng nguyên với VLP được cải biến theo cách định hướng. Các phương pháp khác để liên kết kháng nguyên với VLP được cải biến bao gồm phương pháp trong đó kháng nguyên được tạo liên kết chéo với VLP được cải biến bằng cách sử dụng carbodiimite EDC, và NHS. Kháng nguyên cũng có thể được thiol hoá lần thứ nhất bằng phản ứng, ví dụ, với SATA, SATP hoặc iminothiolan. Kháng nguyên, sau khi khử bảo vệ nếu cần, sau đó có thể được liên kết với VLP được cải biến như sau. Sau khi tách chất phản ứng thiol hoá dư, kháng nguyên được cho phản ứng với VLP được cải biến, được hoạt hoá trước bằng gốc liên kết chéo có hai chức khác nhau bao gồm chứa gốc có khả năng phản ứng xystein và do đó thể hiện ít nhất một hoặc một vài nhóm chức phản ứng đối với các gốc xystein mà kháng nguyên được thiol hoá có thể phản ứng với, như được mô tả trên đây. Tuy ý, lượng nhỏ chất khử được đưa vào hỗn hợp phản ứng. Theo các phương pháp khác, kháng nguyên được liên kết với VLP được cải biến, bằng cách sử dụng gốc liên kết chéo có hai chức cùng loại như glutaraldehyt, DSG, BM[PEO]4, BS3, (Pierce) hoặc các gốc liên kết chéo có hai chức cùng loại đã biết khác với các nhóm chức có khả năng phản ứng đối với các nhóm amin hoặc các nhóm carboxyl của VLP được cải biến.

Theo phương án ưu tiên, kháng nguyên được liên kết thông qua gốc xystein, đã được bổ sung vào đầu tận cùng N hoặc đầu C hoặc gốc xystein tự nhiên trong kháng

nguyên, với gốc lysin của hạt tương tự virus được cải biến. Theo phương án ưu tiên, chế phẩm theo sáng chế còn chứa gốc liên kết, trong đó gốc liên kết này kết hợp kháng nguyên với vị trí liên kết thứ hai nêu trên, và trong đó tốt hơn nếu gốc liên kết này chứa hoặc theo cách khác bao gồm vị trí liên kết thứ hai nêu trên.

Việc thiết kế vị trí liên kết thứ hai trên kháng nguyên đạt được nhờ sự kết hợp của gốc liên kết, tốt hơn nếu chứa ít nhất một axit amin thích hợp làm vị trí liên kết thứ hai theo sáng chế. Do đó, theo phương án ưu tiên của sáng chế, gốc liên kết được kết hợp với kháng nguyên bằng ít nhất một liên kết cộng hoá trị, tốt hơn nếu bằng ít nhất một, tốt hơn nếu một liên kết peptit. Tốt hơn, nếu gốc liên kết chứa hoặc theo cách khác bao gồm, vị trí liên kết thứ hai. Theo phương án ưu tiên khác, gốc liên kết bao gồm nhóm sulfhydryl, tốt hơn nếu gốc xystein. Theo phương án ưu tiên khác, gốc liên kết axit amin là gốc xystein.

Việc lựa chọn gốc liên kết sẽ phụ thuộc vào tính chất của kháng nguyên, các tính chất sinh hoá của nó, như pi, sự phân bố điện tích và mức độ glycosyl hoá. Nói chung, gốc liên kết axit amin linh hoạt là được ưu tiên. Theo phương án ưu tiên khác, gốc liên kết bao gồm các axit amin, trong đó tốt hơn nữa nếu gốc liên kết bao gồm ít nhất một và tối đa 25, tốt hơn nếu tối đa 20, tốt hơn nữa nếu tối đa 15 axit amin. Theo phương án ưu tiên hơn nữa của sáng chế, gốc liên kết axit amin chứa từ 1 đến 10 axit amin. Theo phương án ưu tiên khác, gốc liên kết chứa hoặc theo cách khác bao gồm vị trí liên kết thứ hai nêu trên.

Theo phương án ưu tiên khác, gốc liên kết này là gốc liên kết axit amin và trong đó tốt hơn nếu gốc liên kết axit amin này được chọn từ nhóm bao gồm: (a) CGG; (b) gốc liên kết gama 1 ở đầu tận cùng N; (c) gốc liên kết gama 3 ở đầu tận cùng N; (d) các vùng bản lề Ig; (e) các gốc liên kết glyxin ở đầu tận cùng N; (f) $(G)_kC(G)_n$ với $n=0-12$ và $k=0-5$; (g) gốc liên kết glyxin-serin ở đầu tận cùng N; (h) $(G)_kC(G)_m(S)l(GGGGS)_n$ với $n=0-3$, $k=0-5$, $m=0-10$, $l=0-2$; (i) GGC; (j) GGC-NH₂; (k) gốc liên kết gama 1 ở đầu C; (l) gốc liên kết gama 3 ở đầu C; (m) gốc liên kết glyxin ở đầu C; (n) $(G)_nC(G)_k$ với $n=0-12$ và $k=0-5$; (o) gốc liên kết glyxin-serin ở đầu C; và (p) $(G)_m(S)l(GGGGS)_n(G)_oC(G)_k$ với $n=0-3$, $k=0-5$, $m=0-10$, $l=0-2$, và $o=0-8$. Nói chung, các gốc glyxin sẽ được chèn vào giữa axit amin khối lớn và xystein cần được sử dụng làm vị trí liên kết thứ hai, để tránh sự cản trở trong không gian tiềm ẩn của axit amin khối lớn trong phản ứng liên kết.

Theo phương án ưu tiên khác, gốc liên kết được bổ sung vào đầu tận cùng N của kháng nguyên. Theo phương án ưu tiên khác, gốc liên kết được bổ sung vào đầu C của kháng nguyên.

Theo các phương án khác, chế phẩm chứa hoặc theo cách khác chủ yếu bao gồm hạt tương tự virus được liên kết với kháng nguyên qua các tương tác hoá học, trong đó ít nhất một trong số các tương tác này không phải liên kết cộng hoá trị. Sự liên kết của VLP được cải biến với kháng nguyên có thể được thực hiện bằng cách biotinyl hoá VLP được cải biến và biểu hiện kháng nguyên dưới dạng protein dung hợp streptavidin. Theo các phương án khác, các nhóm sulhydryl được sử dụng để liên kết hoá học với lysin được gắn kết với hạt tương tự virus được cải biến hoặc kháng nguyên bằng các phương tiện cải biến hoá học.

Theo phương án ưu tiên khác, chế phẩm này còn chứa ít nhất một chất kích thích miễn dịch. Theo phương án ưu tiên, chất kích thích miễn dịch này được bao gói vào hạt tương tự virus được cải biến của sáng chế. Theo phương án ưu tiên khác, chất kích thích miễn dịch được trộn với hạt tương tự virus được cải biến của sáng chế. Chất kích thích miễn dịch hữu ích theo sáng chế thường là đã biết trong lĩnh vực này và được bộc lộ, không kể các tài liệu khác, trong công bố đơn quốc tế số WO2003/024481A2.

Theo phương án khác, chất kích thích miễn dịch bao gồm ADN hoặc ARN có nguồn gốc không phải sinh vật có nhân điển hình. Theo phương án ưu tiên khác, chất kích thích miễn dịch được chọn từ nhóm bao gồm: (a) axit nucleic kích thích miễn dịch; (b) peptidoglycan; (c) lipopolysacarit; (d) axit lipoteichonic; (e) hợp chất imidazoquinolin; (f) flagelin; (g) lipoprotein; và (h) hỗn hợp bất kỳ của ít nhất một chất trong số các chất từ (a) đến (g). Theo phương án ưu tiên khác, chất kích thích miễn dịch là axit nucleic kích thích miễn dịch, trong đó axit nucleic kích thích miễn dịch này được chọn từ nhóm bao gồm: (a) các axit ribonucleic; (b) axit deoxyribonucleic; (c) axit nucleic thể khảm; và (d) hỗn hợp bất kỳ của các thành phần (a), (b) và/hoặc (c). Theo phương án ưu tiên khác, axit nucleic kích thích miễn dịch là axit ribonucleic và trong đó axit ribonucleic này là ARN có nguồn gốc từ vi khuẩn. Theo phương án ưu tiên khác, nucleic kích thích miễn dịch là poly-(LC) hoặc dẫn xuất của nó. Theo phương án ưu tiên khác, axit nucleic kích thích miễn dịch là axit deoxyribonucleic, trong đó axit deoxyribonucleic này là oligonucleotit chứa CpG không được metyl hoá.

Theo phương án ưu tiên, chất kích thích miễn dịch là oligonucleotit chứa CpG không được methyl hoá. Theo phương án ưu tiên khác, oligonucleotit chứa CpG không được methyl hoá là CpG typ A. Theo phương án ưu tiên khác, CpG typ A chứa trình tự GACGATCGTC (SEQ ID NO.31). Theo phương án ưu tiên khác, trình tự ngược xuôi giống nhau được chặn ở đầu 5' của nó và ở đầu 3' của nó bằng gốc guanosin. Theo phương án ưu tiên khác, trình tự ngược xuôi giống nhau được chặn ở đầu 5' của nó bằng ít nhất 3 và tối đa 15 gốc guanosin và trong đó trình tự ngược xuôi giống nhau được chặn ở đầu 3' bằng ít nhất 3 và tối đa 15 gốc guanosin.

Theo phương án ưu tiên khác, chất kích thích miễn dịch là oligonucleotit chứa CpG không được methyl hoá, và trong đó tốt hơn nếu oligonucleotit chứa CpG không được methyl hoá có trình tự ngược xuôi giống nhau, và trong đó tốt hơn nữa nếu cấu trúc CpG của oligonucleotit chứa CpG không được methyl hoá là một phần của trình tự ngược xuôi giống nhau, và trong đó còn tốt hơn nữa nếu trình tự ngược xuôi giống nhau là GACGATCGTC (SEQ ID NO.31).

Theo phương án ưu tiên khác, axit nucleic kích thích miễn dịch là oligonucleotit chứa CpG không được methyl hoá bao gồm trình tự GGGGGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO.36), trong đó oligonucleotit chứa CpG không được methyl hoá chỉ bao gồm nucleotit được gắn kết phosphodiester.

Các kháng nguyên hữu ích đối với mục đích của sáng chế được bộc lộ trong WO2002/056905A2, WO2004/007538A2, WO2006/037787A2, WO2004/084940A1, và WO2006/032674A1. Theo một phương án, kháng nguyên có nguồn gốc từ nguồn được chọn từ nhóm bao gồm: (a) virus; (b) vi khuẩn; (c) vật ký sinh; (d) khối u; (e) phân tử bản thân; (f) các phân tử hapten không peptit (g) các dị nguyên; (h) các hormon; (i) xytokin; (k) chemokine; (l) các peptit có hoạt tính sinh học. Theo phương án ưu tiên khác, kháng nguyên này là kháng nguyên khối u, kháng nguyên tự thân, polypeptit của tác nhân gây bệnh, dị nguyên hoặc hapten. Theo phương án ưu tiên hơn, kháng nguyên này là peptit liên quan đến gen calcitonin (calcitonin gene-related peptide-CGRP).

Theo phương án ưu tiên khác, kháng nguyên là kháng nguyên khối u, trong đó tốt hơn nếu kháng nguyên khối u này được chọn từ nhóm bao gồm: (a) polypeptit của tế bào ung thư vú; (b) polypeptit của tế bào ung thư thận; (c) polypeptit của tế bào ung thư

tuyến tiền liệt; (d) polypeptit của tế bào ung thư da; (e) polypeptit của tế bào ung thư não; và (f) polypeptit của tế bào bệnh bạch cầu.

Theo phương án ưu tiên khác, kháng nguyên là kháng nguyên khối u được chọn từ nhóm bao gồm: (a) Her2; (b) gangliosit GD2; (c) EGF-R; (d) kháng nguyên ung thư phổi (CEA); (e) CD52; (f) CD21; (g) gp100 u melanin ở người; (h) u melanin ở người melanA/MART-1; (i) thể tương tự u melanin ở người melanA/MART-1; (j) tyrosinaza; (k) NA17-A nt; (l) MAGE3; (m) protein p53; và (n) các mảnh kháng nguyên bất kỳ trong số các kháng nguyên khối u từ (a) đến (m).

Theo phương án ưu tiên khác, kháng nguyên là polypeptit được chọn từ nhóm bao gồm: (a) IgE, (b) IL-6, (c) chất hoạt hoá thụ thể của phối tử kB của yếu tố nhân (receptor activator of nuclear factor kB ligand: RANKL); (d) yếu tố sinh trưởng nội mô mạch (vascular endothelial growth factor: VEGF); (e) thụ thể yếu tố sinh trưởng nội mô mạch (vascular endothelial growth factor receptor: VEGF-R); yếu tố sinh trưởng tế bào gan (hepatocyte growth factor: HGF) (f) intolokin-1 α ; (g) intolokin-1 β ; (h) intolokin-5; (i) intolokin-8; (j) intolokin-13; (k) intolokin-15; (l) intolokin-17 (IL- 17); (m) IL-23; (n) Ghrelin; (o) angiotensin; (p) chemokin (cấu trúc C-C) (CCL21); (q) chemokin (cấu trúc C-X) (CXCL 12); (r) yếu tố có nguồn gốc từ tế bào cơ chất 1 (stromal cell derived factor 1: SDF-1); (s) yếu tố kích thích khuẩn lạc đại thực bào (macrophage colony stimulating factor: M-CSF); (t) protein 1 hoá ứng động bạch cầu đơn nhân to (monocyte chemotactic protein 1: MCP-1); (u) endoglin; (v) resistin; (w) hormon giải phóng gonadotropin (gonadotropin releasing hormone: GnRH); (x) hormon giải phóng hormon sinh trưởng (growth hormone releasing hormone: GHRH); (y) hormon giải phóng hormon luten hoá (lutenizing hormone releasing hormone: LHRH); (z) hormon giải phóng thyreotropin (thyreotropin releasing hormone: TRH); (aa) yếu tố ức chế sự di trú đại thực bào (macrophage migration inhibitory factor: MIF); (bb) peptit giảm tiết insulin phụ thuộc glucoza (glucose-dependent insulinotropic peptide: GIP); (cc) eotaxin; (dd) bradykinin; (ee) Des-Arg bradykinin; (ff) chất hoá ứng động tế bào lympho B (B-lymphocyte chemoattractant: BLC); (gg) yếu tố kích thích khuẩn lạc đại thực bào (macrophage colony stimulating factor: M-CSF); (hh) yếu tố gây hoại tử khối u α (tumor necrosis factor α : TNF α); (ii) peptit beta dạng tinh bột (amyloid beta peptide: A β 1-42); (jj) peptit beta dạng tinh bột (amyloid beta peptide: A β 1-6); (kk) IgE của người; (ll) vùng ngoại bào

CCR5; (mm) vùng ngoại bào CXCR4; (nn) Gastrin; (oo) CETP; (pp) C5a; (qq) thụ thể yếu tố sinh trưởng biểu bì (epidermal growth factor receptor: EGF-R); (rr) CGRP; (ss) α -synuclein; (tt) peptit liên quan đến gen calcitonin (gene-related peptide calcitonin gene-related peptide: CGRP); (uu) Amylin; hoặc (vv) mảnh của polypeptit bất kỳ trong số các polypeptit từ (a) đến (uu); và (xx) đột biến kháng nguyên hoặc mảnh của bất kỳ polypeptit trong số các polypeptit (a) đến (uu).

Theo phương án ưu tiên khác, kháng nguyên là kháng nguyên tự thân, trong đó kháng nguyên tự thân này là polypeptit được chọn từ nhóm bao gồm: (a) IgE; (b) IL-6; (c) chất hoạt hoá thụ thể của phối tử kB của yếu tố nhân (RANKL); (d) yếu tố sinh trưởng nội mô mạch (VEGF); (e) thụ thể yếu tố sinh trưởng nội mô mạch (VEGF-R); yếu tố sinh trưởng tế bào gan (HGF); (f) intolokin-1 α ; (g) intolokin-1 β ; (h) intolokin-5; (i) intolokin-8; (j) intolokin-13; (k) intolokin-15; (l) intolokin-17 (IL-17); (m) IL-23; (n) Ghrelin; (o) angiotensin; (p) chemokin (cấu trúc C-C) (CCL21); (q) chemokin (cấu trúc C-X) (CXCL 12); (r) yếu tố 1 có nguồn gốc từ tế bào cơ chất (SDF-1); (s) yếu tố kích thích khuẩn lạc đại thực bào (M-CSF); (t) protein hoá ứng động bạch cầu đơn nhân to 1 (MCP-1); (u) endoglin; (v) resistin; (w) hormon giải phóng gonadotropin (GnRH); (x) hormon giải phóng hormon sinh trưởng (GHRH); (y) hormon giải phóng hormon luten hoá (LHRH); (z) hormon giải phóng thyreotropin (TRH); (aa) yếu tố ức chế sự di trú đại thực bào (MIF); (bb) peptit giảm tiết insulin phụ thuộc glucoza (GIP); (cc) eotaxin; (dd) bradykinin; (ee) Des-Arg bradykinin; (ff) chất hoá ứng động tế bào lympho B (BLC); (gg) yếu tố kích thích khuẩn lạc đại thực bào (M-CSF); (hh) yếu tố gây hoại tử khối u α (TNF α); (ii) peptit beta dạng tinh bột (A β 1-42); (jj) peptit beta dạng tinh bột (A β 1-6); (kk) IgE của người; (ii) vùng ngoại bào CCR5; (mm) vùng ngoại bào CXCR4; (nn) Gastrin; (oo) CETP; (pp) C5a; (qq) thụ thể yếu tố sinh trưởng biểu bì (EGF-R); (rr) CGRP; (ss) α -synuclein; (tt) peptit liên quan đến gen calcitonin (CGRP); (uu) Amylin hoặc (vv) đoạn bất kỳ trong số các polypeptit (a) đến (uu); và (xx) đột biến kháng nguyên hoặc đoạn bất kỳ trong số các polypeptit (a) đến (uu).

Theo phương án ưu tiên, kháng nguyên là intolokin 17 (IL-17). Intolokin 17 là xytokin có nguồn gốc từ tế bào T gây ra sự giải phóng chất trung gian tiền viêm trong khoảng rộng các loại tế bào. Th17 khác thường đáp ứng và biểu hiện quá mức IL-17 có liên quan đến nhiều rối loạn tự miễn bao gồm bệnh viêm khớp dạng thấp và bệnh xơ

cứng rải rác. Các phân tử phong bế IL-17 như các kháng thể đơn dòng đặc hiệu IL-17 đã được chứng minh là có hiệu quả trong việc làm thuyên giảm bệnh ở các mô hình động vật. Ngoài ra, việc gây miễn dịch chủ động hướng đích IL-17 đã được đề cập đến gần đây bằng cách sử dụng hạt tương tự virus tiếp hợp với IL-17 tái tổ hợp (Röhn TA, et al., Eur J Immunol (2006) 36: 1-11). Việc gây miễn dịch bằng IL-17-VLP gây ra nồng độ kháng thể kháng IL-17 ở mức cao, nhờ đó khắc phục sự dung nạp tự nhiên, ngay cả khi không có mặt tá được bổ sung. Chuột được gây miễn dịch bằng IL-17-VLP có tỷ lệ mắc bệnh thấp, sự tiến triển của bệnh chậm hơn và điểm số mức độ nặng của bệnh giảm trong cả bệnh viêm khớp do collagen gây ra và bệnh viêm não tuỷ tự miễn dịch thử nghiệm.

Do đó, theo phương án ưu tiên hơn, kháng nguyên chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ SEQ ID NO.42. Ngoài ra, chế phẩm theo sáng chế chứa hạt tương tự virus được cải biến để sử dụng trong phương pháp điều trị bệnh viêm, tốt hơn nếu bệnh viêm mạn tính ở người hoặc động vật. Tốt hơn, nếu bệnh viêm này được chọn từ bệnh viêm đa khớp dạng thấp (RA), bệnh xơ cứng rải rác (MS), bệnh vẩy nến, bệnh hen, bệnh Crohns, bệnh viêm ruột kết, bệnh phổi tắc nghẽn mãn tính (COPD), bệnh đái tháo đường, bệnh viêm da thần kinh (bệnh viêm da dị ứng), tốt hơn nếu trong đó bệnh viêm là bệnh xơ cứng rải rác. Tốt hơn nữa nếu kháng nguyên của chế phẩm theo sáng chế chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ SEQ ID NO.42.

Theo phương án ưu tiên khác, kháng nguyên là IL-5. Theo phương án ưu tiên hơn nữa, kháng nguyên này chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ SEQ ID NO.41. Ngoài ra, các chế phẩm theo sáng chế chứa hạt tương tự virus được cải biến để sử dụng trong phương pháp điều trị bệnh viêm, tốt hơn nếu bệnh viêm mạn tính ở động vật hoặc người. Tốt hơn, nếu bệnh viêm này được chọn từ bệnh viêm đa khớp dạng thấp, bệnh xơ cứng rải rác, bệnh vẩy nến, bệnh hen, bệnh Crohns, bệnh viêm ruột kết, bệnh phổi tắc nghẽn mãn tính, bệnh đái tháo đường, bệnh viêm da thần kinh (bệnh viêm da dị ứng). Tốt hơn nữa nếu kháng nguyên của chế phẩm theo sáng chế chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ SEQ ID NO.41.

Theo phương án ưu tiên khác, kháng nguyên là IL-5 của chó. Theo phương án ưu tiên hơn nữa, kháng nguyên này chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ SEQ ID NO.61 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 90%, tốt hơn nếu ít nhất bằng 95% so với SEQ ID NO.61. Tốt hơn, nếu kháng nguyên này chứa hoặc tốt hơn nếu cấu

thành từ SEQ ID NO.61. Theo phương án ưu tiên khác, kháng nguyên của chế phẩm theo sáng chế chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ SEQ ID NO.61. Tốt hơn nữa nếu chế phẩm theo sáng chế chứa (i) hạt tương tự virus được cải biến (VLP) của virus thể khả năng gây bệnh ở cây dưa chuột (CMV) có ít nhất một vị trí liên kết thứ nhất, trong đó hạt tương tự virus được cải biến này chứa, chủ yếu bao gồm, hoặc theo cách khác bao gồm, ít nhất một polypeptit CMV được cải biến, trong đó polypeptit CMV được cải biến này chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ, (a) polypeptit CMV, và (b) epitop tế bào T hỗ trợ; và trong đó polypeptit CMV được cải biến này chứa, tốt hơn nếu bao gồm, trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.6 hoặc SEQ ID NO.7; (ii) ít nhất một kháng nguyên có ít nhất một vị trí liên kết thứ hai, và trong đó kháng nguyên này là IL-5 của chó; và trong đó VLP của CMV và IL-5 của chó được liên kết thông qua ít nhất một vị trí liên kết thứ nhất và ít nhất một vị trí liên kết thứ hai, và trong đó IL-5 của chó chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ SEQ ID NO.61 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 90%, tốt hơn nếu ít nhất bằng 95% so với SEQ ID NO.61 và tốt hơn nữa nếu trong đó IL-5 của chó chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ SEQ ID NO.61.

Theo phương án ưu tiên khác, kháng nguyên là IL-4. Theo phương án ưu tiên hơn nữa, kháng nguyên chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ SEQ ID NO.45.

Theo phương án ưu tiên khác, kháng nguyên là IL-4 của chó. Theo phương án ưu tiên hơn nữa, kháng nguyên này chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ SEQ ID NO.62 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 90%, tốt hơn nếu ít nhất bằng 95% so với SEQ ID NO.62. Tốt hơn, nếu kháng nguyên này chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ SEQ ID NO.62. Theo phương án ưu tiên khác, kháng nguyên của chế phẩm theo sáng chế chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ SEQ ID NO.62. Tốt hơn nữa là, chế phẩm của sáng chế chứa (i) hạt tương tự virus được cải biến (VLP) của virus thể khả năng gây bệnh ở cây dưa chuột (CMV) có ít nhất một vị trí liên kết thứ nhất, trong đó hạt tương tự virus được cải biến này chứa, chủ yếu bao gồm, hoặc theo cách khác bao gồm, ít nhất một polypeptit CMV được cải biến, trong đó polypeptit CMV được cải biến này chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ (a) polypeptit CMV, và (b) epitop tế bào T hỗ trợ; và trong đó polypeptit CMV được cải biến này chứa, tốt hơn nếu bao gồm, trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.6 hoặc SEQ ID NO.7; (ii) ít nhất một kháng nguyên có ít nhất một vị trí liên kết thứ hai và trong đó kháng nguyên là IL-4 của chó; và trong đó VLP của

CMV và IL-4 của chó được liên kết thông qua ít nhất một vị trí liên kết thứ nhất và ít nhất một vị trí liên kết thứ hai, và trong đó IL-4 của chó chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ SEQ ID NO.62 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 90%, tốt hơn nếu ít nhất bằng 95% so với SEQ ID NO.62, và tốt hơn nữa nếu trong đó IL-4 của chó chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ SEQ ID NO.62.

Theo phương án ưu tiên khác, kháng nguyên là IL-13. Theo phương án ưu tiên hơn nữa, kháng nguyên này chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ SEQ ID NO.46.

Theo phương án ưu tiên khác, kháng nguyên là IL-13 của chó. Theo phương án ưu tiên hơn nữa, kháng nguyên này chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ SEQ ID NO.63 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 90%, tốt hơn nếu ít nhất bằng 95% so với SEQ ID NO.63. Tốt hơn, nếu kháng nguyên này chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ SEQ ID NO.63. Theo phương án ưu tiên khác, kháng nguyên của chế phẩm theo sáng chế chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ SEQ ID NO.63. Tốt hơn nữa nếu chế phẩm theo sáng chế chứa (i) hạt tương tự virus được cải biến (VLP) của virus thể khảm gây bệnh ở cây dưa chuột (CMV) có ít nhất một vị trí liên kết thứ nhất, trong đó VLP được cải biến của CMV chứa, chủ yếu bao gồm, hoặc theo cách khác bao gồm, ít nhất một polypeptit CMV được cải biến, trong đó polypeptit CMV được cải biến này chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ, (a) polypeptit CMV, và (b) epitop tế bào T hỗ trợ; và trong đó polypeptit CMV được cải biến này chứa, tốt hơn nếu bao gồm, trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.6 hoặc SEQ ID NO.7; (ii) ít nhất một kháng nguyên có ít nhất một vị trí liên kết thứ hai, và trong đó kháng nguyên là IL-13 của chó; và trong đó VLP của CMV và IL-13 của chó được liên kết thông qua ít nhất một vị trí liên kết thứ nhất và ít nhất một vị trí liên kết thứ hai, và trong đó IL-13 của chó chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ SEQ ID NO.63 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 90%, tốt hơn nếu ít nhất bằng 95% so với SEQ ID NO.63 và tốt hơn nữa nếu trong đó IL-13 của chó chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ SEQ ID NO.63.

Theo phương án ưu tiên hơn, kháng nguyên là TNF α □□ Theo phương án ưu tiên hơn, kháng nguyên này là IL-1 α □

Theo phương án ưu tiên hơn, kháng nguyên là IL-1 β □□□ Theo phương án ưu tiên hơn nữa, kháng nguyên này chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ SEQ ID NO.60.

Theo phương án ưu tiên hơn nữa, kháng nguyên là peptit có nguồn gốc từ A β -1-

42. Theo phương án ưu tiên hơn nữa, kháng nguyên này là IgE hoặc peptit hoặc vùng được chứa trong IgE.

Theo phương án ưu tiên khác nữa, kháng nguyên là IL-31 của người, mèo hoặc chó. Theo phương án ưu tiên khác, kháng nguyên chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ SEQ ID NO.43 hoặc SEQ ID NO.44. Theo phương án ưu tiên khác, kháng nguyên là IL-31 của chó. Theo phương án ưu tiên hơn nữa, kháng nguyên chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ SEQ ID NO.43 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 90%, tốt hơn nếu ít nhất bằng 95% so với SEQ ID NO.43. Tốt hơn, nếu kháng nguyên chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ SEQ ID NO.43. Theo phương án ưu tiên khác, kháng nguyên của chế phẩm theo sáng chế chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ SEQ ID NO.43. Tốt hơn nữa nếu chế phẩm theo sáng chế chứa (i) hạt tương tự virus được cải biến (VLP) của virus thể khảm gây bệnh ở cây dưa chuột (CMV) có ít nhất một vị trí liên kết thứ nhất, trong đó hạt tương tự virus được cải biến này chứa, chủ yếu bao gồm hoặc theo cách khác bao gồm, ít nhất một polypeptit CMV được cải biến, trong đó polypeptit CMV được cải biến này chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ, (a) polypeptit CMV, và (b) epitop tế bào T hỗ trợ; và trong đó polypeptit CMV được cải biến này chứa, tốt hơn nếu bao gồm, trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.6 hoặc SEQ ID NO.7; (ii) ít nhất một kháng nguyên có ít nhất một vị trí liên kết thứ hai, và trong đó kháng nguyên này là IL-31 của chó; và trong đó VLP của CMV và IL-31 của chó được liên kết thông qua ít nhất một vị trí liên kết thứ nhất và ít nhất một vị trí liên kết thứ hai, và trong đó IL-31 của chó chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ SEQ ID NO.43 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 90%, tốt hơn nếu ít nhất bằng 95% so với SEQ ID NO.43, và tốt hơn nữa nếu trong đó IL-31 của chó chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ SEQ ID NO.43.

Theo phương án ưu tiên khác, kháng nguyên là α -synuclein hoặc peptit có nguồn gốc từ α -synuclein và trong đó tốt hơn nếu peptit này bao gồm từ 6 đến 14 axit amin, và trong đó tốt hơn nữa nếu kháng nguyên này là peptit có nguồn gốc từ α -synuclein được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO.32, SEQ ID NO.33 và SEQ ID NO.34. Các peptit được ưu tiên hơn có nguồn gốc từ α -synuclein được bộc lộ trong công bố đơn quốc tế số WO 2011/020133, nội dung của tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Alpha-synuclein (α -Syn), protein nhỏ có nhiều chức năng sinh lý và bệnh lý, là

một trong số các protein chiếm ưu thế được tìm thấy trong các thể Lewy, dấu hiệu nhận biết bệnh lý của các rối loạn thể Lewy, bao gồm bệnh Parkinson (PD). Gần đây hơn, α -Syn đã được phát hiện trong các dịch cơ thể, bao gồm máu và dịch não tủy và cũng được tạo ra bởi các mô ngoại vi và hệ thần kinh trung ương. Sự trao đổi α -Syn giữa các mô não và mô ngoại vi có các ứng dụng sinh lý bệnh và điều trị quan trọng (Gardai SJ et al., PLoS ONE (2013) 8(8): e71634). Bằng chứng liên quan đến alpha-synuclein (α -syn) trong sự phát sinh bệnh của bệnh Parkinson (PD) là sự tràn ngập quá mức. Tuy nhiên, không có sự đồng thuận rõ ràng đối với cách mà trong đó α -syn dẫn đến bệnh lý trong PD và các bệnh synuclein khác.

Alpha-synuclein là thành phần chính của thể Lewy (LB), và phần mô tả về sự biểu hiện quá mức của α -syn dẫn đến sự kết tụ là rất nhiều. Số liệu di truyền ở người đã chứng minh rằng các đột biến sai nghĩa và nhân bội ở gen α -syn gây ra bệnh PD có tính gia đình. Trong trường hợp nhân bội gen, mức độ α -syn protein gia tăng được cho là dẫn đến làm tăng chức năng chiếm ưu thế mà sẽ dẫn đến bệnh lý. Trong khi nồng độ α -syn gia tăng có thể dẫn đến sự kết tụ và tính độc, nghiên cứu trong nhiều năm qua cũng đã cho thấy rằng nồng độ α -syn tăng lên có thể cản trở việc tiết, khu trú và/hoặc duy trì vốn bọt (Gardai SJ et al., PLoS ONE (2013) 8(8): e71634; được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn).

Theo phương án ưu tiên hơn nữa, kháng nguyên là Amylin. Theo phương án ưu tiên, kháng nguyên là angiotensin I hoặc peptit có nguồn gốc từ angiotensin I. Theo phương án ưu tiên khác, kháng nguyên là angiotensin II hoặc peptit có nguồn gốc từ angiotensin II. Theo phương án ưu tiên hơn, kháng nguyên là GnRH□□Theo phương án ưu tiên hơn, kháng nguyên là eotaxin.

Theo phương án ưu tiên khác, kháng nguyên là polypeptit của vật ký sinh, trong đó tốt hơn nếu tác nhân gây bệnh được chọn từ nhóm bao gồm: (a) *Toxoplasma spp.*; (b) *Plasmodium falciparum*; (c) *Plasmodium vivax*; (d) *Plasmodium ovale*; (e) *Plasmodium malariae*; (f) *Leishmania*; (g) *Schistosoma* và (h) *Nematodes*. Tốt hơn, nếu kháng nguyên này có nguồn gốc từ *Plasmodium falciparum* hoặc *Plasmodium Vivax*.

Theo phương án ưu tiên khác, kháng nguyên là polypeptit của vi khuẩn, trong đó tốt hơn nếu vi khuẩn được chọn từ nhóm bao gồm: (a) *Chlamydia*; (b) *Streptococcus*; (c) *Pneumococcus*; (d) *Staphylococcus*; (e) *Salmonella*; (f) *Mycobacteria*; (g) *Clostridia*; (h)

Vibrio; (i) *Yersinia*; (k) *Meningococcus*; (l) *Borelia*.

Theo phương án ưu tiên khác, kháng nguyên là kháng nguyên của virus, trong đó tốt hơn nếu kháng nguyên của virus này là polypeptit được chọn từ nhóm bao gồm: (a) HIV và các retrovirus khác; (b) virus cúm, tốt hơn nếu vùng ngoại bào M2 của virus cúm A hoặc vùng hình cầu HA hoặc HA; (c) polypeptit của virus viêm gan B, tốt hơn nếu preS1; (d) virus viêm gan C; (e) HPV, tốt hơn nếu HPV16E7 (f) RSV, (g) SARS và các Coronavirus khác, (h) virus Danga và các Flavivirus khác, như virus Tây sông Nil và virus bệnh tay chân miệng, (i) *Chikungunya* và các Alphavirus khác, (k) CMV và các virus ecpet khác, (l) Rotavirus. Theo phương án ưu tiên hơn, kháng nguyên này có nguồn gốc từ RSV.

Theo phương án ưu tiên, kháng nguyên là vùng ngoại bào của protein M2 của virus bệnh cúm A hoặc mảnh kháng nguyên của nó. Theo phương án ưu tiên, kháng nguyên này chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ vùng ngoại bào của protein M2 của virus cúm A, trong đó tốt hơn nếu vùng ngoại bào của protein M2 của virus cúm A có trình tự SEQ ID NO.24. Theo phương án ưu tiên khác, kháng nguyên này là vùng hình cầu của virus cúm.

Theo phương án ưu tiên khác, kháng nguyên là dị nguyên, trong đó tốt hơn nếu dị nguyên này có nguồn gốc từ nhóm bao gồm: (a) phần chiết từ phân hoa; (b) phần chiết từ bụi; (c) phần chiết từ mặt bụi; (d) phần chiết từ nấm; (e) phần chiết từ biểu bì của động vật có vú; (f) phần chiết từ lông vũ; (g) phần chiết từ côn trùng; (h) phần chiết từ thức ăn; (i) phần chiết từ tóc; (j) phần chiết từ nước bọt; và (k) phần chiết từ huyết thanh. Theo phương án ưu tiên khác, kháng nguyên này là dị nguyên, trong đó dị nguyên này được chọn từ nhóm bao gồm: (a) cây; (b) cỏ; (c) bụi nhà; (d) mặt bụi nhà; (e) nấm aspergillus; (f) lông động vật; (g) lông vũ của động vật; (h) nọc độc của ong; (i) các sản phẩm từ động vật; (j) các sản phẩm từ thực vật; (k) lớp sừng động vật; (l) dị nguyên của lạc.

Theo phương án ưu tiên khác, kháng nguyên là dị nguyên tái tổ hợp, trong đó dị nguyên này được chọn từ nhóm bao gồm: (a) phospholipaza A2 từ nọc độc của ong; (b) Amb a 1 của phân hoa cây nước thần cao; (c) Bet v I của phân hoa cây phong; (d) 5 DoI m V của nọc độc ong bầu vàng mặt trắng; (e) Der p 1 của mặt bụi nhà; (f) Der f 2 của mặt bụi nhà; (g) Der p 2 của mặt bụi nhà; (h) Lep d của mặt bụi nhà; (i) Alt a 1 của dị nguyên nấm; (j) Asp f 1 của dị nguyên nấm; (k) Asp f 16 của dị nguyên nấm; (l) dị nguyên lạc;

(m) dị nguyên Fel d1 của mèo; (n) dị nguyên Can f1, Can f2 của chó; (o) dị nguyên có nguồn gốc từ lạc; hoặc (p) dị nguyên Cry J2 của cây thông tuyết Nhật Bản. Theo phương án ưu tiên khác, kháng nguyên này là dị nguyên Can f1 hoặc Can f2 của chó.

Theo phương án ưu tiên hơn, kháng nguyên là dị nguyên của lạc. Tốt hơn, nếu kháng nguyên này là dị nguyên của lạc chứa trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO.57, SEQ ID NO.64 hoặc SEQ ID NO.65.

Theo phương án ưu tiên hơn, kháng nguyên là dị nguyên thu được từ Cry J 2 của cây thông tuyết Nhật Bản. Tốt hơn, nếu kháng nguyên này có nguồn gốc từ Cry J 2 của cây thông tuyết Nhật Bản và chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.55.

Theo phương án ưu tiên hơn, kháng nguyên là dị nguyên có nguồn gốc từ Amb a 1 của phấn hoa cây nước thần cao. Tốt hơn, nếu kháng nguyên này có nguồn gốc từ Amb a 1 của phấn hoa cây nước thần cao và chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.54.

Theo phương án ưu tiên, kháng nguyên này là dị nguyên Fel d1 của mèo. Mèo nuôi trong gia đình (*Felis domesticus*) là nguồn dị nguyên trong nhà quan trọng (Lau, S., et al. (2000) Lancet 356, 1392-1397). Thực vậy, mèo được phát hiện là được nuôi trong gia đình ở các nước phương Tây với tỷ lệ khoảng 25% và bệnh dị ứng với mèo được phát hiện ở phần lớn dân số. Mức độ nặng của các triệu chứng từ tương đối nhẹ như viêm mũi và viêm kết mạc đến mức độ nặng là bệnh hen đe dọa cuộc sống tiềm tàng. Mặc dù đôi khi bệnh nhân nhạy với vài phân tử khác nhau trong gàu và lông của mèo, dị nguyên chính là Fel d1. Tầm quan trọng của dị nguyên này đã được nhấn mạnh trong nhiều nghiên cứu. Trên thực tế, hơn 80% bệnh nhân dị ứng với mèo có các kháng thể IgE đối với dị nguyên tiềm tàng này (van Ree, R., et al. (1999) J. Allergy Clin Immunol 104, 1223-1230).

Fel d1 là glycoprotein có tính axit, có chiều dài từ 35 đến 39kDa, chứa 10 đến 20% hydrat cacbon có liên kết N và được tìm thấy ở lông, nước bọt và tuyến lệ của mèo. Nó được tạo ra bởi hai heterodime liên kết không cộng hoá trị. Mỗi heterodime gồm có một peptit 70 gốc (được gọi là “chuỗi 1”) và một peptit 78, 85, 90 hoặc 92 gốc (được gọi là “chuỗi 2”) được mã hoá bởi các gen riêng biệt (xem tài liệu: Duffort, O. A., et al. (1991) Mol Immunol 28, 301-309; Morgenstern, J. P., et al; (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88, 9690-9694 và Griffith, I. J., et al. (1992) Gene 113, 263-268).

Vài cấu trúc tái tổ hợp của Fel d1 đã được mô tả (Vailes LD, et al., J Allergy Clin Immunol (2002) 110:757-762; Grönlund H, et al., J Biol Chem (2003) 278:40144-40151; 2003 Schmitz N, et al., J Exp Med (2009) 206:1941-1955; WO2006/097530).

Do đó, theo phương án ưu tiên hơn, kháng nguyên là rFel d1. Theo phương án ưu tiên hơn, kháng nguyên này là protein Fel d1, trong đó protein Fel d1 này là protein dung hợp chứa chuỗi 1 của Fel d1 và chuỗi 2 của Fel d1, trong đó chuỗi 2 của Fel d1 này được dung hợp qua đầu C của nó với đầu tận cùng N của chuỗi 1 của Fel d1 trực tiếp qua một liên kết peptit hoặc qua đoạn đệm, trong đó đoạn đệm này bao gồm trình tự axit amin có từ 1 đến 20 gốc axit amin, trong đó tốt hơn nếu đoạn đệm này bao gồm trình tự axit amin có từ 10 đến 20 gốc axit amin. Tốt hơn nữa nếu đoạn đệm này bao gồm trình tự axit amin gồm 15 gốc axit amin, và tốt hơn nữa nếu đoạn đệm này có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.47. Theo phương án ưu tiên hơn, kháng nguyên này là protein Fel d1, trong đó protein Fel d1 là protein dung hợp chứa chuỗi 1 của Fel d1 và chuỗi 2 của Fel d1, trong đó chuỗi 1 của Fel d1 này được dung hợp qua đầu C với đầu tận cùng N của chuỗi 2 của Fel d1 trực tiếp qua một liên kết peptit hoặc qua đoạn đệm, trong đó đoạn đệm này bao gồm trình tự axit amin có từ 1 đến 20 gốc axit amin, trong đó tốt hơn nếu đoạn đệm này bao gồm trình tự axit amin có từ 10 đến 20 gốc axit amin. Tốt hơn, nếu chuỗi 1 của Fel d1 chứa trình tự SEQ ID NO.37 hoặc đoạn trình tự tương đồng của nó, trong đó trình tự tương đồng này có độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO.37 lớn hơn 90% hoặc thậm chí tốt hơn nữa là lớn hơn 95%. Tốt hơn nữa nếu chuỗi 2 của Fel d1 này chứa trình tự SEQ ID NO.38, SEQ ID NO.39 hoặc SEQ ID NO.40, hoặc trình tự tương đồng của nó, trong đó trình tự tương đồng này có độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO.38, SEQ ID NO.39 hoặc SEQ ID NO.40 lớn hơn 90% và đặc biệt tốt hơn nữa là lớn hơn 95%.

Theo phương án ưu tiên, kháng nguyên chứa, tốt hơn nếu bao gồm SEQ ID NO.17. Theo phương án ưu tiên khác, kháng nguyên này chứa, tốt hơn nếu bao gồm, SEQ ID NO.18. Theo phương án ưu tiên khác, kháng nguyên này chứa, tốt hơn nếu bao gồm SEQ ID NO.52. Theo phương án ưu tiên, kháng nguyên này là protein Fel d1 chứa trình tự axit amin được chọn từ: (a) SEQ ID NO.17; (b) SEQ ID NO.18; (c) SEQ ID NO.50; (d) SEQ ID NO.56; (e) SEQ ID NO.59; hoặc SEQ ID NO.52.

Theo phương án ưu tiên hơn, protein Fel d1 chứa trình tự axit amin được chọn từ:

(a) SEQ ID NO.50; (b) SEQ ID NO.56; (c) SEQ ID NO.59; hoặc (d) SEQ ID NO.52. Theo phương án ưu tiên hơn, protein Fel d1 chứa trình tự axit amin được chọn từ: (a) SEQ ID NO.50; (b) SEQ ID NO.56; hoặc (c) SEQ ID NO.59.

Theo phương án ưu tiên khác, protein Fel d1 chứa, tốt hơn nếu bao gồm, trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.52. Theo phương án ưu tiên khác, protein Fel d1 chứa, tốt hơn nếu bao gồm, trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.59. Theo phương án ưu tiên khác, protein Fel d1 chứa, tốt hơn nếu bao gồm, trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.50. Theo phương án ưu tiên khác, protein Fel d1 chứa, tốt hơn nếu bao gồm, trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.56.

Theo phương án ưu tiên, chế phẩm theo sáng chế chứa (i) hạt tương tự virus được cải biến (VLP) của virus thể khảm gây bệnh ở cây dưa chuột (CMV) có ít nhất một vị trí liên kết thứ nhất, trong đó hạt tương tự virus được cải biến này chứa, chủ yếu bao gồm, hoặc theo cách khác bao gồm, ít nhất một polypeptit CMV được cải biến, trong đó polypeptit CMV được cải biến này chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ: (a) polypeptit CMV, và (b) epitop tế bào T hỗ trợ; và trong đó polypeptit CMV được cải biến này chứa, tốt hơn nếu bao gồm, trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.6 hoặc SEQ ID NO.7; (ii) ít nhất một kháng nguyên có ít nhất một vị trí liên kết thứ hai, và trong đó kháng nguyên này là protein Fel d1; và trong đó VLP của CMV và protein Fel d1 được liên kết thông qua ít nhất một vị trí liên kết thứ nhất và ít nhất một vị trí liên kết thứ hai, và trong đó protein Fel d1 chứa trình tự axit amin được chọn từ (a) SEQ ID NO.50; (b) SEQ ID NO.56; (c) SEQ ID NO.59; hoặc (d) SEQ ID NO.52, và trong đó tốt hơn nếu protein Fel d1 chứa trình tự axit amin được chọn từ: (a) SEQ ID NO.50; (b) SEQ ID NO.56 hoặc (c) SEQ ID NO.59.

Theo phương án ưu tiên khác, kháng nguyên là nọc độc của động vật. Theo phương án ưu tiên, kháng nguyên là nọc độc của rắn được làm bất hoạt. Theo phương án ưu tiên khác, kháng nguyên là hapten. Theo phương án ưu tiên khác, hapten là dược chất, trong đó tốt hơn nếu dược chất này được chọn từ nhóm bao gồm: (a) codein; (b) fentanyl; (c) heroin; (d) morphin; (e) amphetamin; (f) cocain; (g) metylendioxyamphetamin; (h) methamphetamin; (i) metylphenidat; (j) nicotin; (k) LSD; (l) mescaline; (m) psilocybin; (n) tetrahydrocannabinol; và (o) nicotin.

Theo phương án ưu tiên khác, hapten là hormon, trong đó tốt hơn nếu hormon này

được chọn từ nhóm bao gồm: (a) progesteron; (b) estrogen; (c) testosteron; (d) hormon kích thích nang; (e) hormon kích thích melanin; (f) adrenalin; và (g) noradrenalin. Theo phương án ưu tiên khác, hapten này là độc tố, trong đó tốt hơn nếu độc tố này được chọn từ nhóm bao gồm: (a) aflatoxin; (b) độc tố ciguetera; (c) tetrodotoxin; và (d) chất kháng sinh. Theo phương án ưu tiên khác, hapten là hydrat cacbon có nguồn gốc từ tác nhân gây bệnh.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến vaccin chứa hoặc theo cách khác bao gồm hạt tương tự virus được cải biến theo sáng chế hoặc chế phẩm theo sáng chế. Vaccin theo sáng chế bao gồm các vaccin trong đó hạt tương tự virus được cải biến và/hoặc chế phẩm này có đặc điểm kỹ thuật bất kỳ trong số các đặc điểm kỹ thuật đã được bộc lộ trong bản mô tả này, một mình hoặc ở dạng hỗn hợp bất kỳ có thể có. Theo một phương án, vaccin còn chứa tá dược. Theo phương án khác, vaccin không chứa tá dược. Theo phương án ưu tiên, vaccin chứa lượng hữu hiệu của chế phẩm theo sáng chế. Thuật ngữ “lượng hữu hiệu” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ lượng cần được sử dụng cho đối tượng để đạt được hiệu quả sinh lý phát hiện được.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa: (a) VLP được cải biến theo sáng chế, chế phẩm theo sáng chế hoặc vaccin theo sáng chế; và (b) chất mang, chất pha loãng và/hoặc tá dược được dụng. Chất pha loãng này bao gồm nước vô trùng (ví dụ, nước muối sinh lý) hoặc dung dịch và hỗn dịch không chứa nước. Các ví dụ về dung môi không chứa nước là propylen glycol, polyetylen glycol, dầu thực vật, như dầu oliu và este hữu cơ có thể tiêm được như etyl oleat. Các chất mang hoặc các băng kín có thể được sử dụng để tăng cường tính thấm của da và tăng cường sự hấp thụ kháng nguyên. Các dược phẩm theo sáng chế có thể ở dạng chứa các muối, chất đệm, tá dược hoặc các chất khác cần thiết để cải thiện hiệu quả của thể tiếp hợp. Các ví dụ về chất thích hợp để sử dụng trong việc bào chế dược phẩm được thể hiện trong nhiều nguồn khác nhau bao gồm Remington's Pharmaceutical Sciences (Osol, A, ed., Mack Publishing Co., (1990)). Theo một phương án, dược phẩm này chứa lượng hữu hiệu của vaccin theo sáng chế. Thuật ngữ “lượng hữu hiệu” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ lượng cần được sử dụng cho đối tượng để đạt được hiệu quả sinh lý phát hiện được.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp gây miễn dịch bao gồm bước cho động vật hoặc người sử dụng hạt tương tự virus được cải biến theo sáng chế, chế phẩm theo sáng

chế, vaccin theo sáng chế hoặc dược phẩm theo sáng chế. Theo phương án ưu tiên, phương pháp này bao gồm bước cho động vật hoặc người sử dụng chế phẩm theo sáng chế, vaccin theo sáng chế hoặc dược phẩm theo sáng chế.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp phòng ngừa hoặc điều trị bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh ở động vật, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho động vật này, trong đó tốt hơn nếu động vật này có thể là người, sử dụng hạt tương tự virus được cải biến theo sáng chế, chế phẩm theo sáng chế, vaccin theo sáng chế hoặc dược phẩm theo sáng chế. Theo phương án ưu tiên khác, hạt tương tự virus được cải biến, chế phẩm, vaccin hoặc dược phẩm được dùng cho động vật qua đường tiêm dưới da, tiêm tĩnh mạch, trong da, trong mũi, qua đường miệng, trong hạch hoặc qua da.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Phân lập và tách dòng protein vỏ (CP) của virus thể khảm gây bệnh ở cây dưa chuột (CMV)

Phân lập ARN tổng số từ lá cây hoa loa kèn được gây nhiễm bằng CMV có nguồn gốc từ vườn riêng ở Riga, Latvia, bằng cách sử dụng chất phản ứng TRI (Sigma, Saint Louis, USA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Để tổng hợp ADN bổ sung, kit OneStep RT-PCR (Qiagen, Venlo, Netherlands) được sử dụng. Để khuếch đại gen CP của CMV, chọn trình tự đoạn môi theo phương pháp phân tích trình tự CMV từ GenBank: CMcpF(CACCATGGACAAATCTGAATCAACCAGTGCTGGT) (SEQ ID NO.8) và CMcpR (CAAAGCTTATCAAAGTGGGAGCACCCCAGATGTGGGA) (SEQ ID NO.9); các vị trí NcoI và HindIII được gạch chân. Các sản phẩm PCR tương ứng được tách dòng vào vật truyền pTZ57R/T (Fermentas, Vilnius, Lithuania). Tế bào *E. coli* XL1-Blue được sử dụng làm vật chủ để tách dòng và khuếch đại plasmit. Để tránh sai sót RT-PCR, vài dòng vô tính plasmit pTZ57 chứa gen CP được giải trình tự bằng cách sử dụng kit giải trình tự theo chu kỳ BigDye và máy phân tích gen ABI Prism 3100 (Applied Biosystems, Carlsbad, USA). Sau khi giải trình tự, ADN bổ sung của gen CP của CMV không có lỗi trình tự (SEQ ID NO.10) mã hoá đối với protein vỏ của CMV của SEQ ID NO.1 được tách dòng phụ sau đó vào vị trí NcoI/HindIII của vật truyền biểu hiện pET28a(+) (Novagen, San Diego, USA), dẫn đến plasmit biểu hiện pET-CMVwt (Fig.1).

Ví dụ 2

Sự biểu hiện CP của SEQ ID NO.1 ở *E.coli* tạo ra VLP của CMV

Để thu được VLP của CMV, tế bào *E. coli* C2566 (New England Biolabs, Ipswich, USA) được biến nạp với plasmid pET-CMVwt chứa gen CP của CMV. Sau khi chọn các dòng vô tính có mức biểu hiện cao nhất của protein đích, môi trường nuôi cấy *E. coli* được sinh trưởng trong môi trường 2xTY chứa kanamycin (25mg/L) trên thiết bị lắc kiểu xoay (200 vòng/phút; Infors, Bottmingen, Switzerland) ở nhiệt độ 30°C với OD600 nằm trong khoảng từ 0,8 đến 1,0. Sau đó, tế bào được cảm ứng bằng IPTG 0,2mM và môi trường này được bổ sung MgCl₂ 5mM. Tiếp tục ủ trên thiết bị lắc kiểu xoay ở nhiệt độ 20°C trong 18 giờ. Thu hoạch sinh khối tạo thành bằng cách ly tâm tốc độ thấp và làm đông lạnh ở nhiệt độ -20°C. Sau khi làm tan băng, tế bào được tạo hỗn dịch trong dung dịch đệm chứa natri xitrat 50mM, natri borat 5mM, EDTA 5mM, mercaptoetanol 5mM (độ pH=9,0, dung dịch đệm A) và phá vỡ bằng cách xử lý bằng siêu âm. Loại bỏ các protein không hoà tan và mảnh vỡ tế bào bằng cách ly tâm (13.000 vòng/phút, 30 phút ở nhiệt độ 5°C). Protein CP của CMV hoà tan trong dịch tan sạch được tạo viên bằng cách sử dụng amoni sulfat bão hoà (1:1, theo thể tích) qua đêm ở nhiệt độ +4°C. Protein kết tủa được hòa tan trong cùng một dung dịch đệm A (không có mercaptoetanol) trong 4 giờ ở nhiệt độ +4°C. Loại bỏ các protein không hoà tan bằng cách ly tâm tốc độ thấp (13.000 vòng/phút, 15 phút ở nhiệt độ 4°C). Tách dung dịch chứa protein CP của CMV không hoà tan ra khỏi protein tế bào bằng cách siêu ly tâm (rôto SW28, Beckman, Palo Alto, USA; ở 25.000 vòng/phút, 6 giờ, 5°C) trong gradien sucroza (sucroza 20-60% trong dung dịch đệm A, không có mercaptoetanol, được bổ sung 0,5% Triton X-100). Chia gradien thành sáu phân đoạn, bắt đầu ở đáy gradien và phân tích các phân đoạn này bằng phương pháp SDS-PAGE (Fig.2). Các phân đoạn số 2 và số 3 chứa CP CMV tái tổ hợp và thẩm tách đối với 200 thể tích dung dịch đệm (natri borat 5mM, EDTA 2mM, độ pH=9,0) để loại bỏ sucroza và Triton X-100. Sau khi thẩm tách, tiệt trùng dung dịch CP CMV bằng cách lọc qua bộ lọc 0,2µ. Sau đó, cô CP CMV bằng cách sử dụng rôto Type70 (Beckman, Palo Alto, USA) siêu ly tâm qua “đệm” sucroza 20% trong các điều kiện vô trùng (50.000 vòng/phút, 4 giờ, +5°C). Đánh giá nồng độ của CMVwt tinh chế bằng cách sử dụng huỳnh quang kế QuBit theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Invitrogen, Eugene, USA). Bảo quản dung dịch VLP cô (khoảng 3mg/mL) ở nhiệt

độ +4°C trong natri borat 5mM, EDTA 2mM, dung dịch đệm (độ pH=9,0). Toàn bộ các bước liên quan trong quá trình biểu hiện và tinh chế VLP được theo dõi bằng phương pháp SDS-PAGE bằng cách sử dụng gel 12,5%.

Như được thể hiện trên Fig.2, protein vỏ của CMV có thể được biểu hiện thành công trong tế bào *E.coli* và phần đáng kể thu được có thể trong phân đoạn hoà tan. Ngoài ra, các protein này được phát hiện trực tiếp trong phần chiết tế bào *E.coli* ở dạng VLP cùng kích thước, như được chứng minh bằng phương pháp phân tích gradien sucroza (Fig.3A), tán xạ ánh sáng động và phân tích bằng kính hiển vi điện tử (Fig.3B).

Ví dụ 3

Tách dòng protein vỏ được cải biến của CMV chứa epitop của biến độc tố uốn ván (CMV-Ntt830)

Để thay thế axit amin ban đầu ở đầu tận cùng N của CP CMV của SEQ ID NO.1 đối với các trình tự epitop ngoại lai, plasmit pET-CMVwt được sử dụng làm khuôn để khuếch đại PCR và gây đột biến. Gen CMVwt nằm ở vị trí SalI theo nội tại (Fig.1) được sử dụng để tách dòng các sản phẩm PCR tương ứng.

Để đưa trình tự mã hoá epitop biến độc tố uốn ván vào gen CMVwt, cần phải có hai bước gây đột biến PCR. Đối với bước thứ nhất, việc khuếch đại theo các đoạn mồi được dùng cho PCR: pET-220 (AGCACCGCCGCCGCAAGGAA(SEQ ID NO.11)-ngược dòng từ đa gốc liên kết, vùng được khuếch đại bao gồm vị trí BglII) và CMV-tt83-1R (ATTTGGAGTTGGCCTTAATATACTGGCCCATGGTATATCTCCTTCTTAAAGT) (SEQ ID NO.12). Đối với vòng thứ hai, sản phẩm PCR từ vòng thứ nhất được pha loãng theo tỷ lệ 1:50 và được khuếch đại lại bằng các đoạn mồi pET-220 (SEQ ID NO.11) và CMV-tt83Sal-R2 (GACGTCGACGCTCGGTAATCCCGA TAAATTTGGAGTTGGCCTTAATATACTG) (SEQ ID NO.13). Sản phẩm PCR tạo thành (ADN bổ sung của SEQ ID NO.14 mã hoá đối với CMV-Ntt830 của SEQ ID NO.6) được tách dòng phụ ở các vị trí BglII/SaLI của pET-CMVwt. Dòng vô tính chính xác được xác định bằng cách sắp xếp trình tự và được ký hiệu là pET-CMV-Ntt830.

Ví dụ 4

Sự biểu hiện của CMV-Ntt830 ở *E.coli* dẫn đến hạt tương tự virus được cải biến

của virus thể khảm gây bệnh ở cây dưa chuột

Các quy trình để biểu hiện và khuếch đại CMV-Ntt830 về cơ bản là giống như đối với CMVwt và đã được mô tả trong Ví dụ 2. Để chứng minh sự có mặt của epitop uốn ván trong VLP của CMV, phương pháp phân tích phổ khối của CMV-Ntt830 VLP tinh chế được sử dụng. Như được thể hiện trên Fig.4C, đỉnh chính thu được tương ứng với khối lượng phân tử theo lý thuyết của protein nếu methionin thứ nhất được loại bỏ trong quá trình tổng hợp protein trong tế bào *E.coli*. Sự tán xạ ánh sáng động và phương pháp phân tích bằng kính hiển vi điện tử khẳng định hình thái học của hạt có cùng kích thước tương tự với VLP của CMVwt (Fig.5).

Ví dụ 5

Tách dòng protein vỏ được cải biến của CMV chứa epitop PADRE (CMV-Npadr)

Để đưa trình tự mã hóa epitop PADRE vào gen CMVwt, phương pháp gây đột biến bằng PCR được thực hiện bằng cách sử dụng plasmit pET-CMVwt làm khuôn để khuếch đại và tách dòng phụ (cũng xem Ví dụ 3). Để khuếch đại, các đoạn môi sau được sử dụng: pET-220 (SEQ ID NO.11) và CMV-padrSal-R (GACGTCGACGCGCGGCCGCTTGAGGGTCCACGCGGCCACAAATTTGCCATGGT) (SEQ ID NO.15). Sản phẩm PCR tạo thành (ADN bổ sung của SEQ ID NO.16 mã hoá đối với CMV-Npadrof của SEQ ID NO.7) lại được tách dòng phụ ở các vị trí BglII/SalI của pET-CMVwt. Dòng chính xác được xác định bằng cách lập trình trình tự và được ký hiệu là pET-CMV-Npadr.

Ví dụ 6

Sự biểu hiện của CMV-Npadr ở *E.coli* dẫn đến hạt tương tự virus được cải biến của virus thể khảm gây bệnh ở cây dưa chuột

Các quy trình biểu hiện và tinh chế CMV-Npadr về cơ bản là giống như đối với CMVwt và đã được mô tả trong Ví dụ 2. Để chứng minh sự có mặt của epitop PADRE trong các VLP của CMV, phương pháp phân tích phổ khối của các CMV-Npadr VLP tinh chế được sử dụng. Như được thể hiện trên Fig.4B, đỉnh chính thu được tương ứng với khối lượng phân tử theo lý thuyết của protein nếu methionin thứ nhất được loại bỏ trong quá trình tổng hợp protein trong tế bào *E.coli*. Sự tán xạ ánh sáng động và phương

pháp phân tích bằng kính hiển vi điện tử khẳng định hình thái học của hạt có cùng kích thước, khác không đáng kể với VLP của CMVwt và CMV-Ntt830 (Fig.6).

Ví dụ 7

Gây miễn dịch cho chuột bằng CMVwt, CMV-Ntt830 và CMV-Npadr

Các nhóm gồm bốn chuột cái Balb/c được gây miễn dịch bằng CMVwt, VLP của CMV-Npadr và VLP của CMV-Ntt830. Các VLP được bào chế trong PBS. 150mM, độ pH=7,4 và 150 μ L được tiêm qua đường trong tĩnh mạch vào ngày 0 và ngày 7. CMVwt, VLP của CMV-Npadr và VLP của CMV-Ntt830 được tiêm với ba lượng: 10, 1 hoặc 0,1 μ g. Chuột được lấy máu vào ngày 0 (trước khi gây miễn dịch), ngày 7, ngày 14 và ngày 25 và huyết thanh được phân tích bằng cách sử dụng ELISA đặc hiệu với VLP của CMVwt, VLP của CMV-Npadr và VLP của CMV-Ntt830. Toàn bộ huyết thanh miễn dịch được thử nghiệm đối với các VLP tương ứng được dùng để gây miễn dịch.

ELISA

Mức độ đáp ứng kháng thể trong huyết thanh của chuột được phân tích ở thời điểm chỉ định. Để xác định các độ chuẩn kháng thể đặc hiệu với CMVwt, VLP của CMV-Npadr và VLP của CMV-Ntt830, các đĩa ELISA (Nunc Immuno MaxiSorp, Rochester, NY) được phủ qua đêm ở nhiệt độ 4°C bằng 100 μ L VLP tương ứng (1 μ g/mL) trong dung dịch đệm phủ (dung dịch đệm natri hydro cacbonat 0,1M, độ pH=9,6). Để tránh sự gắn kết không đặc hiệu, phong bế các đĩa ELISA bằng 200 μ L BSA 2% trong PBST và ủ trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng. Pha loãng các mẫu huyết thanh trong BSA 2% /PBST. Chuyển huyết thanh đã pha loãng sơ bộ lên các đĩa đã phủ và được pha loãng thêm theo bậc để thu được các độ chuẩn kháng thể dựa trên sự tính toán OD50. Sau khi ủ 2 giờ ở nhiệt độ phòng, rửa các đĩa ELISA 5 lần bằng 200 μ L PBST. Sự gắn kết các kháng thể huyết thanh được phát hiện bằng kháng thể của dê kháng IgG của chuột nhất được tiếp hợp với peroxidaza của cây cải ngựa (Jackson ImmunoResearch). Pha loãng kháng thể phát hiện theo tỷ lệ 1:1000 trong BSA 2%/PBST và chuyển thể tích 100 μ L/mẫu. Ủ các đĩa trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Rửa đĩa ELISA như được mô tả trên đây. Trước khi rửa, dung dịch cơ chất được chuẩn bị. Nhằm mục đích này, 1 viên nén (10mg) OPD (1,2-Phenylendiamin dihydroclorua) và 9 μ L H₂O₂ 30% được hoà tan trong 25ml dung dịch đệm axit xitric (0,066M Na₂HPO₄, 0,035M axit xitric, độ pH=5,0). Nhỏ

giọt thể tích 100 μ L dung dịch cơ chất lên đĩa bằng ống pipet và ủ chính xác trong 7 phút ở nhiệt độ phòng. Để làm ngừng phản ứng, 50 μ L dung dịch làm ngừng phản ứng (H_2SO_4 5% trong H_2O) được nhỏ giọt bằng ống pipet trực tiếp lên đĩa. Chỉ số đọc của mức độ hấp thụ ở bước sóng 450nm của phản ứng tạo màu 1,2-Phenylendiamin dihydroclorua được phân tích. Fig.7 thể hiện các kháng thể đặc hiệu đối với CMVwt (Fig.7A), -CMV-Npadr (Fig.7B) và CMV-Ntt880 (Fig.7C) theo cách phụ thuộc liều.

Ví dụ 8

Ghép cặp các cấu trúc Fel d1 tái tổ hợp vào VLP CMV-Npadr và VLP CMV-Ntt830 và gây đáp ứng miễn dịch

Sự dung hợp cộng hoá trị của rFel d1 (SEQ ID NO.17 được tạo ra như được mô tả trước đây (Schmitz N, et al., J Exp Med (2009)206:1941-1955). Tóm lại, ADN bổ sung mã hoá dime cộng hoá trị của chuỗi 2 và chuỗi 1, trong đó chuỗi 2 của Fel d1 được dung hợp qua đầu C của nó với đầu tận cùng N của chuỗi 1 của Fel d1 cách nhau bởi gốc liên kết 15 axit amin (GGGGS)₃ thu được bằng cách khuếch đại PCR bằng cách sử dụng các tập hợp đoạn nối ADN xếp chồng (cấu trúc này được gọi là “cấu trúc rFel-2-G3-1”). ADN bổ sung này được tách dòng trong khung thành phiên bản được cải biến của pET-42a(+) (EMD), dẫn đến việc bổ sung trình tự mã hoá đối với LEHHHHHHGGC (SEQ ID NO.35) ở đầu C của cấu trúc rFel-2-G3-1. Trình tự bổ sung chứa đuôi His dùng để tinh chế, sau đó gốc liên kết GGC được sử dụng để ghép cặp protein dung hợp Fel d1 này với CMV-Npadr và CMV-Ntt830.

Theo cách tương tự, sự dung hợp cộng hoá trị khác của rFel d1 (SEQ ID NO.18) được tạo ra như được mô tả trước đây (WO2006/097530) tương ứng với protein dung hợp rFel d1 chứa chuỗi 1 của Fel d1 và chuỗi 2 của Fel d1, trong đó chuỗi 1 của Fel d1 được dung hợp qua đầu C với đầu tận cùng N của chuỗi 2 của Fel d1 bởi gốc liên kết 15 axit amin (GGGGS)₃ (“cấu trúc rFel-1-G3-2”).

Hạt tương tự virus VLP CMV-Npadr và VLP CMV-Ntt830 trong thể tích 2,5ml với nồng độ 2mg/mL (71 μ M) được cho phản ứng với 27 μ L 50mM gốc liên kết chéo hoá học có hai chức khác loại suxinimidyl-6-(b-maleimidopropionamit)hexanoat (SMPH) trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng (RT). Nhóm liên liên kết này chứa NHS este để tham gia phản ứng với lysin trên bề mặt của VLP. Lượng SMPH dùng được sử dụng trong bản mô

tả để chỉ 7,5x mol dư liên quan đến một monome VLP, nghĩa là một polypeptit CMV. Gốc liên kết chéo không phản ứng được loại bỏ bằng phương pháp thẩm tách đối với PBS 150mM, độ pH=7,4. Để tạo ra chế phẩm rFel d1-CMV-Npadr và rFel d1-CMV-Ntt830, dung dịch protein chứa rFel d1 với nồng độ 2,7mg/mL được sử dụng trong bản mô tả để chỉ 150 μ M trong thể tích 200 μ L được trộn với 5x mol dư của chất khử Tris-2-carboxyethyl-phosphin (TCEP) và ủ trong 5 phút ở nhiệt độ phòng. Lượng mol dư liên quan đến lượng protein Fel d1. TCEP khử các liên kết cầu disulfua giữa hai gốc xystein của hai phân tử protein để đảm bảo tính sẵn có của chúng đối với phản ứng ghép cặp với các VLP được dẫn xuất hóa. Protein Fel d1 đã xử lý sơ bộ được cho phản ứng với tỷ lệ mol 1:1 với 7,5x VLPCM-V-Npadr và VLP CMV-Ntt830 được tạo dẫn xuất SMPH trong 3 giờ ở nhiệt độ phòng trong khi lắc. Xystein khử của protein được cho phản ứng với maleimit của gốc liên kết chéo SMPH được gắn kết với VLP. Sau khi ghép cặp cộng hoá trị, rFel d1 không ghép cặp được loại bỏ bằng cách lọc gel trong PBS 150mM, độ pH=7,4. Chế phẩm được phân tích bằng phương pháp SDS-PAGE và thẩm tách miễn dịch để quan sát và xác nhận các dải ghép cặp. Nhằm mục đích này, các mẫu VLP CMV-Npadr và CMV-Ntt830 được tạo dẫn xuất SMPH, chế phẩm rFel d1-CMV-Npadr và rFel d1-CMV-Ntt830 và protein Fel d1 được tải song song trên gel. Việc ghép cặp được quan sát bằng cách thẩm tách miễn dịch bằng cách sử dụng các kháng thể kháng penta His gắn kết với đuôi His của protein Fel d1. Các dải quan sát được thể hiện protein Fel d1 cũng như VLP của CMV-Npadr được tạo dẫn xuất SMPH, VLP của CMV-Ntt830, và chế phẩm rFel d1-CMV-Npadr và rFel d1-CMV-Ntt830 mà toàn bộ trong số chúng được phân biệt một cách dễ dàng theo vị trí của chúng. Ngoài ra, SDS-PAGE gel được nhuộm bằng chất nhuộm xanh Coomassie và việc ghép cặp được quan sát và được xác nhận.

Gây miễn dịch cho chuột bằng rFel d1 được ghép cặp với CMV-Npadr và CMV-Ntt830

Các nhóm gồm năm chuột cái Balb/c được gây miễn dịch bằng VLP của CMV-Npadr và VLP của CMV-Ntt830 được ghép cặp qua SMPH với rFel d1. Lượng tương ứng gồm 5 μ g rFel d1-CMV-Npadr và rFel d1-CMV-Ntt830 được pha loãng trong PBS 150mM, độ pH=7,4 đến 150 μ L và tiêm qua đường trong tĩnh mạch vào ngày 0 và ngày 7. Lấy máu chuột vào ngày 0 (trước khi gây miễn dịch), ngày 7, ngày 14 và ngày 25 và phân tích huyết thanh bằng cách sử dụng ELISA đặc hiệu Fel d1.

ELISA

Phân tích đáp ứng kháng thể trong huyết thanh của chuột tại thời điểm chỉ định. Các kháng thể đặc hiệu với Fel d1 được phân tích bằng cách phủ đĩa ELISA với nồng độ 1µg/mL trong thể tích 100µL trong PBS (độ pH=7,2) ở nhiệt độ 4°C qua đêm. Rửa đĩa ELISA 5 lần bằng 200µL PBS chứa 0,05% Tween 20 (độ pH=7,2, PBST). Để tránh sự gắn kết không đặc hiệu, các đĩa ELISA được phong bế bằng 200µL BSA 2% trong PBST và ủ trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng. Pha loãng các mẫu huyết thanh trong BSA 2% /PBST. Chuyển huyết thanh đã pha loãng từ trước lên các đĩa đã phủ và pha loãng tiếp theo bậc để thu được các độ chuẩn kháng thể dựa vào sự tính toán OD50. Sau khi ủ 2 giờ ở nhiệt độ phòng, rửa các đĩa ELISA 5 lần bằng 200µL PBST. Sự gắn kết của các kháng thể huyết thanh được phát hiện bằng kháng thể của dê kháng IgG của chuột nhất được tiếp hợp với peroxidaza của cây cải ngựa (Jackson ImmunoResearch). Pha loãng kháng thể phát hiện theo tỷ lệ 1:1000 trong BSA 2%/PBST và chuyển thể tích 100µL/mẫu. Ủ các đĩa trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Rửa các đĩa ELISA như được mô tả trên đây. Trước khi rửa, dung dịch cơ chất được chuẩn bị. Nhằm mục đích này, 1 viên nén (10mg) OPD (1,2-Phenylendiamin dihydroclorua) và 9µL H₂O₂ 30% được pha loãng trong 25ml dung dịch đệm axit xitric (0,066M Na₂HPO₄, 0,035M axit xitric, độ pH=5,0). Nhỏ giọt thể tích 100µL dung dịch nền lên các đĩa bằng ống pipet và ủ chính xác trong 7 phút ở nhiệt độ phòng. Để làm ngừng phản ứng, nhỏ giọt bằng ống pipet trực tiếp 50µL dung dịch làm ngừng phản ứng (H₂SO₄ 5% trong H₂O) lên các đĩa. Chỉ số đọc của độ hấp thụ ở bước sóng 450nm của phản ứng tạo màu 1,2-Phenylendiamin dihydroclorua được phân tích. Fig.8 cho thấy rằng các kháng thể đặc hiệu với Fel d1 được cảm ứng ở chuột bằng chế phẩm theo sáng chế rFel d1-CMV-Npadr (Fig.8A) và rFel d1-CMV-Ntt830 (Fig.8B).

Ví dụ 9

Ghép cặp α -synuclein peptit với CMV-Ntt830 và gây đáp ứng miễn dịch

Việc ghép cặp α -synuclein peptit của SEQ ID:22 với các VLP được tạo ra từ CMV-Ntt830 (SEQ ID NO.6) được thực hiện như sau. Dung dịch chứa 1ml CMV-Ntt830 1mg/mL trong HEPES 20mM, NaCl 50mM, độ pH=7,3 được cho phản ứng trong 60 phút ở nhiệt độ phòng với 79,3µL dung dịch SMPH (10mM trong DMSO). Ngoài ra, dung dịch chứa 1ml CMV-Ntt830 1mg/mL trong HEPES 20mM, NaCl 50mM, độ pH=7,3

được cho phản ứng trong 60 phút ở nhiệt độ phòng với 79,3 μ L dung dịch Sulfo-KMUS (10mM trong HEPES 20mM, độ pH=7,4). Hỗn hợp phản ứng được thẩm tách ở nhiệt độ 4°C ba lần đối với 2L HEPES 20mM, NaCl 50mM, độ pH=7,3 trong 2 giờ, 14 giờ và 2 giờ trong cát xét thẩm tách Slide-A-Lyzer với MWCO có chiều dài 10kDa. 800 μ L dung dịch CMV-Ntt830 đã tạo dẫn xuất và thẩm tách được trộn với 21,5 μ L α -synuclein peptit (22,32mg/mL) và ủ trong 3 giờ ở nhiệt độ phòng để tạo liên kết chéo hoá học ở tốc độ 500 vòng/phút trên máy trộn nhiệt Eppendorf đang lắc. Phản ứng ghép cặp được làm sạch bằng cách ly tâm ở tốc độ 20000 x g trong 10 phút ở nhiệt độ 4°C. Protein vỏ của CMV-Ntt830 được tạo dẫn xuất và các sản phẩm ghép cặp được phân tích bằng phương pháp phân tích SDS-PAGE trong các điều kiện khử trên NuPAGE® gel Bis-Tris 4-12%. Tiếp theo, phương pháp phân tích cường độ vết của gel nhuộm Coomassie được thực hiện. Vài dải có trọng lượng phân tử tăng lên tương đối với monome vỏ CMV-Ntt830 có thể quan sát được rõ ràng, điều này chứng minh rằng việc tạo liên kết chéo thành công của α -synuclein peptit với CMV-Ntt830 (chất nhuộm Coomassie NuPAGE®, không được thể hiện trên hình vẽ). Cường độ ghép cặp cao hơn 1,0 và hiệu quả ghép cặp khoảng 60%. Để chứng minh tính toàn vẹn của VLP của CMV-Ntt830 sau khi tạo dẫn xuất và ghép cặp, CMV-Ntt830 được tạo dẫn xuất và các sản phẩm ghép cặp được phân tích bằng phương pháp điện di trên gel agarosa 1% trong 1 x TAE tiếp theo là chất nhuộm Coomassie- và ethidi bromua. Các dải protein và axit nucleic của VLP của CMV-Ntt830 được tạo dẫn xuất và ghép cặp tương ứng với sự đồng di trú và có đặc tính di trú tương tự như CMV-Ntt830 không được tạo dẫn xuất và không được ghép cặp. Sự đồng di trú giữa protein vỏ và axit nucleic đã chứng minh rõ ràng là VLP của CMV-Ntt830 vẫn nguyên vẹn và không có axit nucleic nào được giải phóng ra khỏi VLP của CMV-Ntt830.

Gây miễn dịch cho chuột bằng peptit được tạo dẫn xuất α -synuclein ghép cặp với protein vỏ của CMV-Ntt830

Các nhóm gồm bốn chuột cái C57B/6 được gây miễn dịch bằng VLP của CMV-Ntt830 được ghép cặp qua SMPH với α -synuclein peptit (SEQ ID NO.22). Pha loãng lượng 250 μ g protein toàn phần trong PBS 150mM, độ pH=7,4 đến 150 μ L và tiêm qua đường trong tĩnh mạch vào ngày 0 và ngày 14. Lấy máu chuột vào ngày 0 (trước khi gây miễn dịch), ngày 7, ngày 14, ngày 21, ngày 28 và ngày 34 và phân tích huyết thanh bằng cách sử dụng phương pháp ELISA đặc hiệu với α -synuclein.

ELISA

Các α -synuclein peptit được ghép cặp với RNAza của bò bằng cách sử dụng gốc liên kết chéo hoá học sulfo-SPDP. Phủ các đĩa ELISA bằng chế phẩm RNAza được ghép cặp α -synuclein peptit ở nồng độ 5 μ g/mL. Phong bế các đĩa và sau đó ủ với huyết thanh của chuột được pha loãng theo bậc. Các kháng thể gắn kết được phát hiện bằng IgG kháng chuột được đánh dấu bằng enzym. Để làm đối chứng, huyết thanh trước khi gây miễn dịch của chính các chuột này cũng được thử nghiệm. Toàn bộ các chuột đều có đáp ứng IgG sạch và mạnh kháng peptit có nguồn gốc từ α -synuclein được thể hiện trên Fig.9.

Ví dụ 10

Ghép cặp peptit IL-17A với CMV-Ntt830 và gây đáp ứng miễn dịch

Việc ghép cặp protein IL17A của chuột (SEQ ID NO.20) với protein vỏ của CMV-Ntt830 (SEQ ID NO.6) được thực hiện. Protein mIL-17 được liên kết cộng hoá trị với CMV-Ntt830 bằng quy trình hai bước. Bước thứ nhất, VLP của CMV-Ntt830 (2mg/mL trong NaH₂PO₄ 50mM, glyxerol 10%, độ pH=7,4) được cho phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 60 phút với lượng đẳng mol của gốc liên kết chéo hoá học có hai chức khác nhau, suxinimidyl-6-(β -maleimidopropionamido)hexanoat (SMPH). Gốc liên kết chéo không phản ứng được loại bỏ bằng cách lọc gel bằng cột khử muối PD-10 bằng cách sử dụng cùng loại dung dịch đệm (NaH₂PO₄ 50mM, glyxerol 10%, độ pH=7,4). Trước bước tiếp hợp, ủ protein mIL-17 đã tinh chế trong 5 phút ở nhiệt độ phòng với lượng dư gấp 10 lần lượng tri(2-carboxyetyl)phosphin hydroclorua (TCEP-HCl) để khử các gốc xystein bất kỳ trong gốc liên kết. Tiếp theo, protein mIL-17 được liên kết cộng hoá trị với các VLP được tạo dẫn xuất bằng cách cho lượng đẳng mol của protein mIL-17 phản ứng với VLP trong 3 giờ ở nhiệt độ phòng. Phân tích vacxin bằng phương pháp SDS-PAGE, sau đó bằng chất nhuộm Coomassie và thẩm tách miễn dịch bằng kháng thể kháng His. Cường độ của dải chất nhuộm xanh Coomassie tương ứng với các thành phần khác nhau của phản ứng ghép cặp được xác định theo mật độ vết và được sử dụng để tính hiệu quả ghép cặp. Monome CMV-Ntt830 đã tạo dẫn xuất được di trú dưới dạng dải 28kDa rời rạc trong khi thể tiếp hợp CMV-Ntt830-mIL-17 di trú ở 45kDa (monome CMV-Ntt830 28kDa + protein mIL-17 17kDa). Phương pháp phân tích bằng SDS-PAGE

và quan sát được vài dải hiển thị chất nhuộm Coomassie có trọng lượng phân tử tăng lên so với protein vỏ của CMV-Ntt830, điều này cho thấy sự liên kết chéo thành công của protein IL-17 với VLP của CMV-Ntt830. Hiệu quả ghép cặp được xác định theo tỷ lệ phân tử của monome CMV-Ntt830 được ghép cặp với mIL-17 (dải 45kDa) với monome CMV-Ntt830 toàn phần (tổng cộng gồm các dải 28 và 45kDa). Hiệu quả ghép cặp được xác định là ít nhất 15,3% bằng một phân tử mIL-17/6,5 phân tử CMV-Ntt830. Hiệu quả ghép cặp tính được theo cách này là kết quả đánh giá tối thiểu về mức độ ghép cặp, do nó không tính đến việc monome CMV-Ntt830 được ghép cặp với nhiều hơn một phân tử mIL-17. Do đó, các protein quan tâm như IL-17A có thể được ghép cặp hữu hiệu với các VLP của CMV-Ntt830.

Gây miễn dịch cho chuột bằng protein IL17A của chuột được ghép cặp với VLP của CMV-Ntt830

Các nhóm gồm 3 chuột cái BALB/c được gây miễn dịch bằng protein vỏ của CMV-Ntt830 được ghép cặp với protein IL17A của chuột. Pha loãng 20 μ g protein toàn phần trong PBS, độ pH=7,4 đến 150 μ L và tiêm qua đường trong tĩnh mạch vào ngày 0, ngày 14. Lấy máu chuột vào ngày 0 (trước khi gây miễn dịch), ngày 7, ngày 14, ngày 21, và ngày 34 và phân tích huyết thanh bằng cách sử dụng phương pháp ELISA đặc hiệu với IL17A của chuột.

ELISA

Phủ các đĩa ELISA bằng IL17A của chuột với nồng độ 1 μ g/mL. Phong bế các đĩa này và sau đó ủ với huyết thanh của chuột được pha loãng theo bậc từ ngày 0, 4, 14, 21 và 34. Các kháng thể gắn kết được phát hiện bằng kháng thể IgG kháng chuột được đánh dấu bằng enzym. Các độ chuẩn kháng thể của huyết thanh của chuột được tính làm giá trị trung bình của các dung dịch pha loãng này dẫn đến giá trị mật độ quang một nửa mức tối đa ở bước sóng 450nm. Chuột được gây miễn dịch bằng VLP của CMV-Ntt830 được ghép cặp với IL17A được gắn đáp ứng miễn dịch mạnh kháng protein IL17 (Fig.10).

Phát hiện sự trung hoà kháng thể

Huyết thanh của chuột được gây miễn dịch bằng IL17 của chuột được ghép cặp với CMV-Ntt830 như đã mô tả trên đây, được thử nghiệm sau đó về khả năng của chúng trong việc ức chế sự gắn kết của protein IL17A của chuột với thụ thể IL-17. Do đó, các

đĩa ELISA được phủ protein thụ thể A IL-17 của chuột với nồng độ 1µg/mL. Các dung dịch pha loãng theo bậc của huyết thanh của chuột từ chuột ngày 35 được ủ sơ bộ với IL-17A của chuột được biotinyl hoá 10ng/mL trong một giờ và sau đó cho thêm vào các đĩa được phủ thụ thể A IL-17. Sự gắn kết của IL 17 với thụ thể đã phủ được phát hiện bằng peroxidaza của cây cải ngựa tiếp hợp với streptavidin. Việc làm trung hòa các độ chuẩn kháng thể được tính toán theo giá trị trung bình của các dung dịch pha loãng huyết thanh dẫn đến mật độ quang nửa mức tối đa ở bước sóng 450nm.

Hiệu quả của CMV-Ntt830 -mIL17A theo mức độ thuyên giảm bệnh viêm não tự miễn theo thử nghiệm ở mô hình chuột bị bệnh xơ cứng rải rác

Chuột cái SJL được gây miễn dịch như đã mô tả trên đây và tiêm dưới da với 100µg PLP peptit được trộn với tá được Freund toàn vẹn một tuần sau lần gây miễn dịch cuối cùng. Vào cùng ngày, toàn bộ các chuột được tiêm qua đường trong màng bụng 400ng độc tố ho gà. Chuột được chấm điểm hàng ngày về sự phát triển của các triệu chứng thần kinh theo tiêu chí sau: 0: không có bệnh lâm sàng; 0,5: kết thúc đuôi ủ rũ; 1: đuôi ủ rũ hoàn toàn; 1,5: đuôi ủ rũ và chân sau ủ rũ yếu (đi không vững và chân sau kém); 2: chân sau ủ rũ một phần về một bên bại liệt; 2,5: chân sau ủ rũ một phần về hai bên bại liệt; 3: chân sau ủ rũ về hai bên hoàn toàn bại liệt; 3,5: chân sau ủ rũ về hai bên hoàn toàn bại liệt và chân trước ru rũ về một bên bại liệt; 4: bại liệt hoàn toàn chân sau và chân trước ủ rũ. Điểm số đánh giá lâm sàng trung bình được đánh giá đối với mỗi chuột được gây miễn dịch bằng CMV-Ntt830-mIL17A hoặc CMV-Ntt830 như đã mô tả trên đây. Chuột được gây miễn dịch bằng CMV-Ntt830-mIL 17A có các triệu chứng lâm sàng giảm đáng kể từ ngày 53 đến 61 so với chuột được gây miễn dịch bằng CMV-Ntt830. Điều này chứng minh rằng các kháng thể kháng IL-17 được tạo ra bằng cách gây miễn dịch bằng CMV-Ntt830-mIL17A có khả năng cải thiện các triệu chứng lâm sàng ở mô hình chuột bị bệnh xơ cứng rải rác.

Ví dụ 11

Ghép cặp IL-5 của chuột với CMV-Ntt830 và gây đáp ứng miễn dịch

IL-5 được biểu hiện và được tinh chế như được mô tả (Zou Y, et al., Vaccine 28 (2010) 3192-3200). Việc ghép cặp của mIL-5 (SEQ ID NO.23) với VLP của CMV-Ntt830 bằng CP được cải biến của SEQ ID NO.6 được thực hiện như sau. Để được ghép

cặp với các VLP của IL-5CMV-Ntt830, trước tiên tạo dẫn xuất với lượng dư gấp 30 lần gốc liên kết hoá học có hai chức khác loại, suxinimidyl-6-(β -maleimidopropionamido)hexanoat (SMPH). SMPH không gắn kết được loại bỏ bằng cách thẩm tách đối với PBS. rIL-5 được giảm đi trong 1 giờ bằng lượng đẳng mol của tri(2-carboxyetyl)phosphin hydroclorua (TCEP) trong PBS (độ pH=8,0). rIL-5 giảm (80 μ M) được ủ trong 4 giờ ở nhiệt độ 22°C với CMV-Ntt830 40 μ M được tạo dẫn xuất SMPH. Hỗn hợp phản ứng được thẩm tách trong 12 giờ đối với PBS, độ pH=8,0.

Gây miễn dịch cho chuột bằng peptit có nguồn gốc từ IL-5 được ghép cặp với các VLP của protein vỏ được cải biến của CMV-Ntt830

Các nhóm gồm bốn chuột cái Balb/c được gây miễn dịch bằng VLP của CMV-Ntt830 được ghép cặp qua SMPH với IL-5 (SEQ ID NO.23). Pha loãng 50 μ g protein toàn phần trong HEPES 20mM, NaCl 50mM, độ pH=7,3 đến 200 μ L và tiêm dưới da (100 μ L trên hai phía bụng) vào ngày 0 và ngày 14. Lấy máu chuột vào các ngày 0 (trước khi gây miễn dịch), ngày 14 và ngày 21 và phân tích huyết thanh bằng cách sử dụng phương pháp ELISA đặc hiệu với IL-5 và CMV-Ntt830.

ELISA

Phủ các đĩa ELISA bằng IL-5 với nồng độ 10 μ g/mL hoặc VLP của CMV-Ntt830 với nồng độ 2 μ g/mL. Phong bế các đĩa và sau đó ủ bằng huyết thanh của chuột pha loãng theo bậc. Các kháng thể đã gắn kết được phát hiện bằng IgG kháng chuột được đánh dấu bằng enzym. Để làm đối chứng, huyết thanh trước khi gây miễn dịch của chính các chuột này cũng được thử nghiệm (số liệu không được thể hiện trên hình vẽ). Toàn bộ các chuột đều có đáp ứng IgG sạch và mạnh kháng peptit cũng như CMV-Ntt830

Mô hình dựa trên OVA của bệnh viêm đường hô hấp dị ứng

Để gây viêm đường hô hấp dị ứng, chuột cái BALB/c (5 con/nhóm) được tiêm (i.p.) 10 μ g OVA (Loại V, Sigma-Aldrich) được trộn với 2mg phèn (tá được nhôm hydroxit gel, Brenntag Biosector, Denmark). 10 ngày sau, chuột được thách thức hàng ngày bằng 100 μ g OVA bằng cách sử dụng qua đường trong mũi trong 4 ngày. 24 giờ sau lần thách thức cuối cùng, BAL và phổi được nghiền cứu mô. Chuột được tiêm OVA và phèn qua đường i.p. nhưng không được thách thức qua đường trong mũi bằng OVA dùng làm đối chứng âm tính để gây bệnh trong các thử nghiệm này.

Bằng cách sử dụng mô hình này, chuột được gây miễn dịch hai lần (d-0, d-14) bằng 100µg VLP của CMV-Ntt830 hoặc VLP của CMV-Ntt830 được ghép cặp với IL-5. Vào ngày 21, chuột được gây cảm ứng bằng OVA và vào ngày 31 được thách thức qua đường trong mũi bằng OVA. Chuột được gây miễn dịch bằng IL-5 có số giảm mạnh lượng bạch cầu ưa eozin trong dịch phế quản phế nang giảm mạnh.

Ví dụ 12

Ghép cặp peptit M2 với hạt tương tự virus CMV-Ntt830

Dung dịch chứa 2ml VLP của CMV-Ntt830 1mg/mL với CP được cải biến của SEQ ID NO.6 trong PBS/glycerol 10%, độ pH=7,2 được cho phản ứng trong 60 phút ở nhiệt độ phòng với 42,6µL dung dịch SMPH (150mM trong DMSO). Dung dịch phản ứng được thẩm tách ở nhiệt độ 4°C đối với hai sự thay đổi 2 1 của HEPES 20mM/glycerol 10%, độ pH=7,2 trong 12 giờ và 4 giờ. Trộn 0,6ml dung dịch CMV-Ntt830 được tạo dẫn xuất và thẩm tách với 21,45µL dung dịch DMSO 10mM chứa peptit M2 của virus cúm (SEQ ID NO.24) và ủ trong 4 giờ ở nhiệt độ phòng để tạo liên kết chéo hoá học ở vaccine tiếp hợp CMV-Ntt830-M2. Peptit không ghép cặp được loại bỏ bằng cách thẩm tách đối với HEPES 20mM/glycerol 10%, độ pH=7,2 trong 12 giờ và 4 giờ. Phân tích sản phẩm ghép cặp trên gel 12% Bis-Tris-polyacrylamit trong các điều kiện khử. Vài dải trọng lượng phân tử tăng lên so với monome capsit CMV-Ntt830 có thể quan sát được, điều này chứng minh sự tạo liên kết chéo thành công của peptit M2 của virus cúm với CMV-Ntt830 capsit.

Gây miễn dịch cho chuột bằng peptit M2 được ghép cặp với CMV-Ntt830 capsit (CMV-Ntt830 -M2)

Gây miễn dịch cho bốn chuột cái Balb/nhóm bằng 40µg vaccine CMV-Ntt830-M2 được bào chế trong 200µL PBS và tiêm dưới da vào ngày 0 và ngày 20. Lấy máu chuột vào ngày 34 và phân tích huyết thanh bằng cách sử dụng ELISA đặc hiệu M2 và đặc hiệu CMV-Ntt830.

Phát hiện các kháng thể kháng M2 bằng ELISA

Phủ đĩa ELISA bằng peptit M2 (SEQ ID NO.24) với nồng độ 10µg/mL hoặc bằng hạt tương tự virus CMV-Ntt830 ở nồng độ 10µg/mL. Phong bế đĩa và sau đó ủ với huyết

thanh của chuột được pha loãng theo bậc. Phát hiện kháng thể gắn kết bằng kháng thể IgG kháng chuột được đánh dấu bằng enzym. Các độ chuẩn kháng thể của huyết thanh của chuột được xác định là số đảo của các dung dịch pha loãng đến 50% OD được xác định ở nồng độ bão hoà (OD50). Các độ chuẩn kháng thể kháng M2 trung bình và các độ chuẩn kháng CMV-Ntt830 vào ngày 34 của chuột >1:10000. Số liệu này chứng tỏ rằng việc ghép cặp của peptit M2 với CMV-Ntt830 capsit tăng cường mạnh tính sinh miễn dịch của peptit M2 do một mình peptit M2 không sinh miễn dịch.

Hiệu quả của việc gây miễn dịch bằng CMV-Ntt830-M2 được thử nghiệm trên mô hình chuột nhiễm cúm. Thách thức chuột bằng liều gây chết 4xLD50 virus cúm A/PR/8/34 thích ứng chuột. Pha loãng virus trong PBS và dùng (2 x 50 μ L) qua đường mũi trong điều kiện gây mê nhẹ bằng isofuran. Chuột bị giảm hơn 30% trọng lượng cơ thể hoặc có nhiệt độ cơ thể bằng hoặc thấp hơn 30°C, được gây chết êm ái. Tỷ lệ sống sót của chuột ở cả hai nhóm là như sau: Toàn bộ các chuột được gây miễn dịch bằng CMV-Ntt830-M2 còn sống trong khi toàn bộ các chuột được gây miễn dịch bằng riêng CMV-Ntt830 bị chết. Kết quả này chứng minh rằng việc gây miễn dịch cho chuột bằng peptit M2 ghép cặp với CMV-Ntt830 tạo ra kháng thể đặc hiệu M2 bảo vệ chuột đối với sự gây nhiễm khuẩn gây chết bằng virus cúm A/PR/8/34.

Ví dụ 13

Ghép cặp A β 1-6 peptit với hạt tương tự virus CMV-Ntt830

Dung dịch chứa 2ml VLP của CMV-Ntt830 1mg/mL có CP được cải biến của SEQ ID NO.6 trong PBS/glyxerol 10%, độ pH=7,2 được cho phản ứng với 42,6 μ L dung dịch SMPH (150mM trong DMSO) trong 60 phút ở nhiệt độ phòng. Thăm tách dung dịch phản ứng ở nhiệt độ 4°C dựa theo hai sự thay đổi 2 1 của HEPES 20mM/glyxerol 10%, độ pH=7,2 trong 12 giờ và 4 giờ. Trộn 0,6ml dung dịch CMV-Ntt830 được tạo dẫn xuất và thăm tách với 21,45 μ L dung dịch DMSO 10mM chứa A β 1-6 (SEQ ID NO.25) và ủ trong 4 giờ ở nhiệt độ phòng để tạo liên kết chéo hoá học tạo ra vacxin tiếp hợp CMV-Ntt830 - A β 1-6. Peptit không ghép cặp được loại bỏ bằng cách thăm tách đối với HEPES 20mM/glyxerol 10%, độ pH=7,2 trong 12 giờ và 4 giờ. Phân tích sản phẩm được ghép cặp trên gel 12% Bis-Tris-polyacrylamit trong các điều kiện khử. Quan sát được vài dải có trọng lượng phân tử tăng lên so với monome capsit CMV-Ntt830, điều này chứng

minh sự tạo liên kết chéo thành công peptit A β 1-6 của CMV-Ntt830.

Gây miễn dịch cho chuột bằng peptit A β 1-6 ghép cặp với capsit CMV-Ntt830 (CMV-Ntt830 -A β 1-6)

Gây miễn dịch cho bốn chuột cái Balb/nhóm bằng 40 μ g vacxin CMV-tt830 - A β 1-6 được bào chế trong 200 μ L PBS và tiêm dưới da vào ngày 0 và ngày 20. Lấy máu chuột vào ngày 34 và phân tích huyết thanh bằng cách sử dụng phương pháp ELISA đặc hiệu A β 1-6 và đặc hiệu CMV-Ntt830.

Phát hiện kháng thể kháng A β 1-6 bằng ELISA

Phủ các đĩa ELISA bằng A β 1-6 ghép cặp với RNAza ở nồng độ 10 μ g/mL hoặc bằng hạt tương tự virus CMV-Ntt830 ở nồng độ 2 μ g/mL. Phong bế đĩa và sau đó ủ với huyết thanh của chuột được pha loãng theo bậc. Phát hiện kháng thể gắn kết bằng các kháng thể IgG kháng chuột được đánh dấu bằng enzym. Các độ chuẩn kháng thể của huyết thanh của chuột được xác định là số đảo của các dung dịch pha loãng dẫn đến OD 50% được xác định ở mức bão hòa (OD50). Các độ chuẩn kháng thể kháng A β 1-6 trung bình và các độ chuẩn kháng CMV-Ntt830 ở ngày 34 của chuột >1:10000. Các số liệu chứng minh rằng việc ghép cặp của peptit A β 1-6 với CMV-Ntt830 capsit tăng cường mạnh tính sinh miễn dịch của peptit A β 1-6 do một mình peptit A β 1-6 không gây miễn dịch. Phần não của bệnh nhân Alzheimer được nhuộm bằng huyết thanh của chuột và vết tan trở nên nhìn thấy rõ ràng.

Ví dụ 14

Tách dòng protein dung hợp Fel d 1

Protein dung hợp Fel d1 (cụ thể là F12H6GGC) bao gồm chuỗi 1 của Fel d1 được dung hợp với đầu tận cùng N của chuỗi 2 của Fel d1 qua 15 trình tự axit amin (GGGGS)₃ (SEQ ID NO.47) và kết hợp trình tự HHHHHHGGC (SEQ ID NO.48) được dung hợp với đầu C của chuỗi 2 của Fel d1 được tạo ra bằng phương pháp tổng hợp gen định hướng oligonucleotit. Trình tự oligonucleotit tương ứng có trình tự SEQ ID NO.49, trong đó trình tự protein của F12H6GGC có trình tự SEQ ID NO.50:

MEICPAVKRDVDLFLTGTPDEYVEQVAQYKALPVLLENARILKNCVDAK
MTEEDKENALSVLDKIYTSPLCGGGGSGGGGSGGGGSGVSKMAETCPIFYDVFFAV

ANGNELLLDLSLTKVDATEPERTAMKKIQDCYVENGLISRVL DGLVMTTISSSKD
CMGEAVQNTVEDLKLNTLGRHHHHHHGGC

Sau khi tổng hợp gen, nó được cắt ra khỏi plasmit hỗ trợ của nó và được tách dòng phụ trong khung vào các vị trí NdeI/XhoI của plasmit pET42a(+) (Novagen, USA) dẫn đến vật truyền biểu hiện pET42-F12H6GGC.

Các protein dung hợp Fel d1 không có trình tự hexa-histidin (cụ thể là F12GGC) được tạo ra bằng quá trình gây đột biến bằng PCR bằng cách sử dụng plasmit pET42-F12H6GGC làm khuôn. Các đoạn mồi oligonucleotit được sử dụng trong các phản ứng PCR để tạo ra các protein dung hợp này là:

Đối với F12GGC, đoạn mồi xuôi là Fel_BglF (SEQ ID NO.51) và đoạn mồi ngược là Feld-dHR (SEQ ID NO.53).

Toàn bộ các sản phẩm PCR được cắt bằng các enzym giới hạn BglII/XhoI và tách dòng phụ trở lại vật truyền pET42-F126HGGC ở cùng các vị trí cắt. Sau khi phân lập ADN plasmit, xác nhận các thay đổi đưa vào bằng cách sử dụng kit giải trình tự theo chu kỳ BigDye và máy phân tích gen ABI Prism 3100 (Applied Biosystems, Carlsbad, USA). Các vật truyền biểu hiện tạo thành được gọi là pET42-F12GGC. Nó mã hoá tương ứng protein dung hợp Fel d1 F12GGC (SEQ ID NO.56).

MEICPAVKRDVDLFLTGTPDEYVEQVAQYKALPVLLENARILKNCVDAK
MTEEDKENALSVLDKIYTSPLCGGGGSGGGGSGGGGSKMAETCPIFYDVFFAV
ANGNELLLDLSLTKVDATEPERTAMKKIQDCYVENGLISRVL DGLVMTTISSSKD
CMGEAVQNTVEDLKLNTLGRGGC (SEQ ID NO.56)

Trình tự hexa-histidin cho phép tinh chế bằng phương pháp sắc ký ái lực chelat hóa kim loại và trình tự đầu C chứa GGC hoặc GGCG (SEQ ID NO.58) cho phép ghép cặp protein dung hợp Fel d1 với CMV-Ntt830 và CMV-Npadr.

Ví dụ 15

Biểu hiện và tinh chế protein dung hợp Fel d 1

Sự biểu hiện của protein dung hợp Fel d1 ở *E.coli*: Các vật truyền biểu hiện Fel d1 là pET42-F12H6GGC và pET42-F12GGC được biến nạp vào tế bào *E. coli* C2566 (New England Biolabs, Ipswich, USA). Các dòng vô tính biểu hiện nồng độ protein đích

cao nhất được chọn và được sử dụng trong các thử nghiệm khác. Sự biểu hiện của các protein dung hợp Fel d1 tái tổ hợp khác nhau được thực hiện theo cách sau đây. Môi trường nuôi cấy của plasmid biểu hiện nuôi dưỡng *E. coli* được sinh trưởng trong môi trường 2xTY chứa kanamycin (25mg/L) trên thiết bị lắc kiểu xoay (200 vòng/phút; Infors, Bottmingen, Switzerland) ở nhiệt độ 30°C đến OD600 nằm trong khoảng từ 0,8 đến 1,0. Sự biểu hiện của các gen của protein dung hợp Fel d1 sau đó được cảm ứng bằng cách bổ sung IPTG 0,2mM. Môi trường này được bổ sung MgCl₂ 5mM. Tiếp tục ủ trên thiết bị lắc kiểu xoay ở nhiệt độ 20°C trong 18 giờ. Thu hoạch sinh khối tạo thành bằng cách ly tâm tốc độ thấp và làm đông lạnh ở nhiệt độ -20°C cho đến khi tinh chế.

Tinh chế protein dung hợp Fel d1 đích hexa-histidin: Để tinh chế protein dung hợp F12H6GGC, kit USB PrepEase (Affymetrix, High Wycombe, UK) được sử dụng theo các hướng dẫn của nhà sản xuất. Sau khi làm tan băng, tế bào *E. coli* từ 100ml môi trường nuôi cấy (khoảng 0,75g) được tạo hỗn dịch trong 1 x LEW dung dịch đệm chứa DTT 5mM và tiếp theo bị phá vỡ bằng cách siêu âm. Các protein không hoà tan và mảnh vỡ tế bào được loại bỏ bằng ly tâm (13.000 vòng/phút, 30 phút ở nhiệt độ 5°C). Dịch tan đã làm sạch được phủ cho cột Ni-IDA, rửa hai lần bằng cùng dung dịch đệm (không có DTT) và rửa giải bằng 2 x 1,5ml imidazol chứa 1 x E dung dịch đệm. Các phân đoạn chứa Fel d1 được xác định bằng phương pháp SDS/PAGE (Fig.11A) và thẩm tách hai lần đối với 200 thể tích dung dịch đệm (natri phosphat 20mM, EDTA 2mM, độ pH=7,0). Sau khi thẩm tách, nồng độ protein được đánh giá bằng cách sử dụng huỳnh quang kế QuBit theo các hướng dẫn của nhà sản xuất (Invitrogen, Eugene, USA) hoặc bằng phép đo phổ quang kế tia tử ngoại ở bước sóng 280nm. Việc xác định protein tinh chế được xác nhận bằng phép phân tích phổ quang khối lượng (Fig.11B) và phương pháp thẩm tách phương Tây bằng cách sử dụng các kháng thể kháng đuôi His (Novagen, Cat.No. 71840-3; số liệu không được thể hiện trên hình vẽ).

Tinh chế protein dung hợp Fel d1 mà không cần phải có hexa-đuôi histidin: Để tinh chế protein dung hợp F12GGC, phương pháp trao đổi anion và sắc ký tương tác kỵ nước được sử dụng. 3 g IPTG cảm ứng *E. coli* bị phá vỡ bằng cách siêu âm trong 20ml dung dịch đệm phân giải tế bào LB (Tris 20mM /HCl độ pH=8,0, NaCl 50mM, DTT 5mM). Sau khi siêu âm, ly tâm dung dịch trong 15 phút ở tốc độ 15000g và thu hoạch dịch nổi bề mặt. Cho thêm amoni sulfat kèm khuấy đều cho đến khi đạt được dung dịch

bảo hoà 30%, tiếp theo ủ trong 5 phút ở nhiệt độ phòng. Sau khi ly tâm, cho thêm amoni sulfat dạng rắn vào dịch nổi bề mặt thu được cho đến khi dung dịch bão hoà 50%. Sau khi ly tâm, thu gom hạt protein và hoà tan trong 2ml LB và muối dư được loại bỏ bằng cột khử muối 5ml HiTrapTM (GE Healthcare Life Sciences) được cân bằng bằng LB. Nạp dung dịch rửa giải chứa protein đã khử muối lên cột 1ml HiTrapTMCaptoTM DEAE được làm cân bằng với LB. Rửa giải F12GGC gắn kết bằng gradien gia tăng của NaCl. Thu gom và kết hợp các phân đoạn chứa protein dung hợp Fel d1. Pha loãng dung dịch thu được bằng 4 lần thể tích Tris 20mM/HCl độ pH=8,0, DTT 5mM và nạp lên cột MonoQ 5/50 GL trong LB và rửa giải bằng NaCl gradien gia tăng. Thu gom và kết hợp các phân đoạn chứa protein dung hợp Fel d1. Cho thêm 5M NaCl vào cho đến khi đạt được nồng độ 2,5M và cho thêm DTT vào dung dịch này để duy trì nồng độ 5mM. Sau đó, nạp dung dịch chứa Fel d1 lên cột 1ml HiTrapTM Butyl HP trong NaCl 2,5M, DTT 5mM và rửa giải bằng nồng độ NaCl giảm liên tục. Thu hoạch và kết hợp các phân đoạn chứa protein dung hợp Fel d1. Toàn bộ các bước tinh chế được theo dõi bằng gel SDS/PAGE nhuộm Coomassie (Fig.11C). Việc khẳng định protein tinh chế bằng phương pháp thẩm tách Tây bằng cách sử dụng các kháng thể đa dòng tăng lên dựa theo Fel d1 tái tổ hợp (các dữ liệu không được thể hiện trên hình vẽ).

Ví dụ 16

Xác thực (các) protein dung hợp Fel d1 tái tổ hợp

Các protein dung hợp Fel d1 cũng được nhận biết bằng các kháng thể đơn dòng đặc hiệu Fel d1: Sự gắn kết của protein dung hợp Fel d1 F12H6GGC và Fel d1 tự nhiên (nFel d1) với các kháng thể đơn dòng đặc hiệu Fel d1 (mAb) được so sánh bằng cách sử dụng kit ELISA Fel d1 ELISA kiểu bánh kẹp (6F9/3E4) từ công ty Indoor biotechnologies (Cardiff, UK). Nhằm mục đích này, phủ đĩa Nunc ELISA bằng mAb 6F9 kháng Fel d1 (ở 1microg/mL) ở nhiệt độ 4°C qua đêm. Rửa các đĩa bằng PBS chứa 0,05% Tween 20 (PBST) và phong bế bằng Superblock (Invitrogen) trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng (RT). Fel d1 tự nhiên cũng như F12H6GGC (1µg/mL) được pha loãng theo bậc với tỷ lệ 1:3 và ủ trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng. Rửa đĩa bằng PBST và cho thêm mAb kháng Fel d1 được biotinyl hoá 3E4 (ở 1µg/mL) vào và ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Việc phát hiện Streptavidin được sử dụng tiếp hợp với peroxidaza của cây cải ngựa (HRPO). Nhằm mục đích này, rửa các đĩa bằng PBST sau đó là Streptavidin-Peroxidase

(Sigma, dung dịch pha loãng theo tỷ lệ 1:1000) được bổ sung vào đĩa trong 30 phút ở nhiệt độ phòng. Việc phát hiện được thực hiện với dung dịch cơ chất OPD và H_2SO_4 5% làm dung dịch ngừng phản ứng. Xác định năng suất hấp thụ bằng cách sử dụng đầu đọc ELISA (BioRad) ở 450nm.

Fel d1 tự nhiên và F12H6GGC có độ chuẩn tương tự trong ELISA chứng minh chúng cũng được nhận biết bằng các mAb đặc hiệu Fel d1, do đó xác nhận việc xác thực Fel d1 F12H6GGC tái tổ hợp (Fig.12).

Các protein dung hợp Fel d1 tái tổ hợp hoạt hoá bạch cầu ưa kiềm trong máu toàn phần của bệnh nhân dị ứng với mèo: Máu của bệnh nhân dị ứng với mèo chứa bạch cầu ưa kiềm mang các kháng thể IgE đặc hiệu với Fel d1 trên bề mặt của chúng, khi tiếp xúc với dị nguyên tạo liên kết chéo $Fc\epsilon RI$ và gây ra sự mất hạt. Để kiểm tra khả năng của Fel d1 tái tổ hợp gây ra sự mất hạt, máu toàn phần từ bệnh nhân dị ứng với Fel d1 được lấy và sử dụng kết hợp với protein dung hợp Fel d1 tái tổ hợp F12H6GGC trong kit thử nghiệm sự hoạt hoá bạch cầu ưa kiềm của phòng thí nghiệm Bühlmann (Flow Cast®, FK CCR). Thử nghiệm này xác định mức điều hòa tăng của chất chỉ thị gây mất hạt riêng CD63 đối với bạch cầu ưa kiềm CCR3+. Tóm lại, trộn 100 μ L dung dịch đệm kích thích với 50 μ L máu toàn phần được xử lý EDTA. Ngoài ra, cho thêm 50 μ L dung dịch pha loãng khác nhau chứa Fel d1 tự nhiên hoặc protein dung hợp Fel d1 tái tổ hợp F12H6GGC vào. Các dung dịch đối chứng dương bao gồm mAb kháng $Fc\epsilon RI$ cũng như chất hoạt hoá tế bào không đặc hiệu (fMLP) cũng được thử nghiệm trong thử nghiệm này. Cho thêm chất nhuộm (20 μ L/mẫu), chứa Ab kháng CCR3 được đánh dấu đối với PE và Ab kháng CD63 được đánh dấu đối với FITC vào và ủ ở nhiệt độ 37°C trong 25 phút. Tiếp theo, hồng cầu được làm tan bằng cách cho thêm dung dịch đệm phân giải. Sau khi ủ 10 phút, ly tâm các mẫu ở tốc độ 500 x g trong 5 phút và rửa bằng dung dịch đệm rửa (PBS chứa FCS 2%). Sau bước ly tâm thứ hai, tạo hỗn dịch viên vón tế bào trong 200 μ L dung dịch đệm rửa và thu được bằng cách sử dụng máy đếm tế bào dòng chảy (FACS Calibur). Phân tích các mẫu bằng chương trình phần mềm Cell Quest Pro. Tỷ lệ phần trăm mức độ biểu hiện CD63 trên bạch cầu ưa kiềm CCR3+ được phân tích.

Các protein dung hợp Fel d1 tái tổ hợp được phát hiện để khơi mào quá trình làm mất hạt một cách nhanh chóng của bạch cầu ưa kiềm từ bệnh nhân dị ứng với mèo. Ngoài ra, so với Fel d1 tự nhiên, mức độ mất hạt tương tự đạt được theo cách này chứng minh

việc xác thực của các protein dung hợp Fel d1 được tạo ra bằng phương pháp tái tổ hợp. (Fig.13A/Fig.13B).

Ví dụ 17

Ghép cặp protein dung hợp Fel d1 với CMV-Ntt830 và CMV-VLP

Protein dung hợp Fel d1 F12H6GGC được liên kết cộng hoá trị với VLP của CMV-Ntt830 và CMV-Npadr bằng cách sử dụng gốc liên kết chéo hoá học có hai chức khác loại $\text{suxinimidyl-6-}[(\beta\text{-maleimidopropionamido})\text{ hexanoat}]$ (SMPH) theo cách sau.

Các hạt tương tự virus CMV-Ntt830 và CMV-Npadr được bảo quản trong Na-borat 5mM, dung dịch đệm EDTA 2mM, độ pH=9,0, được trao đổi dung dịch đệm với Na-phosphat 20mM chứa sucroza 30% và EDTA 2mM bằng cách sử dụng cột PD10 (GE Healthcare). Dung dịch chứa VLP của CMV-Npadr hoặc CMV-Ntt830 được cho phản ứng trong 60 phút ở nhiệt độ phòng với lượng mol dư 7,5 lần của gốc liên kết chéo có hai chức khác loại SMPH. SMPH không phản ứng được loại bỏ bằng các cột PD10 trong Na-phosphat 20mM chứa 30% sucroza và EDTA 2mM.

Protein dung hợp Fel d1 F12H6GGC được xử lý bằng lượng mol dư 10 lần TCEP (Thermo Fisher). Các CMV-Ntt830 và CMV-Npadr-VLP đã tạo dẫn xuất được cho phản ứng với lượng mol dư 1 lần hoặc 2 lần của protein dung hợp Fel d1 F12H6GGC tái tổ hợp trong 3 giờ ở nhiệt độ 23°C. Phân tích phản ứng ghép cặp bằng cách khử SDS-PAGE (NuPAGE® 4-12% Bis-Tris gel) được nhuộm bằng chất nhuộm xanh Coomassie. Các dải protein có khối lượng khoảng 44,5kDa và 69kDa là rõ rệt sau phản ứng tiếp hợp hoá học (số liệu không được thể hiện trên hình vẽ). Các dải này tương ứng với protein vỏ của CMV (24,5kDa) được liên kết cộng hoá trị với protein dung hợp Fel d1 F12H6GGC (20kDa) và hai phân tử protein vỏ của CMV được liên kết cộng hoá trị với (49kDa) của một protein dung hợp Fel d1 F12H6GGC lần lượt thể hiện sự hình thành của các Fel d1-VLP của CMV.

Ví dụ 18

Đáp ứng miễn dịch đối với Fel d1-VLP của CMV ở chuột

Các nhóm gồm ba chuột cái Balb/c được gây miễn dịch bằng Fel d1-CMV-Ntt830-VLP, được tạo ra như được mô tả trong Ví dụ 10 hoặc CMV-Ntt830-VLP được

trộn đơn giản với protein dung hợp Fel d1 F12H6GGC. Cả hai chế phẩm chứa cùng lượng protein dung hợp Fel d1. 10 μ g của mỗi chế phẩm được tạo ra trong PBS 150mM, độ pH=7,4 và được tiêm với thể tích 150 μ L qua đường trong tĩnh mạch vào ngày 0 và ngày 14. Lấy máu chuột vào các ngày 0 (trước khi gây miễn dịch), ngày 14 và ngày 21 và phân tích huyết thanh bằng phương pháp ELISA đối với các kháng thể IgG đặc hiệu Fel d1 tự nhiên.

Phủ các đĩa NUNC ELISA bằng Fel d1 tự nhiên (Indoor Biotechnologies) trong PBS với nồng độ 1 μ g/mL qua đêm ở nhiệt độ 4°C. Phong bế đĩa bằng Superblock (Invitrogen). Việc pha loãng huyết thanh theo bậc được thực hiện để phát hiện OD50. OD50 mô tả số đảo của sự pha loãng đạt được một nửa trị số OD tối đa. Các kháng thể IgG đặc hiệu đối với Fel d1 được phát hiện bằng kháng thể IgG kháng chuột được đánh dấu trực tiếp đối với peroxidaza của cây cải ngựa (HRPO) (Jackson). Sự chuyển hoá o-phenyldiamin dihydroclorua (OPD) bởi HRPO được xác định theo phản ứng tạo màu ở bước sóng 450nm, được dừng bằng cách bổ sung axit sulfuric 5% (H₂SO₄) sau thời gian ủ 7 phút.

Chỉ sau khi gây miễn dịch đơn lẻ, các kháng thể IgG đặc hiệu Fel d1 được phát hiện ở chuột (vào ngày 14). Sự đáp ứng được tăng cường bằng lần tiêm thứ hai. Fel d1-VLP của CMV tăng cường đáng kể sự tạo ra các kháng thể IgG đặc hiệu Fel d1 so với các chế phẩm hỗn hợp chứng minh tác dụng làm gia miễn dịch của thể tiếp hợp hoá học của các protein dung hợp Fel d1 với VLP (Fig.14).

Ví dụ 19

Ghép cặp IL-1 β của người với CMV-Ntt830 và CMV-VLP

Protein hoàn chỉnh IL-1 β của người (SEQ ID NO.60) được liên kết cộng hoá trị với VLP của CMV-Ntt830 và CMV-Npadr bằng cách sử dụng gốc liên kết chéo hoá học có hai chức khác loại suxinimidyl-6-[(β -maleimidopropionamido) hexanoat] (SMPH) theo cách sau.

Hạt tương tự virus của CMV-Ntt830 và CMV-Npadr được bảo quản trong Na-borat 5mM, dung dịch đệm EDTA 2mM, độ pH=9,0, được trao đổi dung dịch đệm với Na-phosphat 20mM chứa sucroza 30% và EDTA 2mM bằng cách sử dụng cột PD10 (GE Healthcare) A chứa VLP của CMV-Npadr hoặc CMV-Ntt830 được cho phản ứng trong

60 phút ở nhiệt độ phòng với lượng mol dư 7,5 lần của gốc liên kết chéo có hai chức khác loại SMPH. SMPH không phản ứng được loại bỏ bằng cột PD10 trong Na-phosphat 20mM chứa sucroza 30% và EDTA 2mM.

Xử lý protein IL-1 β bằng lượng mol dư TCEP 5 lần (Thermo Fisher). Cho các CMV-Ntt830 và CMV-Npadr-VLP đã tạo dẫn xuất phản ứng với lượng mol dư IL1 β của người 1 lần hoặc 2 lần trong 3 giờ ở nhiệt độ 23°C. Phân tích phản ứng ghép cặp bằng cách khử SDS-PAGE (NuPAGE® 4 - 12% Bis-Tris gel) được nhuộm bằng chất nhuộm xanh Coomassie. Các dải protein có khối lượng khoảng 41,5kDa và 66kDa là rõ ràng sau phản ứng tiếp hợp hoá học (số liệu không được thể hiện trên hình vẽ). Các dải này tương ứng với protein vỏ của CMV (24,5kDa) được liên kết cộng hoá trị với protein IL1 β (17kDa) và hai phân tử protein vỏ của CMV (49kDa) lần lượt được liên kết cộng hoá trị tương ứng với một protein IL1 β cho thấy sự tạo ra các IL1 β -VLP của CMV.

Ví dụ 20

Ghép cặp IL-5 của chó với CMV-Ntt830 và gây đáp ứng miễn dịch

IL-5 của chó (cIL-5) (SEQ ID NO.61) được cải biến để chứa Cys tự do được biểu hiện theo cách tương tự như được mô tả đối với IL-5 của chuột trong tài liệu: Zou Y, et al., Vaccine 28 (2010) 3192-3200. Việc ghép cặp của cIL-5 được cải biến với VLP CMV-Ntt830 được thực hiện như sau. Để được ghép cặp với cIL-5, trước tiên VLP CMV-Ntt830 được tạo dẫn xuất với lượng dư gấp 30 lần gốc liên kết hoá học có hai chức khác loại, *suxinimidyl-6-(β -maleimidopropionamido)hexanoat* (SMPH). SMPH không gắn kết được loại bỏ bằng cách thẩm tách dựa vào PBS. cIL-5 được khử trong 1 giờ bằng lượng đẳng mol của *tri(2-carboxyetyl)phosphin hydroclorua* (TCEP) trong PBS (độ pH=8,0). Ủ cIL-5 đã khử (80 μ M) trong 4 giờ ở nhiệt độ 22°C với 40 μ M CMV-Ntt830 tạo dẫn xuất SMPH. Hỗn hợp phản ứng được thẩm tách trong 12 giờ dựa vào PBS, độ pH=8,0.

Gây miễn dịch cho chó bằng cIL-5 được ghép cặp với VLP của CMV-Ntt830

Các nhóm gồm bốn chó cái giao phối xa được gây miễn dịch bằng VLP của CMV-Ntt830 được ghép cặp qua SMPH với cIL-5 như đã mô tả trên đây. 50 μ g chế phẩm được pha loãng trong HEPES 20mM, NaCl 50mM, độ pH=7,3 đến 500 μ L và tiêm dưới da vào ngày 0 và ngày 14. Lấy máu của chó vào các ngày 0 (trước khi gây miễn dịch), ngày 14

và ngày 21 và phân tích huyết thanh bằng cách sử dụng ELISA đặc hiệu cIL-5 và CMV-Ntt830.

ELISA

Phủ các đĩa ELISA bằng cIL-5 ở nồng độ 10µg/mL hoặc CMV-Ntt830 VLP ở nồng độ 2µg/mL. Phong bế các đĩa và sau đó ủ với huyết thanh của chuột được pha loãng theo bậc. Các kháng thể gắn kết được phát hiện bằng IgG kháng chó được đánh dấu bằng enzym. Để làm đối chứng, huyết thanh trước khi gây miễn dịch của chính các chó này cũng được thử nghiệm (các số liệu không được thể hiện trên hình vẽ). Toàn bộ các chó đều tạo ra đáp ứng IgG rõ ràng và mạnh mẽ kháng cIL-5 cũng như CMV-Ntt830.

Ví dụ 21

Ghép cặp IL-4 của chó với CMV-Ntt830 và gây đáp ứng miễn dịch

IL-4 của chó (cIL-4) (SEQ ID NO.62) được cải biến để chứa Cys tự do được biểu hiện theo cách tương tự như đã mô tả đối với IL-5 của chuột trong tài liệu: Zou Y, et al., Vaccine 28 (2010) 3192-3200. Việc ghép cặp của cIL-4 cải biến với VLP CMV-Ntt830 được thực hiện như sau. Để được ghép cặp với cIL-4, trước tiên VLP của CMV-Ntt830 được tạo dẫn xuất với lượng dư 30 lần của gốc liên kết chéo hoá học có hai chức khác loại, *suxinimidyl-6-(β-maleimidopropionamido)hexanoat* (SMPH). SMPH không gắn kết được loại bỏ bằng cách thẩm tách đối với PBS. cIL-4 được khử trong 1 giờ bằng lượng đẳng mol của *tri(2-carboxyethyl)phosphin hydroclorua* (TCEP) trong PBS (độ pH=8,0). cIL-4 đã khử (80µM) được ủ trong 4 giờ ở nhiệt độ 22°C với 40µM CMV-Ntt830 được tạo dẫn xuất SMPH. Thẩm tách hỗn hợp phản ứng trong 12 giờ dựa vào PBS, độ pH=8,0.

Gây miễn dịch cho chó bằng cIL-4 được ghép cặp với VLP của CMV-Ntt830

Các nhóm gồm bốn chó cái giao phối xa được gây miễn dịch bằng VLP CMV-Ntt830 được ghép cặp qua SMPH với cIL-4 như được mô tả trên đây. 50µg chế phẩm được pha loãng trong HEPES 20mM, NaCl 50mM, độ pH=7,3 đến 500µL và tiêm dưới da vào ngày 0 và ngày 14. Lấy máu của chó vào các ngày 0 (trước khi gây miễn dịch), ngày 14 và ngày 21 và phân tích huyết thanh bằng cách sử dụng ELISA đặc hiệu cIL-4 và CMV-Ntt830.

ELISA

Phủ đĩa ELISA bằng cIL-4 ở nồng độ 10µg/mL hoặc VLP CMV-Ntt830 ở nồng độ 2µg/mL. Phong bế đĩa và sau đó ủ với huyết thanh chó được pha loãng theo bậc. Các kháng thể gắn kết được phát hiện bằng IgG kháng chó được đánh dấu bằng enzym. Để làm đối chứng, huyết thanh trước khi gây miễn dịch của chính các chó này cũng được thử nghiệm (số liệu không được thể hiện trên hình vẽ). Toàn bộ các chó đều tạo ra đáp ứng IgG rõ ràng và mạnh mẽ đối với cIL-4 cũng như CMV-Ntt830.

Ví dụ 22

Ghép cặp IL-13 của chó với CMV-Ntt830 và gây đáp ứng miễn dịch

IL-13 của chó (cIL-13) (SEQ ID NO.63) được cải biến để chứa Cys tự do và được biểu hiện theo cách tương tự như đã mô tả đối với IL-5 của chuột trong tài liệu: Zou Y, et al., Vaccine 28 (2010) 3192-3200. Việc ghép cặp của IL-13 cải biến với VLP CMV-Ntt830 được thực hiện như sau. Để được ghép cặp với cIL-13, trước tiên VLP CMV-Ntt830 được tạo dẫn xuất với lượng dư gấp 30 lần gốc liên kết hoá học có hai chức khác loại, suxinimidyl-6-(β-maleimidopropionamido)hexanoat (SMPH). SMPH không gắn kết được loại bỏ bằng cách thẩm tách dựa vào PBS. cIL-13 đã khử trong 1 giờ bằng lượng đẳng mol của tri(2-carboxyetyl)phosphin hydroclorua (TCEP) trong PBS (độ pH=8,0). Ủ cIL-13 đã khử (80µM) trong 4 giờ ở nhiệt độ 22°C với 40µM CMV-Ntt830 được tạo dẫn xuất SMPH. Thẩm tách hỗn hợp phản ứng trong 12 giờ dựa vào PBS, độ pH=8,0.

Gây miễn dịch cho chó bằng cIL-13 được ghép cặp với VLP của CMV-Ntt830

Các nhóm gồm bốn chó cái giao phối xa được gây miễn dịch bằng VLP CMV-Ntt830 được ghép cặp qua SMPH với cIL-13 như được mô tả trên đây. 50µg chế phẩm được pha loãng trong HEPES 20mM, NaCl 50mM, độ pH=7,3 đến 500µL và tiêm dưới da vào ngày 0 và ngày 113. Lấy máu của chó vào các ngày 0 (trước khi gây miễn dịch), ngày 14 và ngày 21 và phân tích huyết thanh bằng cách sử dụng ELISA đặc hiệu cIL-13 và CMV-Ntt830.

ELISA

Phủ đĩa ELISA bằng cIL-13 ở nồng độ 10µg/mL hoặc CMV-Ntt830 VLP ở nồng độ 2µg/mL. Phong bế đĩa và sau đó ủ bằng huyết thanh chó được pha loãng theo bậc. Các kháng thể gắn kết được phát hiện bằng IgG kháng chó được đánh dấu bằng enzym. Để

làm đối chứng, huyết thanh trước khi gây miễn dịch của chính các chó này cũng được thử nghiệm (số liệu không được thể hiện trên hình vẽ). Toàn bộ các chó đều tạo ra đáp ứng IgG rõ ràng và mạnh mẽ kháng cIL-13 cũng như CMV-Ntt830.

Ví dụ 23

Ghép cặp IL-31 của người với CMV-Ntt830 và gây đáp ứng miễn dịch

IL-31 của người (hIL-31) (SEQ ID NO.43) được cải biến để chứa Cys tự do và được biểu hiện theo cách tương tự như được mô tả đối với IL-5 của chuột trong tài liệu: Zou Y, et al., Vaccine 28 (2010) 3192-3200. Việc ghép cặp của hIL-31 cải biến với VLP CMV-Ntt830 được thực hiện như sau. Để được ghép cặp với hIL-31, trước tiên VLP CMV-Ntt830 được tạo dẫn xuất với lượng dư gấp 30 lần gốc liên kết chéo hoá học có hai chức khác loại, *suxinimidyl-6-(β-maleimidopropionamido)hexanoat* (SMPH). SMPH không gắn kết được loại bỏ bằng cách thẩm tách dựa vào PBS. hIL-31 đã khử trong 1 giờ với lượng đẳng mol của *tri(2-carboxyethyl)phosphin hydroclorua* (TCEP) trong PBS (độ pH=8,0). Ủ hIL-31 đã khử (80μM) trong 4 giờ ở nhiệt độ 22°C với 40μM CMV-Ntt830 được tạo dẫn xuất SMPH. Thẩm tách hỗn hợp phản ứng trong 12 giờ dựa vào PBS, độ pH=8,0.

Gây miễn dịch cho chuột bằng hIL-31 được ghép cặp với VLP của CMV-Ntt830: Các nhóm gồm bốn chuột cái BALB/c được gây miễn dịch bằng CMV-Ntt830 VLP được ghép cặp qua SMPH với IL-31 như được mô trên đây. 50μg chế phẩm được pha loãng trong HEPES 20mM, NaCl 50mM, độ pH=7,3 đến 500μL và tiêm dưới da vào ngày 0 và ngày 113. Lấy máu của chó vào các ngày 0 (trước khi gây miễn dịch), ngày 14 và ngày 21 và phân tích huyết thanh bằng cách sử dụng ELISA đặc hiệu hIL-31 và CMV-Ntt830.

ELISA

Phủ đĩa ELISA bằng hIL-31 ở nồng độ 10μg/mL hoặc CMV-Ntt830 VLP ở nồng độ 2μg/mL. Phong bế đĩa và sau đó ủ bằng huyết thanh của chuột được pha loãng theo bậc. Phát hiện các kháng thể gắn kết bằng IgG kháng chuột được đánh dấu bằng enzym. Để làm đối chứng, huyết thanh trước khi gây miễn dịch của chính các chuột này cũng được thử nghiệm (các số liệu không được thể hiện trên hình vẽ). Toàn bộ các chuột đều tạo ra đáp ứng IgG rõ ràng và mạnh mẽ kháng hIL-31 cũng như CMV-Ntt830.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hạt tương tự virus (virus-like particle-VLP) được cải biến của virus thể khảm gây bệnh ở cây dưa chuột (cucumber mosaic virus-CMV), trong đó hạt tương tự virus được cải biến này chứa ít nhất một polypeptit CMV được cải biến, trong đó polypeptit CMV được cải biến này chứa

(a) polypeptit CMV, và

(b) epitop tế bào T hỗ trợ; trong đó epitop tế bào T hỗ trợ này thay thế vùng tận cùng N của polypeptit CMV này, trong đó vùng tận cùng N của polypeptit CMV này tương ứng với các axit amin 2-12 của trình tự SEQ ID NO.1; và

trong đó polypeptit CMV này chứa

(i) trình tự axit amin của protein vỏ của CMV; hoặc

(ii) trình tự axit amin đột biến, trong đó trình tự axit amin cần được đột biến là trình tự axit amin của protein vỏ của CMV, và trong đó trình tự axit amin đột biến và protein vỏ của CMV này có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 90%.

2. Hạt tương tự virus được cải biến theo điểm 1, trong đó polypeptit CMV này chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ:

(a) trình tự axit amin của protein vỏ của CMV, trong đó trình tự axit amin này chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ SEQ ID NO.1, hoặc

(b) trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 90% so với SEQ ID NO.1; và

trong đó trình tự axit amin như được xác định trong mục (a) hoặc (b) của điểm này chứa SEQ ID NO.21; hoặc

trong đó trình tự axit amin như được xác định trong mục (a) hoặc (b) của điểm này chứa vùng trình tự axit amin, trong đó vùng trình tự axit amin này có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 90% so với SEQ ID NO.21.

3. Hạt tương tự virus được cải biến theo điểm 1, trong đó số lượng axit amin của vùng tận cùng N nêu trên được thay thế bằng hoặc ít hơn số lượng axit amin của vùng tận cùng N này được chứa bởi epitop tế bào T hỗ trợ.

4. Hạt tương tự virus được cải biến theo điểm 1, trong đó epitop tế bào T hỗ trợ là epitop tế bào T hỗ trợ toàn phần.
5. Hạt tương tự virus được cải biến theo điểm 1, trong đó epitop tế bào T hỗ trợ cấu thành tối đa từ 20 axit amin.
6. Hạt tương tự virus được cải biến theo điểm 1, trong đó epitop tế bào T hỗ trợ có trình tự PADRE.
7. Hạt tương tự virus được cải biến theo điểm 1, trong đó epitop tế bào T hỗ trợ chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.5.
8. Hạt tương tự virus được cải biến theo điểm 1, trong đó epitop tế bào T hỗ trợ có nguồn gốc từ độc tố uốn ván.
9. Hạt tương tự virus được cải biến theo điểm 1, trong đó epitop tế bào T hỗ trợ chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.4.
10. Hạt tương tự virus được cải biến theo điểm 1, trong đó polypeptit CMV này chứa hoặc tốt hơn nếu cấu thành từ; trình tự axit amin của protein vỏ của CMV, trong đó trình tự axit amin này chứa (a) SEQ ID NO.1 hoặc (b) trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 95% so với SEQ ID NO.1; và trong đó trình tự axit amin (a) hoặc (b) này chứa SEQ ID NO.21.
11. Hạt tương tự virus được cải biến theo điểm 1, trong đó polypeptit CMV được cải biến này chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.6.
12. Hạt tương tự virus được cải biến theo điểm 1, trong đó polypeptit CMV được cải biến này chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.7.
13. Hạt tương tự virus được cải biến theo điểm 1, trong đó epitop tế bào T hỗ trợ được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự như nêu trong SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.5 và SEQ ID NO.26-SEQ ID NO.30.
14. Chế phẩm chứa:
 - (a) hạt tương tự virus được cải biến theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13 và trong đó hạt tương tự virus được cải biến này chứa ít nhất một vị trí liên kết thứ nhất; và

(b) ít nhất một kháng nguyên, trong đó kháng nguyên này chứa ít nhất một vị trí liên kết thứ hai;

trong đó các thành phần (a) và (b) được liên kết thông qua ít nhất một vị trí liên kết thứ nhất và ít nhất một vị trí liên kết thứ hai nêu trên.

15. Chế phẩm theo điểm 14, trong đó vị trí liên kết thứ nhất và vị trí liên kết thứ hai nêu trên được liên kết bằng ít nhất một liên kết peptit cộng hoá trị.

16. Chế phẩm theo điểm 14, trong đó vị trí liên kết thứ nhất và vị trí liên kết thứ hai nêu trên được liên kết bằng ít nhất một liên kết cộng hoá trị không peptit.

17. Chế phẩm theo điểm 14, trong đó chế phẩm này còn chứa ít nhất một chất kích thích miễn dịch, trong đó chất kích thích miễn dịch này được bao gói vào hạt tương tự virut được cải biến, và trong đó chất kích thích miễn dịch này là oligonucleotit chứa CpG không được metyl hóa.

18. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 17, trong đó kháng nguyên nêu trên là kháng nguyên khối u, kháng nguyên tự thân, polypeptit của tác nhân gây bệnh, dị nguyên hoặc hapten.

19. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 17, trong đó kháng nguyên nêu trên là IL-17.

20. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 17, trong đó kháng nguyên này chứa SEQ ID NO.42.

21. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 17, trong đó kháng nguyên nêu trên là IL-5.

22. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 17, trong đó kháng nguyên này chứa SEQ ID NO.41.

23. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 17, trong đó kháng nguyên nêu trên là TNF α .

24. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 17, trong đó kháng nguyên nêu trên là IL-1 α .

25. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 17, trong đó kháng nguyên

nêu trên là IL-13.

26. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 17, trong đó kháng nguyên này chứa SEQ ID NO.46.

27. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 17, trong đó kháng nguyên nêu trên là peptit có nguồn gốc từ A β -1-42.

28. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 17, trong đó kháng nguyên nêu trên là IgE hoặc peptit hoặc vùng được chứa trong IgE.

29. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 17, trong đó kháng nguyên nêu trên là α -synuclein hoặc peptit có nguồn gốc từ α -synuclein.

30. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 17, trong đó peptit này cấu thành từ 6 đến 14 axit amin, và trong đó kháng nguyên này là peptit có nguồn gốc từ α -synuclein được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ D NO.32, SEQ ID NO.33 và SEQ ID NO.34.

31. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 17, trong đó kháng nguyên nêu trên là IL-4.

32. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 17, trong đó kháng nguyên này chứa SEQ ID NO.45.

33. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 17, trong đó kháng nguyên nêu trên là GnRH.

34. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 17, trong đó kháng nguyên nêu trên là eotaxin.

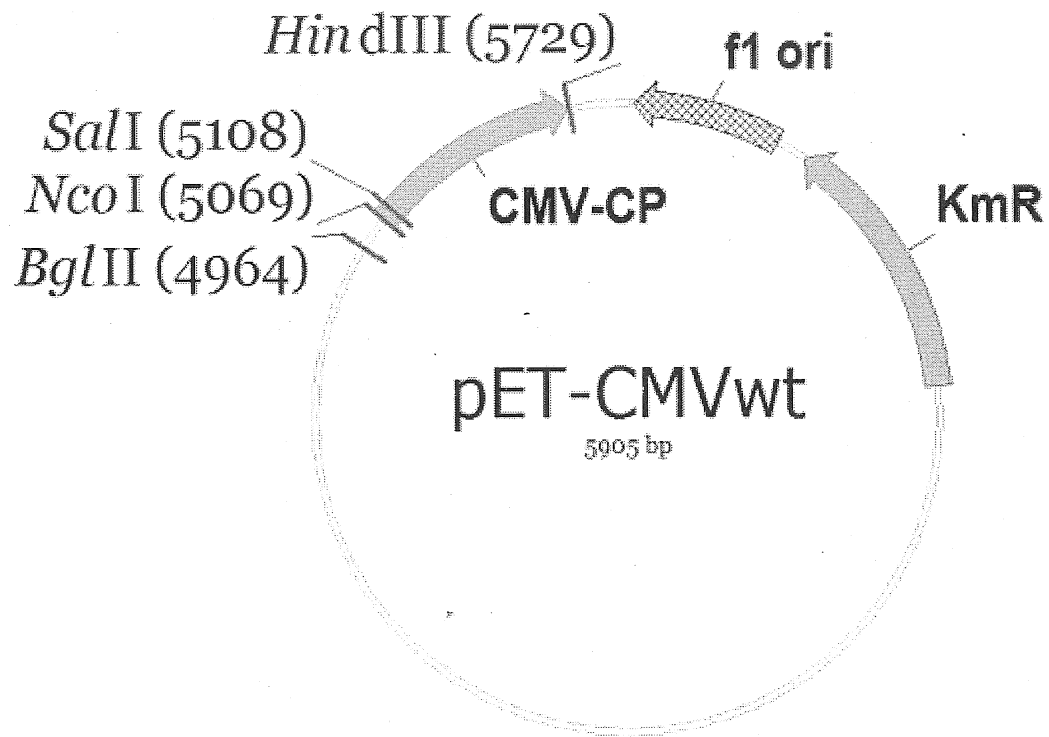
35. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 17, trong đó kháng nguyên nêu trên là vùng ngoại bào của protein M2 của virus cúm A hoặc mảnh kháng nguyên của nó.

36. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 17, trong đó kháng nguyên nêu trên là IL-31.

37. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 17, trong đó kháng nguyên này chứa SEQ ID NO.43 hoặc SEQ ID NO.44.

38. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 17, trong đó kháng nguyên nêu trên có nguồn từ *Plasmodium falciparum* hoặc *Plasmodium Vivax*.
39. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 17, trong đó kháng nguyên nêu trên có nguồn từ virus hợp bào đường hô hấp (RSV).
40. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 17, trong đó kháng nguyên nêu trên là dị nguyên Fel d1 của mèo hoặc Fel d1 tái tổ hợp (rFel d1).
41. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 17, trong đó kháng nguyên nêu trên là Fel d1 tái tổ hợp (rFel d1).
42. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 17, trong đó kháng nguyên nêu trên chứa SEQ ID NO.17 hoặc SEQ ID NO.18.
43. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 17, trong đó kháng nguyên nêu trên chứa SEQ ID NO.18.
44. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 17, trong đó kháng nguyên nêu trên là dị nguyên Can f1 hoặc Can f2 của chó.
45. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 17, trong đó kháng nguyên nêu trên là peptit liên quan đến gen calcitonin (CGRP).
46. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 17, trong đó kháng nguyên nêu trên là amylin.
47. Dược phẩm chứa:

- (a) hạt tương tự virus được cải biến theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13, hoặc chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 46; và
- (b) chất mang, chất pha loãng và/hoặc tá dược được dụng.

**Fig.1**

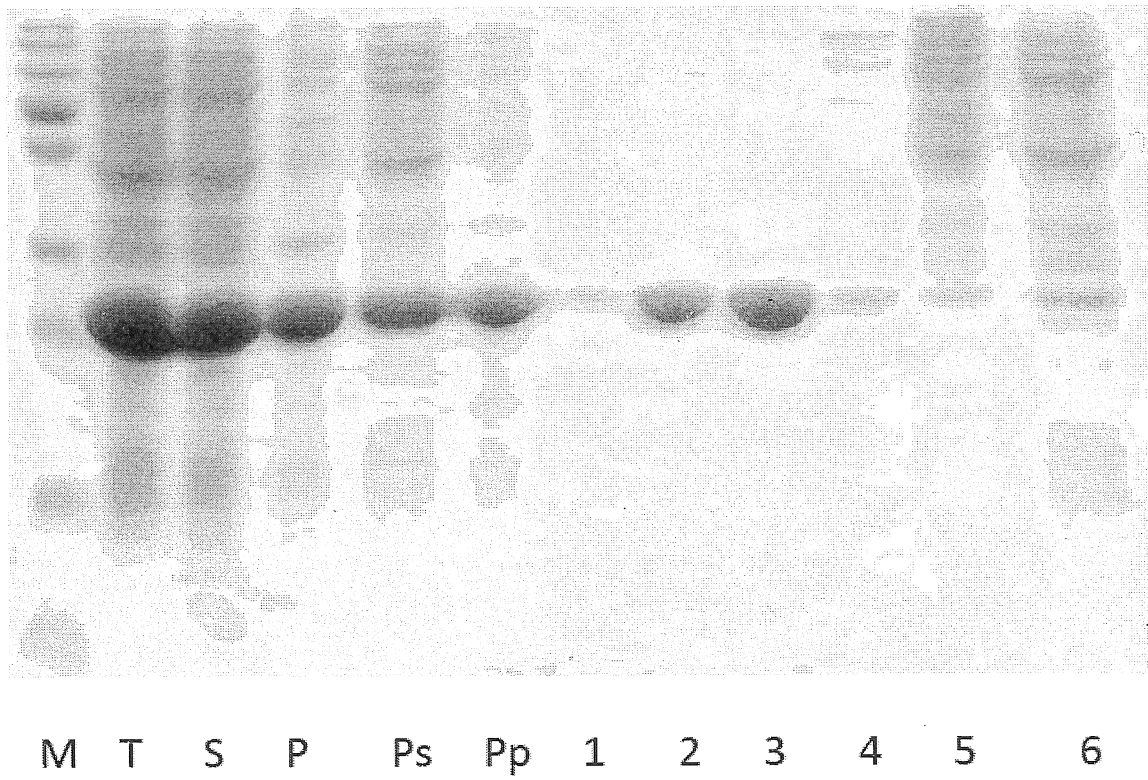


Fig.2

		Kích cỡ (d,nm...	% Thể tích	Chiều rộng (d.n...
Z-Trung bình (d.nm): 80,92	Đỉnh 1:	39,03	95,0	18,97
Pdl: 0,434	Đỉnh 2:	307,8	3,9	117,9
Phân chận: 0,943	Đỉnh 3:	4674	1,2	924,9
Chất lượng kết quả: Tốt				

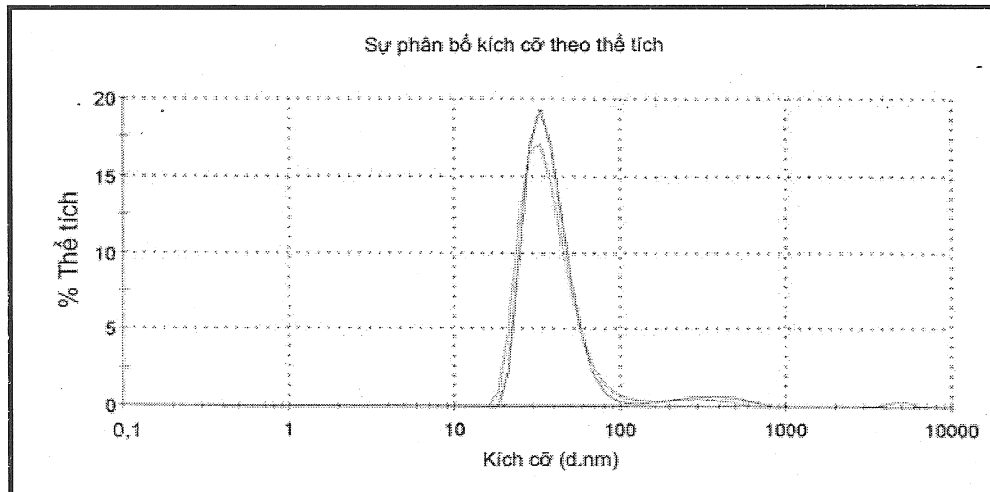


Fig.3A

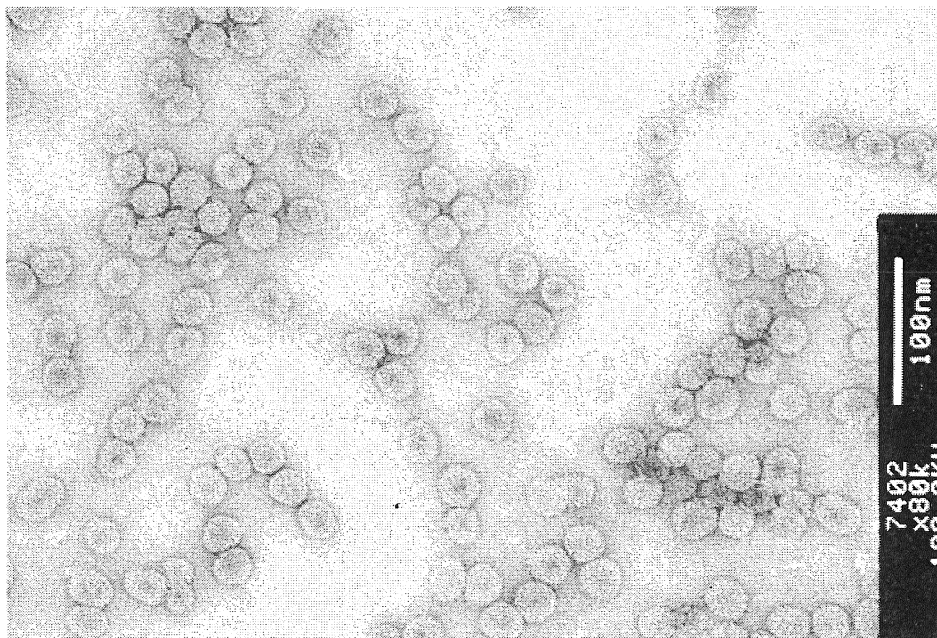
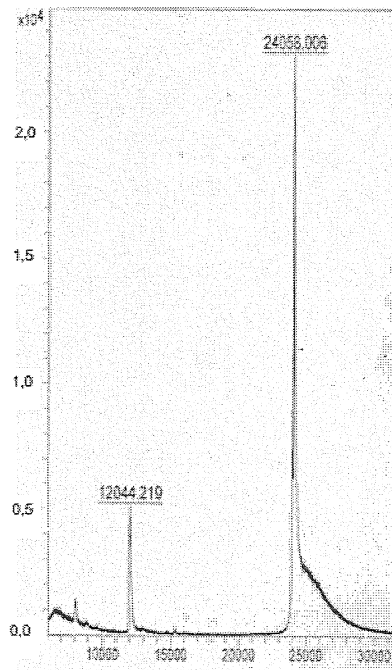
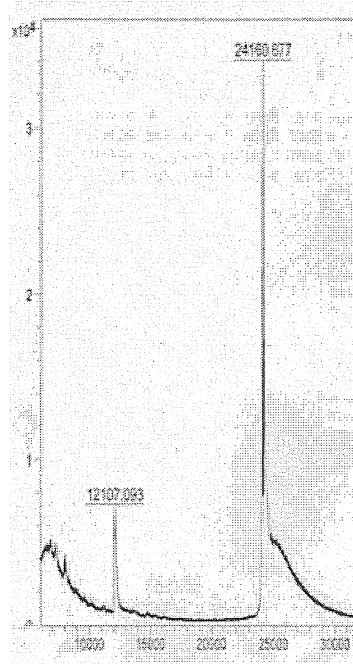
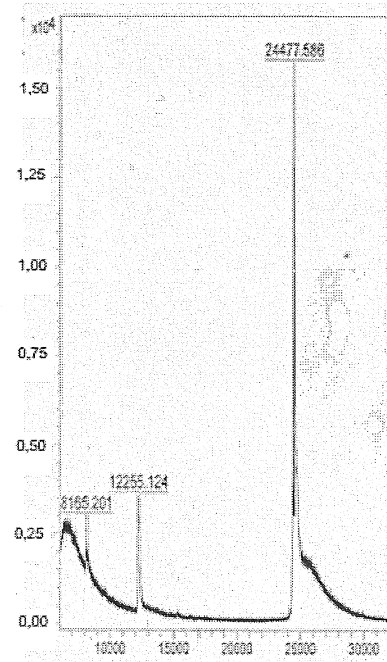


Fig.3B

**Fig.4A****Fig.4B****Fig.4C**

		Kích cỡ (d,nm...	% Thể tích	Chiều rộng (d.n...
Z-Trung bình (d,nm): 64,70	Đỉnh 1:	37,94	100,0	31,19
Pdl: 0,275	Đỉnh 2:	0,000	0,0	0,000
Phản chặn: 0,945	Đỉnh 3:	0,000	0,0	0,000

Chất lượng kết quả: Tốt

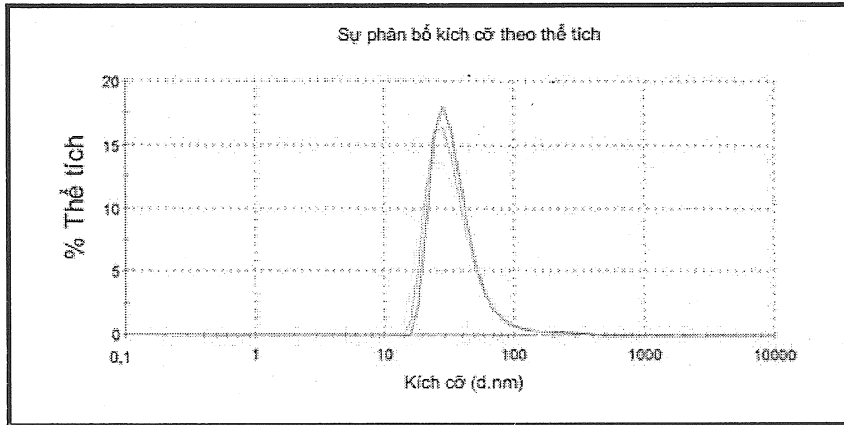


Fig.5A

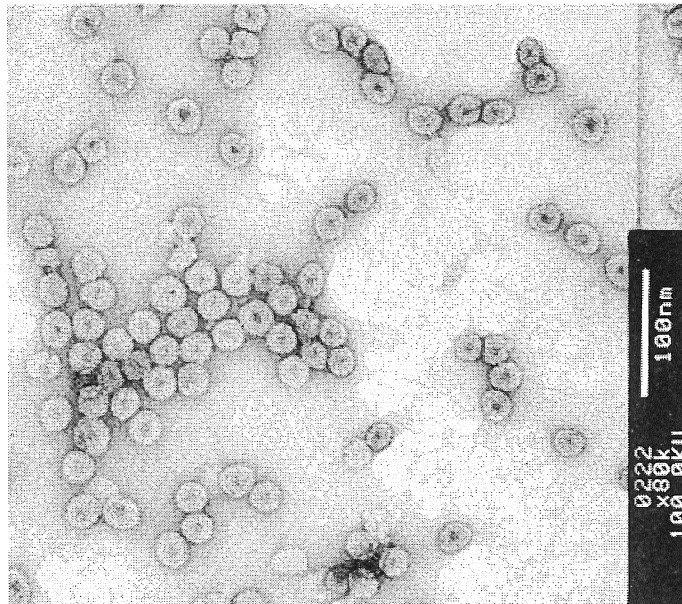


Fig.5B

		Kích cỡ (d.nm...	% Thể tích	Chiều rộng (d.n...
Z-Trung bình (d.nm): 61,86	Đỉnh 1:	45,98	99,5	20,78
Pdl: 0,185	Đỉnh 2:	4448	0,5	992,6
Phần chặn: 0,959	Đỉnh 3:	0,000	0,0	0,000

Chất lượng kết quả: Tốt

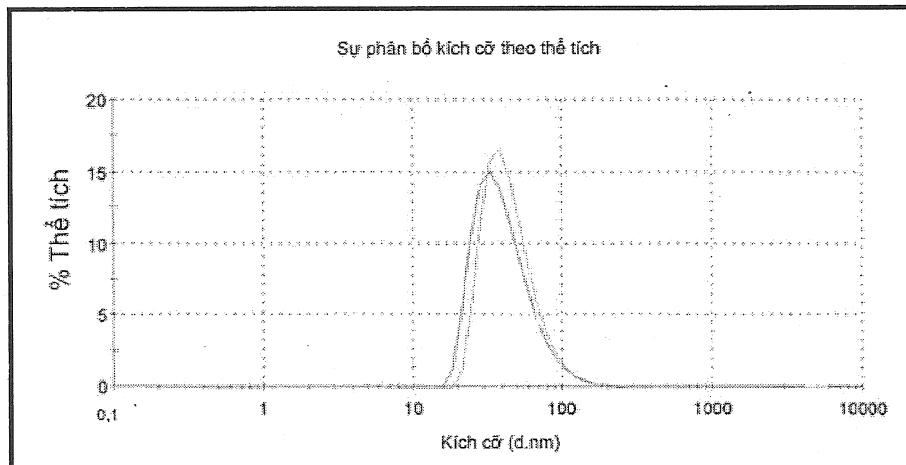


Fig.6A

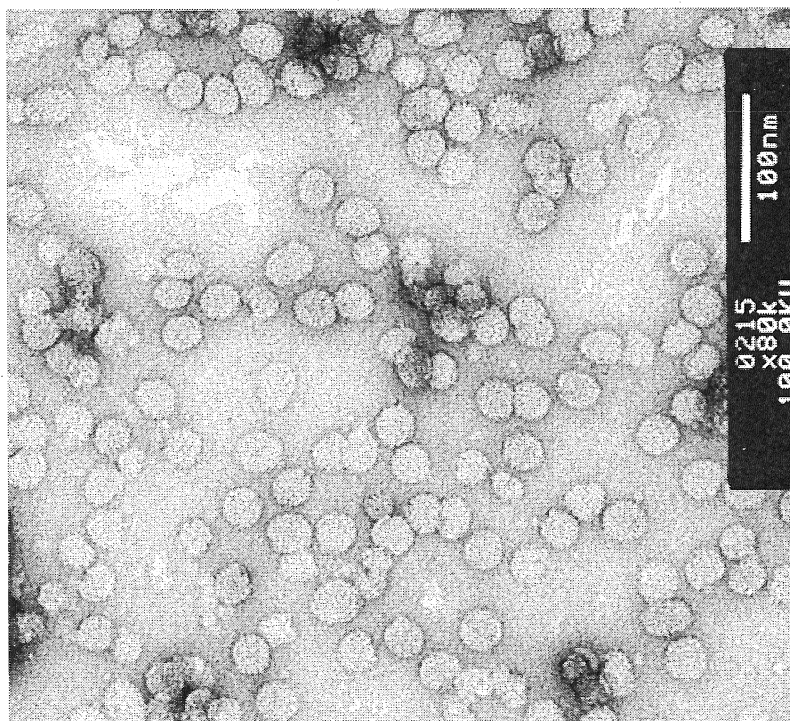
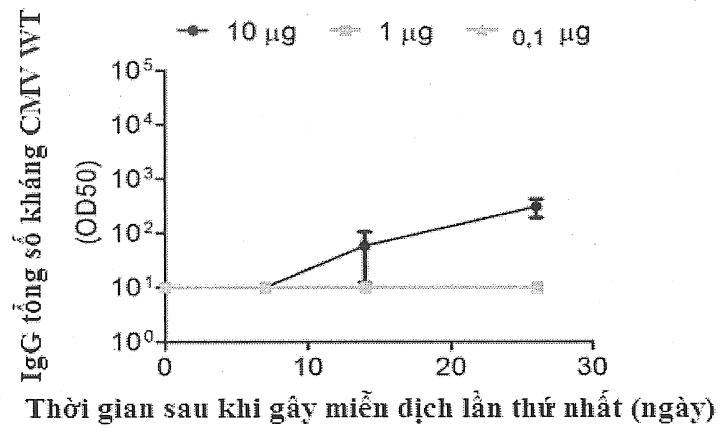
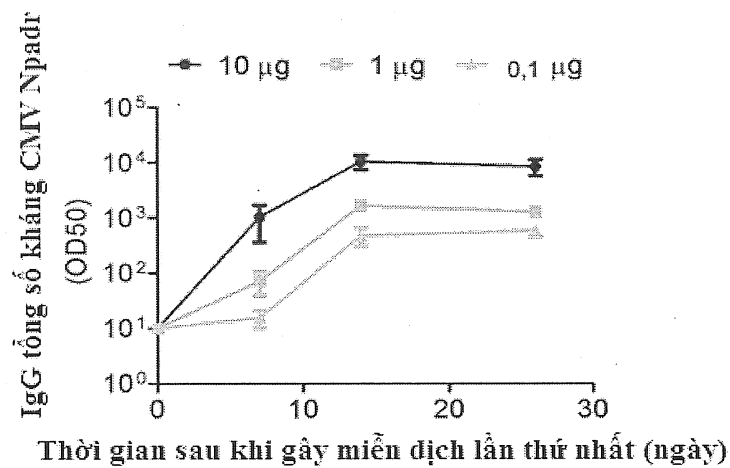
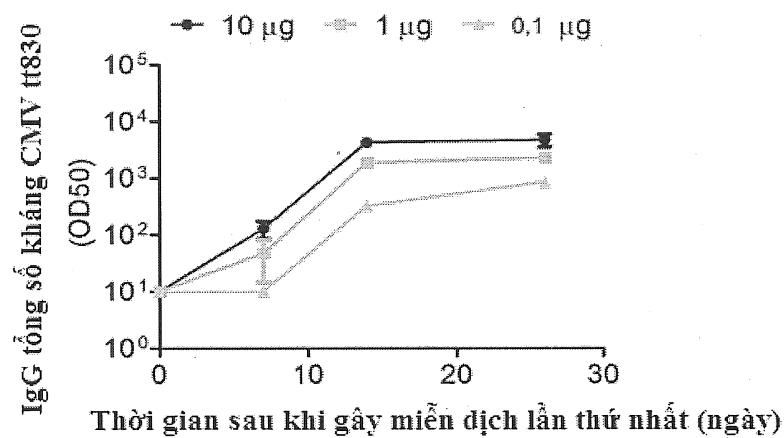
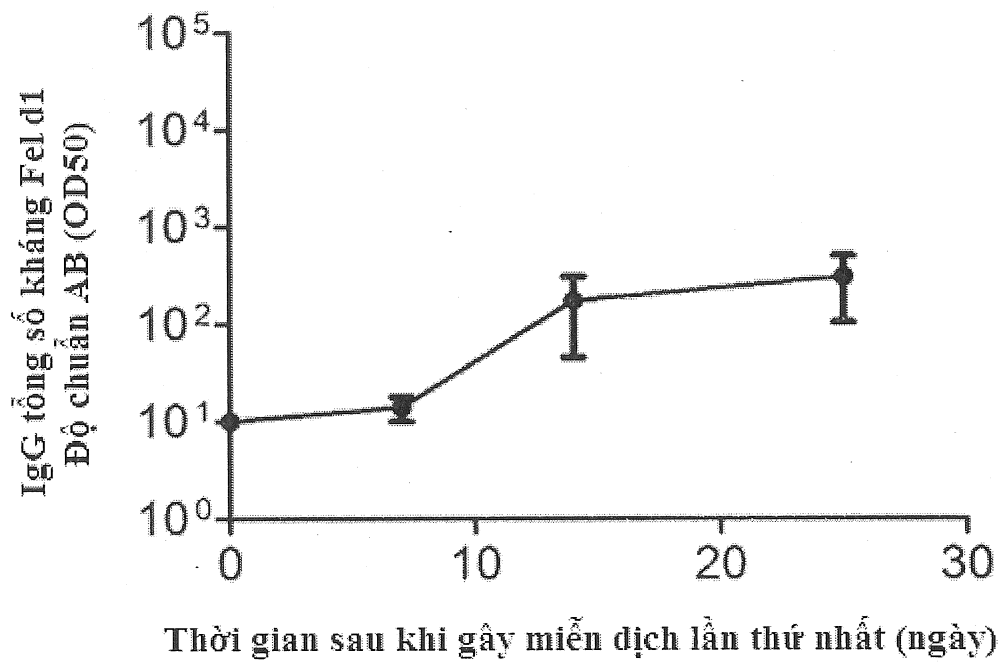
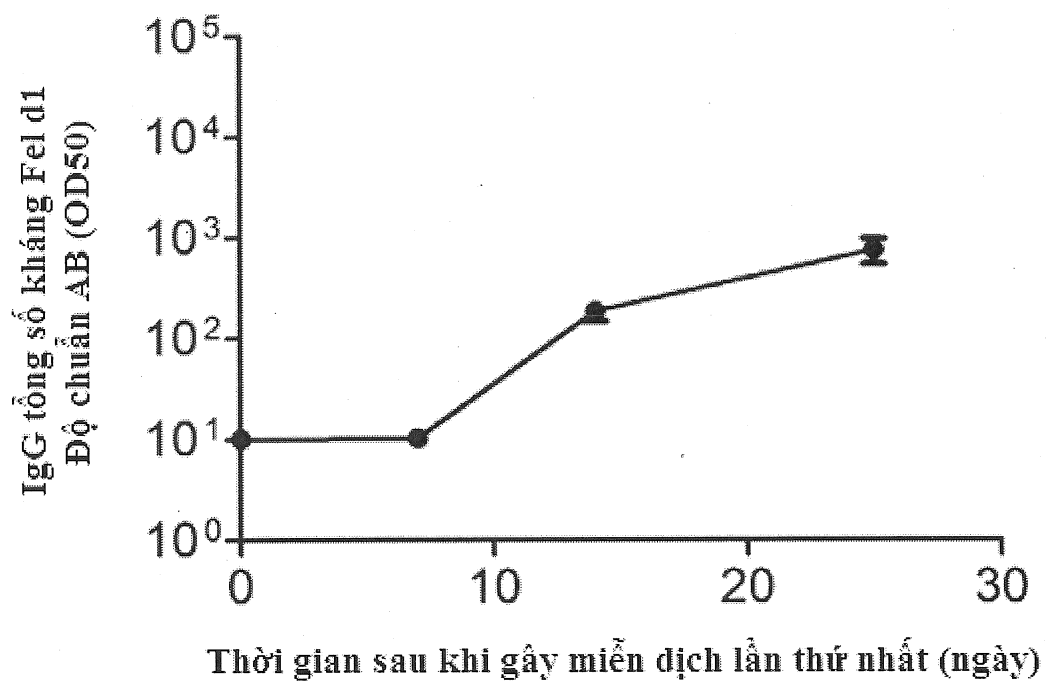


Fig.6B

**Fig.7A****Fig.7B****Fig.7C**

**Fig.8A****Fig.8B**

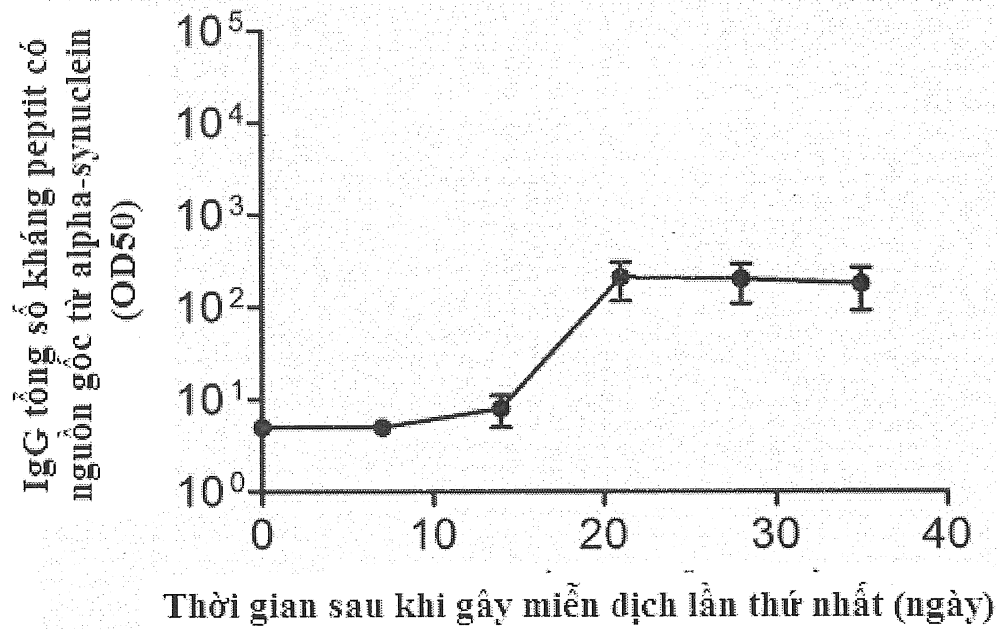


Fig.9

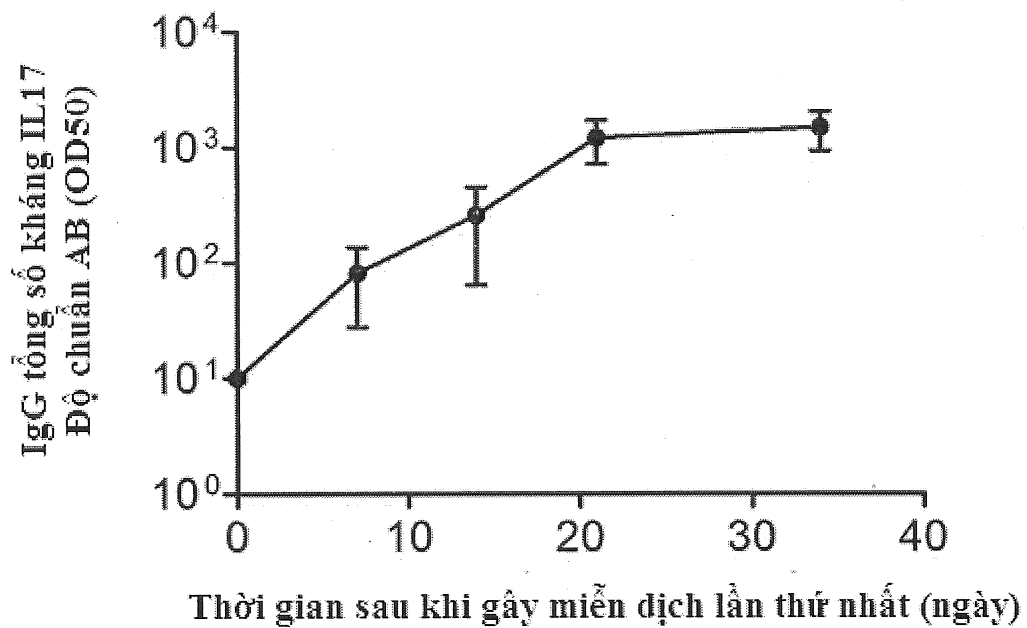
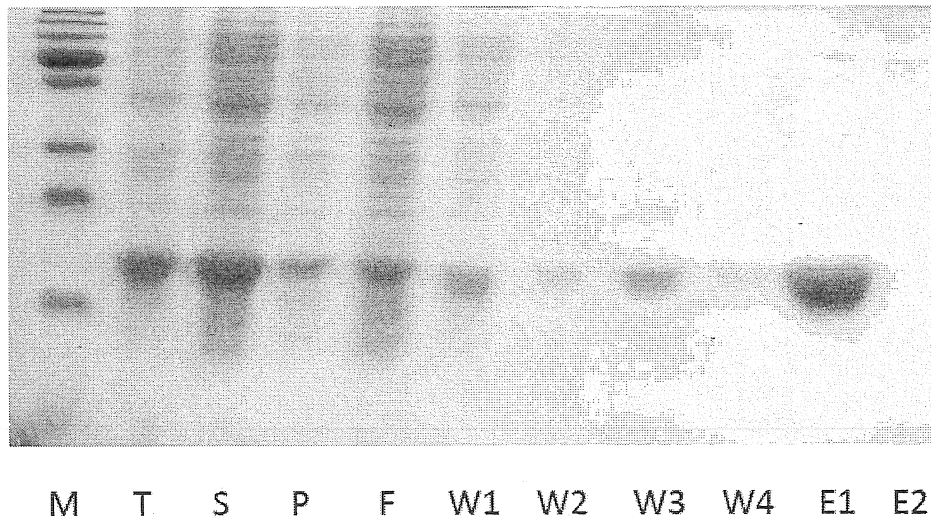
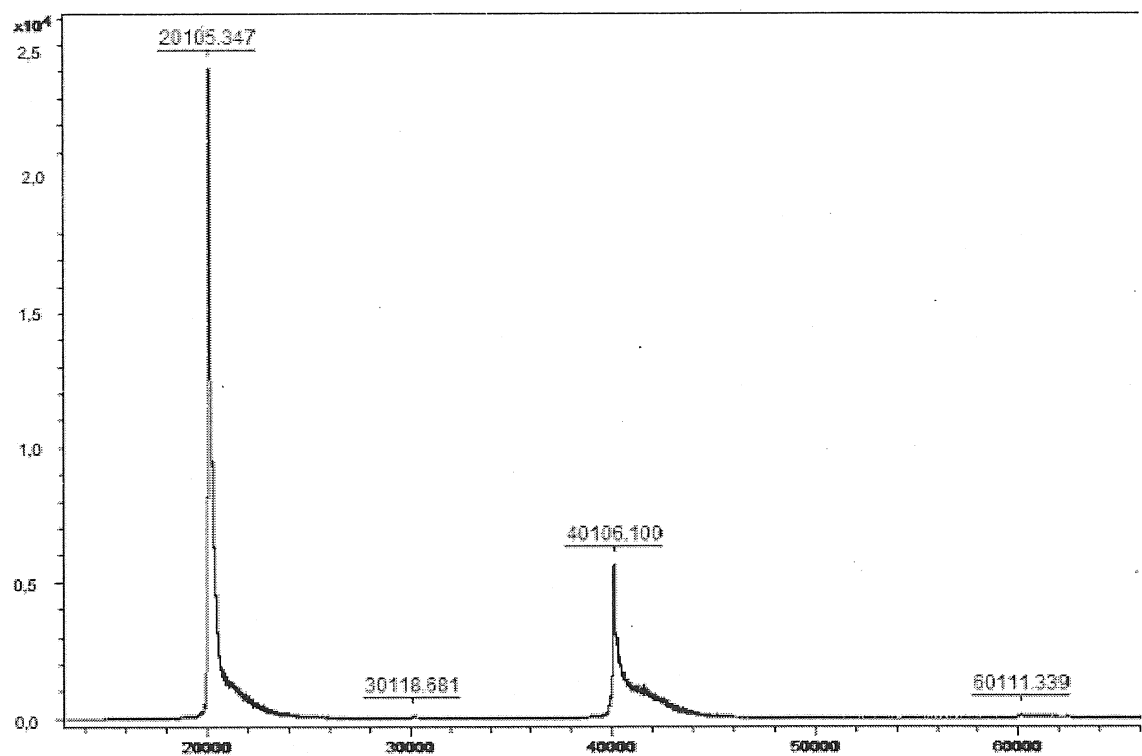


Fig.10

**Fig.11A****Fig.11B**

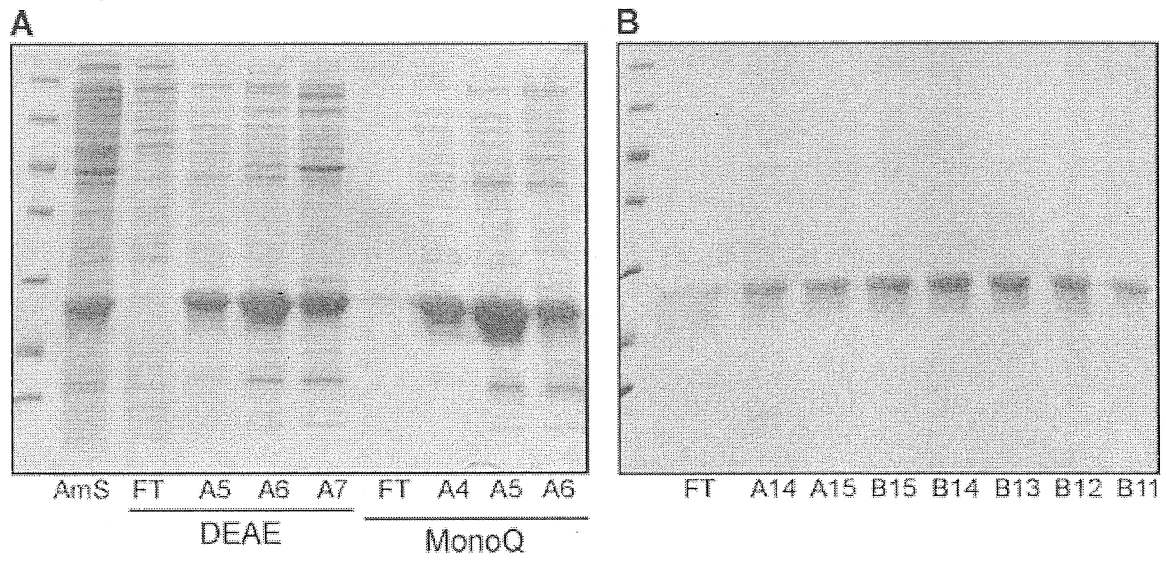
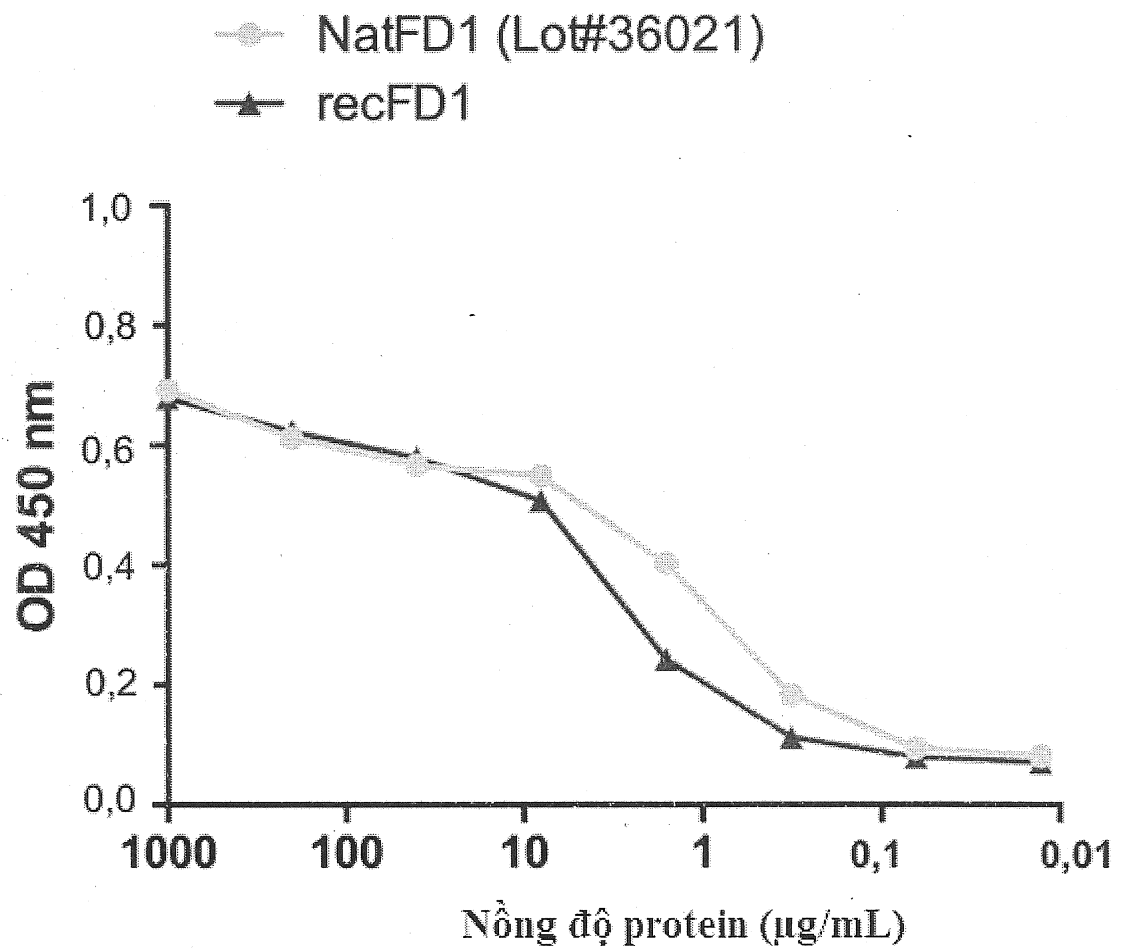
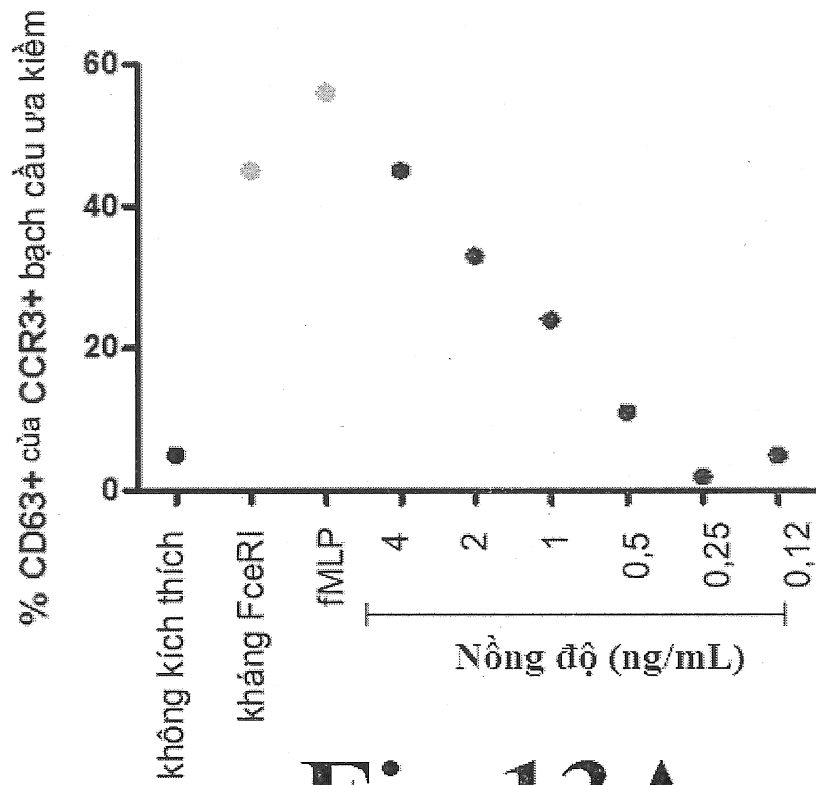
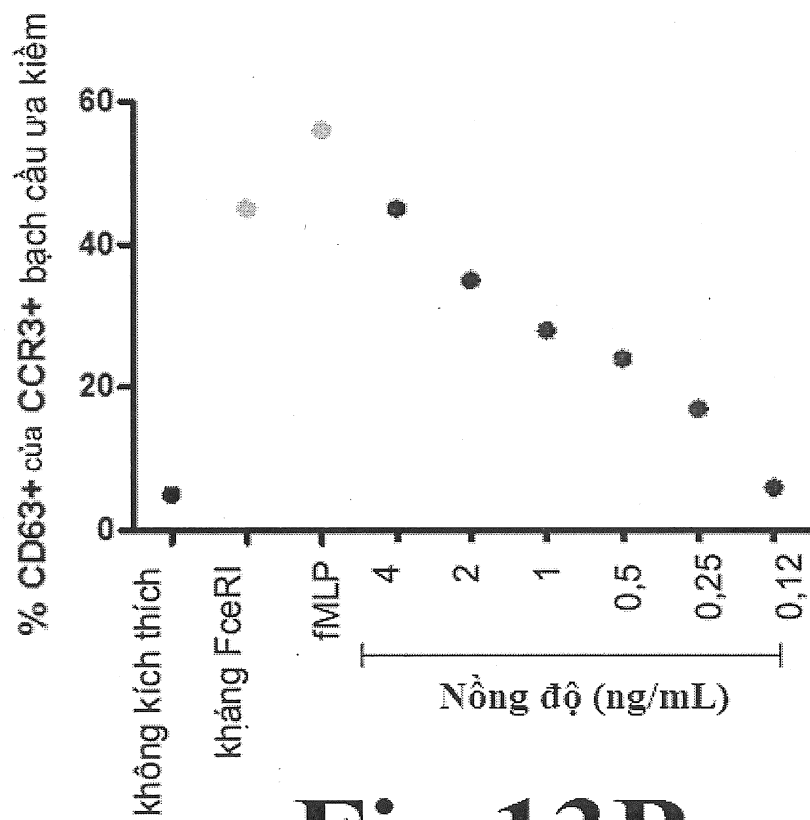


Fig.11C

**Fig.12**

**Fig.13A****Fig.13B**

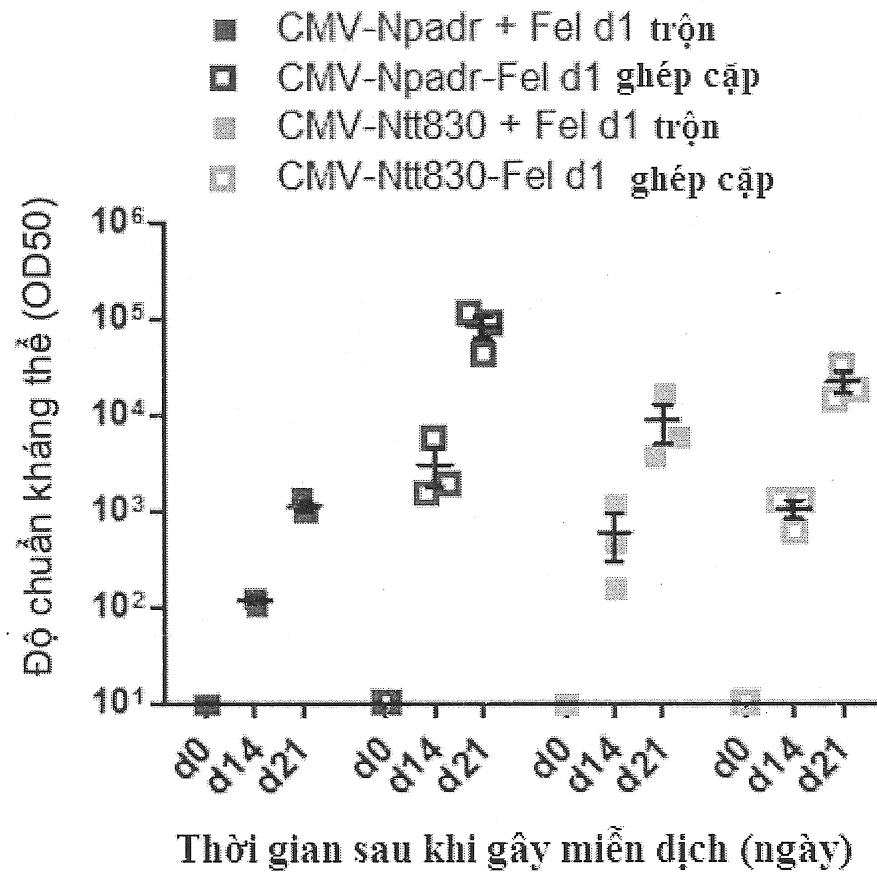


Fig.14

DANH MỤC TRÌNH TỰ

```

<110> SAIBA GMBH
<120> HẠT TUONG TỰ VIRUT ĐƯỢC CẢI BIẾN CỦA VIRUT THỂ KHÂM GÂY BỆNH Ở CÂY DUA CHUỘT VÀ CHẾ PHẨM
CHỨA HẠT NÀY
<130> P3295PC00
<150> EP14189897.3
<151> 2014-10-22
<150> EP15184192.1
<151> 2015-09-08
<160> 65
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 218
<212> PRT
<213> Virut thể khâm gây bệnh ở cây dưa chuột
<400> 1
Met Asp Lys Ser Glu Ser Thr Ser Ala Gly Arg Ser Arg Arg Arg Arg
1          5          10          15
Pro Arg Arg Gly Ser Arg Ser Ala Pro Ser Ser Ala Asp Ala Asn Phe
20          25          30
Arg Val Leu Ser Gln Gln Leu Ser Arg Leu Asn Lys Thr Leu Ala Ala
35          40          45
Gly Arg Pro Thr Ile Asn His Pro Thr Phe Val Gly Ser Glu Arg Cys
50          55          60
Lys Pro Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ile Thr Leu Lys Pro Pro Lys Ile
65          70          75          80
Asp Arg Gly Ser Tyr Tyr Gly Lys Arg Leu Leu Leu Pro Asp Ser Val
85          90          95
Thr Glu Tyr Asp Lys Lys Leu Val Ser Arg Ile Gln Ile Arg Val Asn
100         105         110
Pro Leu Pro Lys Phe Asp Ser Thr Val Trp Val Thr Val Arg Lys Val
115         120         125
Pro Ala Ser Ser Asp Leu Ser Val Ala Ala Ile Ser Ala Met Phe Ala
130         135         140
Asp Gly Ala Ser Pro Val Leu Val Tyr Gln Tyr Ala Ala Ser Gly Val
145         150         155         160
Gln Ala Asn Asn Lys Leu Leu Tyr Asp Leu Ser Ala Met Arg Ala Asp
165         170         175
Ile Gly Asp Met Arg Lys Tyr Ala Val Leu Val Tyr Ser Lys Asp Asp
180         185         190
Ala Leu Glu Thr Asp Glu Leu Val Leu His Val Asp Val Glu His Gln
195         200         205
Arg Ile Pro Thr Ser Gly Val Leu Pro Val
210         215
<210> 2
<211> 217
<212> PRT
<213> Virut thể khâm gây bệnh ở cây dưa chuột
<400> 2
Asp Lys Ser Glu Ser Thr Ser Ala Gly Arg Asn Arg Arg Arg Arg Pro
1          5          10          15
Arg Arg Gly Ser Arg Ser Ala Ser Ser Ser Ala Asp Ala Asn Phe Arg
20          25          30
Val Leu Ser Gln Gln Leu Ser Arg Leu Asn Lys Thr Leu Ala Ala Gly
35          40          45
Arg Pro Thr Ile Asn His Pro Thr Phe Val Gly Ser Glu Arg Cys Lys
50          55          60
Pro Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Ile Thr Leu Lys Pro Pro Lys Ile Asp
65          70          75          80
Arg Gly Ser Tyr Tyr Gly Lys Arg Leu Leu Leu Pro Asp Ser Val Thr
85          90          95
Glu Phe Asp Lys Lys Leu Val Ser Arg Ile Gln Ile Arg Val Asn Pro
100         105         110
Leu Pro Lys Phe Asp Ser Thr Val Trp Val Thr Val Arg Lys Val Pro
115         120         125
Ala Ser Ser Asp Leu Ser Val Ala Ala Ile Ser Ala Met Phe Ala Asp
130         135         140
Gly Ala Ser Pro Val Leu Val Tyr Gln Tyr Ala Ala Ser Gly Val Gln
145         150         155         160
Ala Asn Asn Lys Leu Leu Tyr Asp Leu Ser Ala Met Arg Ala Asp Ile
165         170         175
Gly Asp Met Arg Lys Tyr Ala Val Leu Val Tyr Ser Lys Asp Asp Ala
180         185         190
Leu Glu Thr Asp Glu Leu Val Leu His Val Asp Ile Glu His Gln Arg
195         200         205
Ile Pro Thr Ser Gly Val Leu Pro Val

```

```

210
<210> 3
<211> 218
<212> PRT
<213> Virut thể khảm gây bệnh ở cây dưa chuột
<400> 3
Met Asp Lys Ser Glu Ser Pro Asn Ala Ser Arg Thr Ser Arg Arg Arg
1          5          10          15
Arg Pro Arg Arg Gly Ser Arg Ser Ala Ser Gly Ala Asp Ala Gly Leu
20          25          30
Arg Ala Leu Thr Gln Gln Met Leu Lys Leu Asn Lys Thr Leu Ala Ile
35          40          45
Gly Arg Pro Thr Leu Asn His Pro Thr Phe Val Gly Ser Ala Ser Cys
50          55          60
Lys Pro Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ile Thr Leu Lys Pro Pro Glu Ile
65          70          75          80
Glu Lys Gly Ser Tyr Phe Gly Arg Arg Leu Ser Leu Pro Asp Ser Val
85          90          95
Thr Asp Tyr Asp Lys Lys Leu Val Ser Arg Ile Gln Ile Arg Ile Asn
100         105         110
Pro Leu Pro Lys Phe Asp Ser Thr Val Trp Val Thr Val Arg Lys Val
115         120         125
Pro Ser Ser Ser Asp Leu Ser Val Ala Thr Ile Ser Ala Met Phe Gly
130         135         140
Asp Gly Asn Ser Pro Val Leu Val Tyr Gln Tyr Thr Ala Ser Gly Val
145         150         155         160
Gln Ala Asn Asn Lys Leu Leu Tyr Asp Leu Ser Glu Met Arg Ala Asp
165         170         175
Ile Gly Asp Met Arg Lys Tyr Ala Val Leu Val Tyr Ser Lys Asp Asp
180         185         190
Lys Leu Glu Glu Asp Glu Ile Val Leu His Val Asp Val Glu His Gln
195         200         205
Arg Ile Pro Ile Ser Arg Met Leu Pro Thr
210         215

<210> 4
<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Epitop của độc tố uốn ván tt830
<400> 4
Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu
1          5          10

<210> 5
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> PADRE
<400> 5
Ala Lys Phe Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala
1          5          10

<210> 6
<211> 222
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> CMV-Ntt830
<400> 6
Met Gly Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu
1          5          10          15
Arg Arg Arg Arg Pro Arg Arg Gly Ser Arg Ser Ala Pro Ser Ser Ala
20          25          30
Asp Ala Asn Phe Arg Val Leu Ser Gln Gln Leu Ser Arg Leu Asn Lys
35          40          45
Thr Leu Ala Ala Gly Arg Pro Thr Ile Asn His Pro Thr Phe Val Gly
50          55          60
Ser Glu Arg Cys Lys Pro Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ile Thr Leu Lys
65          70          75          80
Pro Pro Lys Ile Asp Arg Gly Ser Tyr Tyr Gly Lys Arg Leu Leu Leu
85          90          95
Pro Asp Ser Val Thr Glu Tyr Asp Lys Lys Leu Val Ser Arg Ile Gln
100         105         110
Ile Arg Val Asn Pro Leu Pro Lys Phe Asp Ser Thr Val Trp Val Thr
115         120         125
Val Arg Lys Val Pro Ala Ser Ser Asp Leu Ser Val Ala Ala Ile Ser
130         135         140

```

Ala Met Phe Ala Asp Gly Ala Ser Pro Val Leu Val Tyr Gln Tyr Ala
 145 150 155 160
 Ala Ser Gly Val Gln Ala Asn Asn Lys Leu Leu Tyr Asp Leu Ser Ala
 165 170 175
 Met Arg Ala Asp Ile Gly Asp Met Arg Lys Tyr Ala Val Leu Val Tyr
 180 185 190
 Ser Lys Asp Asp Ala Leu Glu Thr Asp Glu Leu Val Leu His Val Asp
 195 200 205
 Val Glu His Gln Arg Ile Pro Thr Ser Gly Val Leu Pro Val
 210 215 220

<210> 7

<211> 220

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CMV-Npadr

<400> 7

Met Ala Lys Phe Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala Arg Arg
 1 5 10 15
 Arg Arg Pro Arg Arg Gly Ser Arg Ser Ala Pro Ser Ser Ala Asp Ala
 20 25 30
 Asn Phe Arg Val Leu Ser Gln Gln Leu Ser Arg Leu Asn Lys Thr Leu
 35 40 45
 Ala Ala Gly Arg Pro Thr Ile Asn His Pro Thr Phe Val Gly Ser Glu
 50 55 60
 Arg Cys Lys Pro Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ile Thr Leu Lys Pro Pro
 65 70 75 80
 Lys Ile Asp Arg Gly Ser Tyr Tyr Gly Lys Arg Leu Leu Leu Pro Asp
 85 90 95
 Ser Val Thr Glu Tyr Asp Lys Lys Leu Val Ser Arg Ile Gln Ile Arg
 100 105 110
 Val Asn Pro Leu Pro Lys Phe Asp Ser Thr Val Trp Val Thr Val Arg
 115 120 125
 Lys Val Pro Ala Ser Ser Asp Leu Ser Val Ala Ala Ile Ser Ala Met
 130 135 140
 Phe Ala Asp Gly Ala Ser Pro Val Leu Val Tyr Gln Tyr Ala Ala Ser
 145 150 155 160
 Gly Val Gln Ala Asn Asn Lys Leu Leu Tyr Asp Leu Ser Ala Met Arg
 165 170 175
 Ala Asp Ile Gly Asp Met Arg Lys Tyr Ala Val Leu Val Tyr Ser Lys
 180 185 190
 Asp Asp Ala Leu Glu Thr Asp Glu Leu Val Leu His Val Asp Val Glu
 195 200 205
 His Gln Arg Ile Pro Thr Ser Gly Val Leu Pro Val
 210 215 220

<210> 8

<211> 34

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi CMcpF

<400> 8

caccatggac aaatctgaat caaccagtgc tgggt

34

<210> 9

<211> 37

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi CMcpR

<400> 9

caaagcttat caaactggga gcaccccaga tgtggga

37

<210> 10

<211> 660

<212> ADN

<213> Virut thể khảm gây bệnh ở cây dưa chuột

<400> 10

atggacaaat ctgaatcaac cagtgtcgtg	cgtagccgtc gacgtcgtcc gcgtcgtggt	60
tcccgtctcc cccctctctc cgcggatgct	aacttttagag tcttgctcga gcagctttcg	120
cgacttaata agacgttagc agctggctgt	ccaactatta accacccaac ctttgtaggg	180
agtgaacgct gtaaacctgg gtacacgttc	acatctatca ccctaaagcc accaaaaata	240
gaccgtgggt cttattatgg taaaagggtg	ttattacctg attcagtcac ggaatatgat	300
aagaaaacttg ttctgcgcac tcaaattcga	gttaatcctt tgccgaaatt tgattcaacc	360
gtgtgggtga cagtcctgtg agttcctgcc	tcttcggact tatccgttgc cgccatttct	420
gctatgtttg cggacgagac ctcaccggta	ctggtttatc agtacgctgc atctggagtc	480
caagctaaca acaaacgtgt gtatgatctt	tcggcgatgc gcgtgatag aggcgacatg	540
agaagtagc cgtctcctgt gtattcaaaa	gacgatgcac tcgagacaga cgagtttagta	600
cttcatgttg acgtcgagca ccaacgtatt	cccacatctg ggggtgctcc agtttgataa	660


```

<210> 11
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi pET-220
<400> 11
agcaccgccc ccgcaaggaa 20
<210> 12
<211> 52
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi CMV-tt83-1R
<400> 12
atttgaggtt ggccttaata tactggccca tggatatatct ccttcttaaa gt 52
<210> 13
<211> 52
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi CMV-tt83Sal-R2
<400> 13
gacgtcgacg ctccgtaatc ccgataaaatt tggagttggc cttaatatat tg 52
<210> 14
<211> 672
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> ADN bổ sung mã hóa CMV-Ntt830
<400> 14
atggggccagt atattaagcg caactccaaa tttatcggga ttaccgagcg tcgacgtcgt 60
ccgcgtcgtg gttcccgctc cgccccctcc tccgcggatg ctaacttttag agtcttgctg 120
cagcagcttt cgcgacttaa taagacgtta gcagctggtc gtccaactat taaccaccca 180
acctttgtag ggagtgaacg ctgtaaacct gggtacacgt tcacatctat caccctaaag 240
ccaccaaaaa tagaccgtgg gtcttattat ggtaaaaagg tggtattacc tgattcagtc 300
ccggaatatg ataagaaact tgtttcgcgc attcaaatcc gaggtaatcc ttggccgaaa 360
tttgattcaa ccgtgtgggt gacagtcctg aaagttcctg cctcttcgga cttatccggt 420
gccgcatttt ctgctatggt tgcggacgga gcctcacggt tactggttta tcagtacgct 480
gcatctggag tccaagctaa caacaaactg ttgtatgata tttcggcgat gcgcgctgat 540
ataggcgaca tgagaaagta cgccgtcctc gtgtattcaa aagacgatgc actcgagaca 600
gacgagtttag tacttcatgt tgacgtcgag caccaacgta ttcccatc tcgggtgctc 660
ccagtttgat aa 672
<210> 15
<211> 55
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi CMV-padrSal-R
<400> 15
gacgtcgacg cgcgccgcc ttgagggtcc acgcggccac aaatttcgcc atggt 55
<210> 16
<211> 666
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> ADN bổ sung mã hóa CMV-Npadr
<400> 16
atggcgaaat ttgtggccgc gtggaccctc aaggcgccgc cgcgctcgacg tcgtccgcgt 60
cgtggttccc gctccgcccc ctctcccgcg gatgctaact ttagagtctt gtcgcagcag 120
ctttcgcgac ttaataagac gttagcagct ggtcgtccaa ctattaacca cccaaccttt 180
gtaggagtg aacgctgtaa acctgggtac acgttcacat ctatcacct aaagccacca 240
aaaatagacc gtgggtctta ttatggtaaa aggttggtat tacctgattc agtcacggaa 300
tatgataaga aacttgtttc gcgcattcaa attcgagtta atcctttgcc gaaatttgat 360
tcaaccgtgt gggtgacagt ccgtaaagtt cctgcctctt cggacttata cgttgccgcc 420
atttctgcta tgtttgcgga cggagcctca ccggtactgg tttatcagta cgctgcatct 480
ggagtcgaag ctaacaacaa actgttgtat gatctttcgg cgatgcgcgc tgatataggg 540
gacatgagaa agtacgcgt cctcgtgtat tcaaaagacg atgcactcga gacagacgag 600
ttagtacttc atgttgacgt cgagaccaa cgtattccca catctggggt gctcccagtt 660
tgataa 666
<210> 17
<211> 176
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> rFel-2-G3-1
<400> 17

```

Val Lys Met Ala Glu Thr Cys Pro Ile Phe Tyr Asp Val Phe Phe Ala
 1 5 10 15
 Val Ala Asn Gly Asn Glu Leu Leu Leu Asp Leu Ser Leu Thr Lys Val
 20 25 30
 Asn Ala Thr Glu Pro Glu Arg Thr Ala Met Lys Lys Ile Gln Asp Cys
 35 40 45
 Tyr Val Glu Asn Gly Leu Ile Ser Arg Val Leu Asp Gly Leu Val Met
 50 55 60
 Thr Thr Ile Ser Ser Ser Lys Asp Cys Met Gly Glu Ala Val Gln Asn
 65 70 75 80
 Thr Val Glu Asp Leu Lys Leu Asn Thr Leu Gly Arg Gly Gly Gly Gly
 85 90 95
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Cys Glu Ile Cys Pro
 100 105 110
 Ala Val Lys Arg Asp Val Asp Leu Phe Leu Thr Gly Thr Pro Asp Glu
 115 120 125
 Tyr Val Glu Gln Val Ala Gln Tyr Lys Ala Leu Pro Val Val Leu Glu
 130 135 140
 Asn Ala Arg Ile Leu Lys Asn Cys Val Asp Ala Lys Met Thr Glu Glu
 145 150 155 160
 Asp Lys Glu Asn Ala Leu Ser Val Leu Asp Lys Ile Tyr Thr Ser Pro
 165 170 175

<210> 18
 <211> 176
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> rFel-1-G3-2
 <400> 18

Cys Glu Ile Cys Pro Ala Val Lys Arg Asp Val Asp Leu Phe Leu Thr
 1 5 10 15
 Gly Thr Pro Asp Glu Tyr Val Glu Gln Val Ala Gln Tyr Lys Ala Leu
 20 25 30
 Pro Val Val Leu Glu Asn Ala Arg Ile Leu Lys Asn Cys Val Asp Ala
 35 40 45
 Lys Met Thr Glu Glu Asp Lys Glu Asn Ala Leu Ser Val Leu Asp Lys
 50 55 60
 Ile Tyr Thr Ser Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 65 70 75 80
 Gly Gly Gly Ser Val Lys Met Ala Glu Thr Cys Pro Ile Phe Tyr Asp
 85 90 95
 Val Phe Phe Ala Val Ala Asn Gly Asn Glu Leu Leu Leu Asp Leu Ser
 100 105 110
 Leu Thr Lys Val Asn Ala Thr Glu Pro Glu Arg Thr Ala Met Lys Lys
 115 120 125
 Ile Gln Asp Cys Tyr Val Glu Asn Gly Leu Ile Ser Arg Val Leu Asp
 130 135 140
 Gly Leu Val Met Thr Thr Ile Ser Ser Ser Lys Asp Cys Met Gly Glu
 145 150 155 160
 Ala Val Gln Asn Thr Val Glu Asp Leu Lys Leu Asn Thr Leu Gly Arg
 165 170 175

<210> 19
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Peptit alpha-synuclein - GGC
 <400> 19

Lys Asn Glu Glu Gly Ala Pro Gly Gly Cys
 1 5 10

<210> 20
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Protein IL17A của chuột
 <400> 20

Ala Ala Ile Ile Pro Gln Ser Ser Ala Cys Pro Asn Thr Glu Ala Lys
 1 5 10 15
 Asp Phe Leu Gln Asn Val Lys Val Asn Leu Lys Val Phe Asn Ser Leu
 20 25 30
 Gly Ala Lys Val Ser Ser Arg Arg Pro Ser Asp Tyr Leu Asn Arg Ser
 35 40 45
 Thr Ser Pro Trp Thr Leu His Arg Asn Glu Asp Pro Asp Arg Tyr Pro
 50 55 60
 Ser Val Ile Trp Glu Ala Gln Cys Arg His Gln Arg Cys Val Asn Ala
 65 70 75 80

Glu	Gly	Lys	Leu	Asp	His	Met	Asn	Ser	Val	Leu	Ile	Gln	Gln	Glu	
85				90				95							
Ile	Leu	Val	Leu	Lys	Arg	Glu	Pro	Glu	Ser	Cys	Pro	Phe	Thr	Phe	Arg
100				105				110							
Val	Glu	Lys	Met	Leu	Val	Gly	Val	Gly	Cys	Thr	Cys	Val	Ala	Ser	Ile
115				120				125							
Val	Arg	Gln	Ala	Ala	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Cys					
130				135											
<210>		21													
<211>		27													
<212>		PRT													
<213>		Trình tự nhân tạo													
<220>															
<223>		Axit amin 2-27 của SEQ ID NO.1													
<400>		21													
Asp	Lys	Ser	Glu	Ser	Thr	Ser	Ala	Gly	Arg	Ser	Arg	Arg	Arg	Arg	Pro
5				10				15							
Arg	Arg	Gly	Ser	Arg	Ser	Ala	Pro	Ser	Ser	Ala					
20				25											
<210>		22													
<211>		11													
<212>		PRT													
<213>		Trình tự nhân tạo													
<220>															
<223>		Peptit alpha-synuclein - GGC													
<400>		22													
Met	Asp	Val	Phe	Met	Lys	Gly	Leu	Gly	Gly	Cys					
5				10											
<210>		23													
<211>		132													
<212>		PRT													
<213>		Trình tự nhân tạo													
<220>															
<223>		m-IL-5													
<400>		23													
Met	Glu	Ile	Pro	Met	Ser	Thr	Val	Val	Lys	Glu	Thr	Leu	Thr	Gln	Leu
5				10				15							
Ser	Ala	His	Arg	Ala	Leu	Leu	Thr	Ser	Asn	Glu	Thr	Met	Arg	Leu	Pro
20				25				30							
Val	Pro	Thr	His	Lys	Asn	His	Gln	Leu	Cys	Ile	Gly	Glu	Ile	Phe	Gln
35				40				45							
Gly	Leu	Asp	Ile	Leu	Lys	Asn	Gln	Thr	Val	Arg	Gly	Gly	Thr	Val	Glu
50				55				60							
Met	Leu	Phe	Gln	Asn	Leu	Ser	Leu	Ile	Lys	Lys	Tyr	Ile	Asp	Arg	Gln
65				70				75				80			
Lys	Glu	Lys	Cys	Gly	Glu	Glu	Arg	Arg	Arg	Thr	Arg	Gln	Phe	Leu	Asp
85				90				95							
Tyr	Leu	Gln	Glu	Phe	Leu	Gly	Val	Met	Ser	Thr	Glu	Trp	Ala	Met	Glu
100				105				110							
Gly	Leu	Glu	Pro	Lys	Ser	Thr	Pro	Pro	Gly	Ser	Ser	Gly	Gly	Ala	Pro
115				120				125							
Gly	Gly	Cys	Gly												
130															
<210>		24													
<211>		24													
<212>		PRT													
<213>		Trình tự nhân tạo													
<220>															
<223>		Peptit M2 của virus cúm													
<400>		24													
Ser	Leu	Leu	Thr	Glu	Val	Glu	Thr	Pro	Ile	Arg	Asn	Glu	Trp	Gly	Cys
5				10				15							
Arg	Cys	Asn	Asp	Ser	Ser	Asp	Gly								
20															
<210>		25													
<211>		9													
<212>		PRT													
<213>		Trình tự nhân tạo													
<220>															
<223>		Ab1-6-GGC													
<400>		25													
Asp	Ala	Gly	Phe	Arg	His	Gly	Gly	Cys							
5															
<210>		26													
<211>		13													
<212>		PRT													
<213>		Trình tự nhân tạo													

```

<220>
<223> HA 307-319
<400> 26
Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr
1          5          10
<210> 27
<211> 20
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> HBVnc 50-69
<400> 27
Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu Leu
1          5          10          15
Met Thr Leu Ala
          20
<210> 28
<211> 21
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> CS 378-398
<400> 28
Asp Ile Glu Lys Lys Ile Ala Lys Met Glu Lys Ala Ser Ser Val Phe
1          5          10          15
Asn Val Val Asn Ser
          20
<210> 29
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> MT 17-31
<400> 29
Tyr Ser Gly Pro Leu Lys Ala Glu Ile Ala Gln Arg Leu Glu Asp Val
1          5          10          15
<210> 30
<211> 21
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> tt 947-967
<400> 30
Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser
1          5          10          15
Ala Ser His Leu Glu
          20
<210> 31
<211> 10
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> CpG xuôi ngược giống nhau
<400> 31
gacgatcgtc
<210> 32
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit alpha-synuclein
<400> 32
Met Asp Val Phe Met Lys Gly Leu
1          5
<210> 33
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit alpha-synuclein
<400> 33
Lys Asn Glu Glu Gly Ala Pro
1          5
<210> 34
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

```

10

```

<220>
<223> Peptit alpha-synuclein
<400> 34
Glu Gly Tyr Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Ala
1          5          10
<210> 35
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự đánh dấu His cộng với gốc liên kết
<400> 35
Leu Glu His His His His His His Gly Gly Cys
1          5          10
<210> 36
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Oligonucleotit CpG
<400> 36
gggggggggg gacgatcgtc gggggggggg
<210> 37
<211> 70
<212> PRT
<213> Felis domesticus
<400> 37
Glu Ile Cys Pro Ala Val Lys Arg Asp Val Asp Leu Phe Leu Thr Gly
1          5          10          15
Thr Pro Asp Glu Tyr Val Glu Gln Val Ala Gln Tyr Lys Ala Leu Pro
          20          25          30
Val Val Leu Glu Asn Ala Arg Ile Leu Lys Asn Cys Val Asp Ala Lys
          35          40          45
Met Thr Glu Glu Asp Lys Glu Asn Ala Leu Ser Leu Leu Asp Lys Ile
          50          55          60
Tyr Thr Ser Pro Leu Cys
65          70
<210> 38
<211> 92
<212> PRT
<213> Felis domesticus
<400> 38
Val Lys Met Ala Glu Thr Cys Pro Ile Phe Tyr Asp Val Phe Phe Ala
1          5          10          15
Val Ala Asn Gly Asn Glu Leu Leu Leu Asp Leu Ser Leu Thr Lys Val
          20          25          30
Asn Ala Thr Glu Pro Glu Arg Thr Ala Met Lys Lys Ile Gln Asp Cys
          35          40          45
Tyr Val Glu Asn Gly Leu Ile Ser Arg Val Leu Asp Gly Leu Val Met
          50          55          60
Thr Thr Ile Ser Ser Ser Lys Asp Cys Met Gly Glu Ala Val Gln Asn
65          70          75          80
Thr Val Glu Asp Leu Lys Leu Asn Thr Leu Gly Arg
          85          90
<210> 39
<211> 90
<212> PRT
<213> Felis domesticus
<400> 39
Val Lys Met Ala Glu Thr Cys Pro Ile Phe Tyr Asp Val Phe Phe Ala
1          5          10          15
Val Ala Asn Gly Asn Glu Leu Leu Leu Asp Leu Ser Leu Thr Lys Val
          20          25          30
Asn Ala Thr Glu Pro Glu Arg Thr Ala Met Lys Lys Ile Gln Asp Cys
          35          40          45
Tyr Val Glu Asn Gly Leu Ile Ser Arg Val Leu Asp Gly Leu Val Met
          50          55          60
Ile Ala Ile Asn Glu Tyr Cys Met Gly Glu Ala Val Gln Asn Thr Val
65          70          75          80
Glu Asp Leu Lys Leu Asn Thr Leu Gly Arg
          85          90
<210> 40
<211> 78
<212> PRT
<213> Felis domesticus
<400> 40
Val Lys Met Ala Glu Thr Cys Pro Ile Phe Tyr Asp Val Phe Phe Ala

```

30

```

1           5           10           15
Val Ala Asn Gly Asn Glu Leu Leu Leu Asp Leu Ser Leu Thr Lys Val
20           25           30
Asn Ala Thr Glu Pro Glu Arg Thr Ala Met Lys Lys Ile Gln Asp Cys
35           40           45
Tyr Val Glu Asn Gly Leu Ile Ser Arg Val Leu Asp Gly Leu Val Met
50           55           60
Pro Ser Thr Asn Ile Ala Trp Val Lys Gln Phe Arg Thr Pro
65           70           75
<210> 41
<211> 115
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 41
Ile Pro Thr Glu Ile Pro Thr Ser Ala Leu Val Lys Glu Thr Leu Ala
1           5           10           15
Leu Leu Ser Thr His Arg Thr Leu Leu Ile Ala Asn Glu Thr Leu Arg
20           25           30
Ile Pro Val Pro Val His Lys Asn His Gln Leu Cys Thr Glu Glu Ile
35           40           45
Phe Gln Gly Ile Gly Thr Leu Glu Ser Gln Thr Val Gln Gly Gly Thr
50           55           60
Val Glu Arg Leu Phe Lys Asn Leu Ser Leu Ile Lys Lys Tyr Ile Asp
65           70           75           80
Gly Gln Lys Lys Lys Cys Gly Glu Glu Arg Arg Arg Val Asn Gln Phe
85           90           95
Leu Asp Tyr Leu Gln Glu Phe Leu Gly Val Met Asn Thr Glu Trp Ile
100          105          110
Ile Glu Ser
115
<210> 42
<211> 132
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 42
Gly Ile Thr Ile Pro Arg Asn Pro Gly Cys Pro Asn Ser Glu Asp Lys
1           5           10           15
Asn Phe Pro Arg Thr Val Met Val Asn Leu Asn Ile His Asn Arg Asn
20           25           30
Thr Asn Thr Asn Pro Lys Arg Ser Ser Asp Tyr Tyr Asn Arg Ser Thr
35           40           45
Ser Pro Trp Asn Leu His Arg Asn Glu Asp Pro Glu Arg Tyr Pro Ser
50           55           60
Val Ile Trp Glu Ala Lys Cys Arg His Leu Gly Cys Ile Asn Ala Asp
65           70           75           80
Gly Asn Val Asp Tyr His Met Asn Ser Val Pro Ile Gln Gln Glu Ile
85           90           95
Leu Val Leu Arg Arg Glu Pro Pro His Cys Pro Asn Ser Phe Arg Leu
100          105          110
Glu Lys Ile Leu Val Ser Val Gly Cys Thr Cys Val Thr Pro Ile Val
115          120          125
His His Val Ala
130
<210> 43
<211> 141
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 43
Ser His Thr Leu Pro Val Arg Leu Leu Arg Pro Ser Asp Asp Val Gln
1           5           10           15
Lys Ile Val Glu Glu Leu Gln Ser Leu Ser Lys Met Leu Leu Lys Asp
20           25           30
Val Glu Glu Glu Lys Gly Val Leu Val Ser Gln Asn Tyr Thr Leu Pro
35           40           45
Cys Leu Ser Pro Asp Ala Gln Pro Pro Asn Asn Ile His Ser Pro Ala
50           55           60
Ile Arg Ala Tyr Leu Lys Thr Ile Arg Gln Leu Asp Asn Lys Ser Val
65           70           75           80
Ile Asp Glu Ile Ile Glu His Leu Asp Lys Leu Ile Phe Gln Asp Ala
85           90           95
Pro Glu Thr Asn Ile Ser Val Pro Thr Asp Thr His Glu Cys Lys Arg
100          105          110
Phe Ile Leu Thr Ile Ser Gln Gln Phe Ser Glu Cys Met Asp Leu Ala
115          120          125
Leu Lys Ser Leu Thr Ser Gly Ala Gln Gln Ala Thr Thr
130          135          140
<210> 44

```

```

<211> 136
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> IL-31 của chó
<400> 44
Ser His Met Ala Pro Thr His Gln Leu Pro Pro Ser Asp Val Arg Lys
1          5          10          15
Ile Ile Leu Glu Leu Gln Pro Leu Ser Arg Gly Leu Leu Glu Asp Tyr
          20          25          30
Gln Lys Lys Glu Thr Gly Val Pro Glu Ser Asn Arg Thr Leu Leu Leu
          35          40          45
Cys Leu Thr Ser Asp Ser Gln Pro Pro Arg Leu Asn Ser Ser Ala Ile
          50          55          60
Leu Pro Tyr Phe Arg Ala Ile Arg Pro Leu Ser Asp Lys Asn Ile Ile
65          70          75          80
Asp Lys Ile Ile Glu Gln Leu Asp Lys Leu Lys Phe Gln His Glu Pro
          85          90          95
Glu Thr Glu Ile Ser Val Pro Ala Asp Thr Phe Glu Cys Lys Ser Phe
          100          105          110
Ile Leu Thr Ile Leu Gln Gln Phe Ser Ala Cys Leu Glu Ser Val Phe
          115          120          125
Lys Ser Leu Asn Ser Gly Pro Gln
          130          135
<210> 45
<211> 129
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 45
His Lys Cys Asp Ile Thr Leu Gln Glu Ile Ile Lys Thr Leu Asn Ser
1          5          10          15
Leu Thr Glu Gln Lys Thr Leu Cys Thr Glu Leu Thr Val Thr Asp Ile
          20          25          30
Phe Ala Ala Ser Lys Asn Thr Thr Glu Lys Glu Thr Phe Cys Arg Ala
          35          40          45
Ala Thr Val Leu Arg Gln Phe Tyr Ser His His Glu Lys Asp Thr Arg
          50          55          60
Cys Leu Gly Ala Thr Ala Gln Gln Phe His Arg His Lys Gln Leu Ile
65          70          75          80
Arg Phe Leu Lys Arg Leu Asp Arg Asn Leu Trp Gly Leu Ala Gly Leu
          85          90          95
Asn Ser Cys Pro Val Lys Glu Ala Asn Gln Ser Thr Leu Glu Asn Phe
          100          105          110
Leu Glu Arg Leu Lys Thr Ile Met Arg Glu Lys Tyr Ser Lys Cys Ser
          115          120          125
Ser
<210> 46
<211> 122
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 46
Leu Thr Cys Leu Gly Gly Phe Ala Ser Pro Gly Pro Val Pro Pro Ser
1          5          10          15
Thr Ala Leu Arg Glu Leu Ile Glu Glu Leu Val Asn Ile Thr Gln Asn
          20          25          30
Gln Lys Ala Pro Leu Cys Asn Gly Ser Met Val Trp Ser Ile Asn Leu
          35          40          45
Thr Ala Gly Met Tyr Cys Ala Ala Leu Glu Ser Leu Ile Asn Val Ser
          50          55          60
Gly Cys Ser Ala Ile Glu Lys Thr Gln Arg Met Leu Ser Gly Phe Cys
65          70          75          80
Pro His Lys Val Ser Ala Gly Gln Phe Ser Ser Leu His Val Arg Asp
          85          90          95
Thr Lys Ile Glu Val Ala Gln Phe Val Lys Asp Leu Leu Leu His Leu
          100          105          110
Lys Lys Leu Phe Arg Glu Gly Arg Phe Asn
          115          120
<210> 47
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn đệm 15 axit amin
<400> 47
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1          5          10          15
<210> 48

```

```

<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự đánh dấu His cộng với gốc liên kết
<400> 48
His His His His His His Gly Gly Cys
1 5
<210> 49
<211> 579
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> F12H6GGC
<400> 49
catatggaaa tttgtccggc agttaaacgt gatgttgacc tgtttctgac cggtacaccg 60
gatgaatatg tggaaacaggt tgcacagtat aaagcactgc cggttgttct ggaaaatgca 120
cgtattctga aaaattgcgt ggatgccaaa atgaccgaag aggataaaga aaatgccctg 180
agcgttcttg ataaaatcta taccagtccg ctgtgcggtg gtgggtgtag tgggtggcgg 240
ggttcaggcg gtggcggtag cgtaaaaatg gcagaaacct gtccgatctt ttatgatgtt 300
ttttttgccg tggccaatgg caatgaactg ctgctggatc tgagcctgac caaagttaat 360
gcaaccgaac cggaacgtac cgcaatgaaa aaaatccagg attgctatgt ggaaaacgg 420
ctgattagcc gtgttctgga tggctctggt atgaccacca ttagcagcag caaagattgt 480
atgggtgaag cagtgcagaa taccgttgaa gatctgaaac tgaataacct gggtcgatcat 540
catcatcacc atcatggtg ttgttaataa ctcgagtaa 579
<210> 50
<211> 187
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> F12H6GGC
<400> 50
Met Glu Ile Cys Pro Ala Val Lys Arg Asp Val Asp Leu Phe Leu Thr
1 5 10 15
Gly Thr Pro Asp Glu Tyr Val Glu Gln Val Ala Gln Tyr Lys Ala Leu
20 25 30
Pro Val Val Leu Glu Asn Ala Arg Ile Leu Lys Asn Cys Val Asp Ala
35 40 45
Lys Met Thr Glu Glu Asp Lys Glu Asn Ala Leu Ser Val Leu Asp Lys
50 55 60
Ile Tyr Thr Ser Pro Leu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
65 70 75 80
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Val Lys Met Ala Glu Thr Cys Pro Ile Phe
85 90 95
Tyr Asp Val Phe Phe Ala Val Ala Asn Gly Asn Glu Leu Leu Leu Asp
100 105 110
Leu Ser Leu Thr Lys Val Asn Ala Thr Glu Pro Glu Arg Thr Ala Met
115 120 125
Lys Lys Ile Gln Asp Cys Tyr Val Glu Asn Gly Leu Ile Ser Arg Val
130 135 140
Leu Asp Gly Leu Val Met Thr Thr Ile Ser Ser Ser Lys Asp Cys Met
145 150 155 160
Gly Glu Ala Val Gln Asn Thr Val Glu Asp Leu Lys Leu Asn Thr Leu
165 170 175
Gly Arg His His His His His His Gly Gly Cys
180 185
<210> 51
<211> 28
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi Fel_BglF
<400> 51
tgaagatctg aaactgaata ccctgggt 28
<210> 52
<211> 180
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> FELD1-15aa
<400> 52
Met Val Lys Met Ala Glu Thr Cys Pro Ile Phe Tyr Asp Val Phe Phe
1 5 10 15
Ala Val Ala Asn Gly Asn Glu Leu Leu Leu Asp Leu Ser Leu Thr Lys
20 25 30
Val Asn Ala Thr Glu Pro Glu Arg Thr Ala Met Lys Lys Ile Gln Asp
35 40 45

```


Cys Tyr Val Glu Asn Gly Leu Ile Ser Arg Val Leu Asp Gly Leu Val
 50 55 60
 Met Thr Thr Ile Ser Ser Lys Asp Cys Met Gly Glu Ala Val Gln
 65 70 75 80
 Asn Thr Val Glu Asp Leu Lys Leu Asn Thr Leu Gly Arg Gly Gly Gly
 85 90 95
 Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Ile Cys Pro
 100 105 110
 Ala Val Lys Arg Asp Val Asp Leu Phe Leu Thr Gly Thr Pro Asp Glu
 115 120 125
 Tyr Val Glu Gln Val Ala Gln Tyr Lys Ala Leu Pro Val Val Leu Glu
 130 135 140
 Asn Ala Arg Ile Leu Lys Asn Cys Val Asp Ala Lys Met Thr Glu Glu
 145 150 155 160
 Asp Lys Glu Asn Ala Leu Ser Leu Leu Asp Lys Ile Tyr Thr Ser Pro
 165 170 175
 Leu Cys Leu Glu
 180

<210> 53

<211> 48

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi ngược Feld-dHR

<400> 53

tactcgagttt attaacaacc accacgaccc aggggtattca gtttcaga

48

<210> 54

<211> 371

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Protein hoàn chỉnh Amb a1

<400> 54

Ala Glu Asp Leu Gln Glu Ile Leu Pro Val Asn Glu Thr Arg Arg Leu
 1 5 10 15
 Thr Thr Ser Gly Ala Tyr Asn Ile Ile Asp Gly Cys Trp Arg Gly Lys
 20 25 30
 Ala Asp Trp Ala Glu Asn Arg Lys Ala Leu Ala Asp Cys Ala Gln Gly
 35 40 45
 Phe Gly Lys Gly Thr Val Gly Gly Lys Asp Gly Asp Ile Tyr Thr Val
 50 55 60
 Thr Ser Asp Leu Asp Asp Asp Val Ala Asn Pro Lys Glu Gly Thr Leu
 65 70 75 80
 Arg Phe Gly Ala Ala Gln Asn Arg Pro Leu Trp Ile Ile Phe Glu Arg
 85 90 95
 Asp Met Val Ile Arg Leu Asp Lys Glu Met Val Val Asn Ser Asp Lys
 100 105 110
 Thr Ile Asp Gly Arg Gly Ala Lys Val Glu Ile Ile Asn Ala Gly Phe
 115 120 125
 Thr Leu Asn Gly Val Lys Asn Val Ile Ile His Asn Ile Asn Met His
 130 135 140
 Asp Val Lys Val Asn Pro Gly Gly Leu Ile Lys Ser Asn Asp Gly Pro
 145 150 155 160
 Ala Ala Pro Arg Ala Gly Ser Asp Gly Asp Ala Ile Ser Ile Ser Gly
 165 170 175
 Ser Ser Gln Ile Trp Ile Asp His Cys Ser Leu Ser Lys Ser Val Asp
 180 185 190
 Gly Leu Val Asp Ala Lys Leu Gly Thr Thr Arg Leu Thr Val Ser Asn
 195 200 205
 Ser Leu Phe Thr Gln His Gln Phe Val Leu Leu Phe Gly Ala Gly Asp
 210 215 220
 Glu Asn Ile Glu Asp Arg Gly Met Leu Ala Thr Val Ala Phe Asn Thr
 225 230 235 240
 Phe Thr Asp Asn Val Asp Gln Arg Met Pro Arg Cys Arg His Gly Phe
 245 250 255
 Phe Gln Val Val Asn Asn Asn Tyr Asp Lys Trp Gly Ser Tyr Ala Ile
 260 265 270
 Gly Gly Ser Ala Ser Pro Thr Ile Leu Ser Gln Gly Asn Arg Phe Cys
 275 280 285
 Ala Pro Asp Glu Arg Ser Lys Asn Val Leu Gly Arg His Gly Glu
 290 295 300
 Ala Ala Ala Glu Ser Met Lys Trp Asn Trp Arg Thr Asn Lys Asp Val
 305 310 315 320
 Leu Glu Asn Gly Ala Ile Phe Val Ala Ser Gly Val Asp Pro Val Leu
 325 330 335
 Thr Pro Glu Gln Ser Ala Gly Met Ile Pro Ala Glu Pro Gly Glu Ser
 340 345 350

Ala Leu Ser Leu Thr Ser Ser Ala Gly Val Leu Ser Cys Gln Pro Gly
 355 360 365
 Ala Pro Cys
 370
 <210> 55
 <211> 514
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Cry J2
 <400> 55
 Met Ala Met Lys Phe Ile Ala Pro Met Ala Phe Val Ala Met Gln Leu
 1 5 10 15
 Ile Ile Met Ala Ala Ala Glu Asp Gln Ser Ala Gln Ile Met Leu Asp
 20 25 30
 Ser Asp Ile Glu Gln Tyr Leu Arg Ser Asn Arg Ser Leu Arg Lys Val
 35 40 45
 Glu His Ser Arg His Asp Ala Ile Asn Ile Phe Asn Val Glu Lys Tyr
 50 55 60
 Gly Ala Val Gly Asp Gly Lys His Asp Cys Thr Glu Ala Phe Ser Thr
 65 70 75 80
 Ala Trp Gln Ala Ala Cys Lys Lys Pro Ser Ala Met Leu Leu Val Pro
 85 90 95
 Gly Asn Lys Lys Phe Val Val Asn Asn Leu Phe Phe Asn Gly Pro Cys
 100 105 110
 Gln Pro His Phe Thr Phe Lys Val Asp Gly Ile Ile Ala Ala Tyr Gln
 115 120 125
 Asn Pro Ala Ser Trp Lys Asn Asn Arg Ile Trp Leu Gln Phe Ala Lys
 130 135 140
 Leu Thr Gly Phe Thr Leu Met Gly Lys Gly Val Ile Asp Gly Gln Gly
 145 150 155 160
 Lys Gln Trp Trp Ala Gly Gln Cys Lys Trp Val Asn Gly Arg Glu Ile
 165 170 175
 Cys Asn Asp Arg Asp Arg Pro Thr Ala Ile Lys Phe Asp Phe Ser Thr
 180 185 190
 Gly Leu Ile Ile Gln Gly Leu Lys Leu Met Asn Ser Pro Glu Phe His
 195 200 205
 Leu Val Phe Gly Asn Cys Glu Gly Val Lys Ile Ile Gly Ile Ser Ile
 210 215 220
 Thr Ala Pro Arg Asp Ser Pro Asn Thr Asp Gly Ile Asp Ile Phe Ala
 225 230 235 240
 Ser Lys Asn Phe His Leu Gln Lys Asn Thr Ile Gly Thr Gly Asp Asp
 245 250 255
 Cys Val Ala Ile Gly Thr Gly Ser Ser Asn Ile Val Ile Glu Asp Leu
 260 265 270
 Ile Cys Gly Pro Gly His Gly Ile Ser Ile Gly Ser Leu Gly Arg Glu
 275 280 285
 Asn Ser Arg Ala Glu Val Ser Tyr Val His Val Asn Gly Ala Lys Phe
 290 295 300
 Ile Asp Thr Gln Asn Gly Leu Arg Ile Lys Thr Trp Gln Gly Gly Ser
 305 310 315 320
 Gly Met Ala Ser His Ile Ile Tyr Glu Asn Val Glu Met Ile Asn Ser
 325 330 335
 Glu Asn Pro Ile Leu Ile Asn Gln Phe Tyr Cys Thr Ser Ala Ser Ala
 340 345 350
 Cys Gln Asn Gln Arg Ser Ala Val Gln Ile Gln Asp Val Thr Tyr Lys
 355 360 365
 Asn Ile Arg Gly Thr Ser Ala Thr Ala Ala Ala Ile Gln Leu Lys Cys
 370 375 380
 Ser Asp Ser Met Pro Cys Lys Asn Ile Asn Leu Ser Asp Ile Ser Leu
 385 390 395 400
 Lys Leu Thr Ser Gly Lys Ile Ala Ser Cys Leu Asn Asp Asn Ala Asn
 405 410 415
 Gly Tyr Phe Ser Gly His Val Ile Pro Ala Cys Lys Asn Leu Ser Pro
 420 425 430
 Ser Ala Lys Arg Lys Glu Ser Lys Ser His Lys His Pro Lys Thr Val
 435 440 445
 Met Val Glu Asn Met Gly Ala Tyr Asp Lys Gly Asn Arg Thr Arg Ile
 450 455 460
 Leu Leu Gly Ser Arg Pro Pro Asn Cys Thr Asn Lys Cys His Gly Cys
 465 470 475 480
 Ser Pro Cys Lys Ala Lys Leu Val Ile Val His Arg Ile Met Pro Gln
 485 490 495
 Glu Tyr Tyr Pro Gln Arg Trp Met Cys Ser Cys His Gly Lys Ile Tyr
 500 505 510
 His Pro
 <210> 56

```

<211> 181
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> F12GGC
<400> 56
Met Glu Ile Cys Pro Ala Val Lys Arg Asp Val Asp Leu Phe Leu Thr
1      5      10      15
Gly Thr Pro Asp Glu Tyr Val Glu Gln Val Ala Gln Tyr Lys Ala Leu
      20      25      30
Pro Val Val Leu Glu Asn Ala Arg Ile Leu Lys Asn Cys Val Asp Ala
      35      40      45
Lys Met Thr Glu Glu Asp Lys Glu Asn Ala Leu Ser Val Leu Asp Lys.
      50      55      60
Ile Tyr Thr Ser Pro Leu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
65      70      75      80
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Val Lys Met Ala Glu Thr Cys Pro Ile Phe
      85      90      95
Tyr Asp Val Phe Phe Ala Val Ala Asn Gly Asn Glu Leu Leu Leu Asp
      100     105     110
Leu Ser Leu Thr Lys Val Asn Ala Thr Glu Pro Glu Arg Thr Ala Met
      115     120     125
Lys Lys Ile Gln Asp Cys Tyr Val Glu Asn Gly Leu Ile Ser Arg Val
      130     135     140
Leu Asp Gly Leu Val Met Thr Thr Ile Ser Ser Ser Lys Asp Cys Met
145     150     155     160
Gly Glu Ala Val Gln Asn Thr Val Glu Asp Leu Lys Leu Asn Thr Leu
      165     170     175
Gly Arg Gly Gly Cys
      180

<210> 57
<211> 144
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Ara h6
<400> 57
Ala Lys Ser Thr Ile Leu Val Ala Leu Leu Ala Leu Val Leu Val Ala
1      5      10      15
His Ala Ser Ala Met Arg Arg Glu Arg Gly Arg Gln Gly Asp Ser Ser
      20      25      30
Ser Cys Glu Arg Gln Val Asp Arg Val Asn Leu Lys Pro Cys Glu Gln
      35      40      45
His Ile Met Gln Arg Ile Met Gly Glu Gln Glu Gln Tyr Asp Ser Tyr
      50      55      60
Asp Ile Arg Ser Thr Arg Ser Ser Asp Gln Gln Gln Arg Cys Cys Asp
65      70      75      80
Glu Leu Asn Glu Met Glu Asn Thr Gln Arg Cys Met Cys Glu Ala Leu
      85      90      95
Gln Gln Ile Met Glu Asn Gln Cys Asp Arg Leu Gln Asp Arg Gln Met
      100     105     110
Val Gln Gln Phe Lys Arg Glu Leu Met Asn Leu Pro Gln Gln Cys Asn
      115     120     125
Phe Arg Ala Pro Gln Arg Cys Asp Leu Asp Val Ser Gly Gly Arg Cys
      130     135     140

<210> 58
<211> 4
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự của gốc liên kết
<400> 58
Gly Gly Cys Gly
1

<210> 59
<211> 178
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> F12
<400> 59
Met Glu Ile Cys Pro Ala Val Lys Arg Asp Val Asp Leu Phe Leu Thr
1      5      10      15
Gly Thr Pro Asp Glu Tyr Val Glu Gln Val Ala Gln Tyr Lys Ala Leu
      20      25      30
Pro Val Val Leu Glu Asn Ala Arg Ile Leu Lys Asn Cys Val Asp Ala
      35      40      45

```

Lys Met Thr Glu Glu Asp Lys Glu Asn Ala Leu Ser Val Leu Asp Lys
 50 55 60
 Ile Tyr Thr Ser Pro Leu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 65 70 75 80
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Val Lys Met Ala Glu Thr Cys Pro Ile Phe
 85 90 95
 Tyr Asp Val Phe Phe Ala Val Ala Asn Gly Asn Glu Leu Leu Leu Asp
 100 105 110
 Leu Ser Leu Thr Lys Val Asn Ala Thr Glu Pro Glu Arg Thr Ala Met
 115 120 125
 Lys Lys Ile Gln Asp Cys Tyr Val Glu Asn Gly Leu Ile Ser Arg Val
 130 135 140
 Leu Asp Gly Leu Val Met Thr Thr Ile Ser Ser Ser Lys Asp Cys Met
 145 150 155 160
 Gly Glu Ala Val Gln Asn Thr Val Glu Asp Leu Lys Leu Asn Thr Leu
 165 170 175

Gly Arg

<210> 60

<211> 153

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

Ala Pro Val Arg Ser Leu Asn Cys Thr Leu Arg Asp Ser Gln Gln Lys
 1 5 10 15
 Ser Leu Val Met Ser Gly Pro Tyr Glu Leu Lys Ala Leu His Leu Gln
 20 25 30
 Gly Gln Asp Met Glu Gln Gln Val Val Phe Ser Met Ser Phe Val Gln
 35 40 45
 Gly Glu Glu Ser Asn Asp Lys Ile Pro Val Ala Leu Gly Leu Lys Glu
 50 55 60
 Lys Asn Leu Tyr Leu Ser Cys Val Leu Lys Asp Asp Lys Pro Thr Leu
 65 70 75 80
 Gln Leu Glu Ser Val Asp Pro Lys Asn Tyr Pro Lys Lys Lys Met Glu
 85 90 95
 Lys Arg Phe Val Phe Asn Lys Ile Glu Ile Asn Asn Lys Leu Glu Phe
 100 105 110
 Glu Ser Ala Gln Phe Pro Asn Trp Tyr Ile Ser Thr Ser Gln Ala Glu
 115 120 125
 Asn Met Pro Val Phe Leu Gly Gly Thr Lys Gly Gly Gln Asp Ile Thr
 130 135 140
 Asp Phe Thr Met Gln Phe Val Ser Ser
 145 150

<210> 61

<211> 114

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Protein hoàn chỉnh cIL-5

<400> 61

Ala Val Glu Asn Pro Met Asn Arg Leu Val Ala Glu Thr Leu Thr Leu
 1 5 10 15
 Leu Ser Thr His Arg Thr Trp Leu Ile Gly Asp Gly Asn Leu Met Ile
 20 25 30
 Pro Thr Pro Glu Asn Lys Asn His Gln Leu Cys Ile Lys Glu Val Phe
 35 40 45
 Gln Gly Ile Asp Thr Leu Lys Asn Gln Thr Ala His Gly Glu Ala Val
 50 55 60
 Asp Lys Leu Phe Gln Asn Leu Ser Leu Ile Lys Glu His Ile Glu Arg
 65 70 75 80
 Gln Lys Lys Arg Cys Ala Gly Glu Arg Trp Arg Val Thr Lys Phe Leu
 85 90 95
 Asp Tyr Leu Gln Val Phe Leu Gly Val Ile Asn Thr Glu Trp Thr Pro
 100 105 110

Glu Ser

<210> 62

<211> 109

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Protein hoàn chỉnh cIL-4

<400> 62

Gly His Asn Phe Asn Ile Thr Ile Lys Glu Ile Ile Lys Met Leu Asn
 1 5 10 15
 Ile Leu Thr Ala Arg Asn Asp Ser Cys Met Glu Leu Thr Val Lys Asp
 20 25 30
 Val Phe Thr Ala Pro Lys Asn Thr Ser Asp Lys Glu Ile Phe Cys Arg
 35 40 45

```

Ala Ala Thr Val Leu Arg Gln Ile Tyr Thr His Asn Cys Ser Asn Arg
  50          55          60
Tyr Leu Arg Gly Leu Tyr Arg Asn Leu Ser Ser Met Ala Asn Lys Thr
  65          70          75          80
Cys Ser Met Asn Glu Ile Lys Lys Ser Thr Leu Lys Asp Phe Leu Glu
          85          90          95
Arg Leu Lys Val Ile Met Gln Lys Lys Tyr Tyr Arg His
  100          105

<210> 63
<211> 113
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Protein hoàn chỉnh cIL-13
<400> 63
Ser Pro Ser Pro Val Thr Pro Ser Pro Thr Leu Lys Glu Leu Ile Glu
  1          5          10          15
Glu Leu Val Asn Ile Thr Gln Asn Gln Ala Ser Leu Cys Asn Gly Ser
          20          25          30
Met Val Trp Ser Val Asn Leu Thr Ala Gly Met Tyr Cys Ala Ala Leu
          35          40          45
Glu Ser Leu Ile Asn Val Ser Asp Cys Ser Ala Ile Gln Arg Thr Gln
          50          55          60
Arg Met Leu Lys Ala Leu Cys Ser Gln Lys Pro Ala Ala Gly Gln Ile
          65          70          75          80
Ser Ser Glu Arg Ser Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ile Gln Leu Val
          85          90          95
Lys Asn Leu Leu Thr Tyr Val Arg Gly Val Tyr Arg His Gly Asn Phe
  100          105          110

Arg
<210> 64
<211> 601
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Protein hoàn chỉnh Ara h1
<400> 64
Lys Ser Ser Pro Tyr Gln Lys Lys Thr Glu Asn Pro Cys Ala Gln Arg
  1          5          10          15
Cys Leu Gln Ser Cys Gln Gln Glu Pro Asp Asp Leu Lys Gln Lys Ala
          20          25          30
Cys Glu Ser Arg Cys Thr Lys Leu Glu Tyr Asp Pro Arg Cys Val Tyr
          35          40          45
Asp Pro Arg Gly His Thr Gly Thr Thr Asn Gln Arg Ser Pro Pro Gly
          50          55          60
Glu Arg Thr Arg Gly Arg Gln Pro Gly Asp Tyr Asp Asp Arg Arg
          65          70          75          80
Gln Pro Arg Arg Glu Glu Gly Gly Arg Trp Gly Pro Ala Gly Pro Arg
          85          90          95
Glu Arg Glu Arg Glu Glu Asp Trp Arg Gln Pro Arg Glu Asp Trp Arg
          100          105          110
Arg Pro Ser His Gln Gln Pro Arg Lys Ile Arg Pro Glu Gly Arg Glu
          115          120          125
Gly Glu Gln Glu Trp Gly Thr Pro Gly Ser His Val Arg Glu Glu Thr
          130          135          140
Ser Arg Asn Asn Pro Phe Tyr Phe Pro Ser Arg Arg Phe Ser Thr Arg
          145          150          155          160
Tyr Gly Asn Gln Asn Gly Arg Ile Arg Val Leu Gln Arg Phe Asp Gln
          165          170          175
Arg Ser Arg Gln Phe Gln Asn Leu Gln Asn His Arg Ile Val Gln Ile
          180          185          190
Glu Ala Lys Pro Asn Thr Leu Val Leu Pro Lys His Ala Asp Ala Asp
          195          200          205
Asn Ile Leu Val Ile Gln Gln Gly Gln Ala Thr Val Thr Val Ala Asn
          210          215          220
Gly Asn Asn Arg Lys Ser Phe Asn Leu Asp Glu Gly His Ala Leu Arg
          225          230          235          240
Ile Pro Ser Gly Phe Ile Ser Tyr Ile Leu Asn Arg His Asp Asn Gln
          245          250          255
Asn Leu Arg Val Ala Lys Ile Ser Met Pro Val Asn Thr Pro Gly Gln
          260          265          270
Phe Glu Asp Phe Phe Pro Ala Ser Ser Arg Asp Gln Ser Ser Tyr Leu
          275          280          285
Gln Gly Phe Ser Arg Asn Thr Leu Glu Ala Ala Phe Asn Ala Glu Phe
          290          295          300
Asn Glu Ile Arg Arg Val Leu Leu Glu Glu Asn Ala Gly Gly Glu Gln
          305          310          315          320

```

Glu	Glu	Arg	Gly	Gln	Arg	Arg	Trp	Ser	Thr	Arg	Ser	Ser	Glu	Asn	Asn
				325					330					335	
Glu	Gly	Val	Ile	Val	Lys	Val	Ser	Lys	Glu	His	Val	Glu	Glu	Leu	Thr
				340				345					350		
Lys	His	Ala	Lys	Ser	Val	Ser	Lys	Lys	Gly	Ser	Glu	Glu	Glu	Gly	Asp
		355					360					365			
Ile	Thr	Asn	Pro	Ile	Asn	Leu	Arg	Glu	Gly	Glu	Pro	Asp	Leu	Ser	Asn
		370				375					380				
Asn	Phe	Gly	Lys	Leu	Phe	Glu	Val	Lys	Pro	Asp	Lys	Lys	Asn	Pro	Gln
385					390					395					400
Leu	Gln	Asp	Leu	Asp	Met	Met	Leu	Thr	Cys	Val	Glu	Ile	Lys	Glu	Gly
				405					410					415	
Ala	Leu	Met	Leu	Pro	His	Phe	Asn	Ser	Lys	Ala	Met	Val	Ile	Val	Val
				420				425					430		
Val	Asn	Lys	Gly	Thr	Gly	Asn	Leu	Glu	Leu	Val	Ala	Val	Arg	Lys	Glu
		435					440					445			
Gln	Gln	Gln	Arg	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Glu	Glu	Asp	Glu	Asp	Glu	Glu
		450				455					460				
Glu	Glu	Gly	Ser	Asn	Arg	Glu	Val	Arg	Arg		Thr	Ala	Arg	Leu	Lys
465					470					475					480
Glu	Gly	Asp	Val	Phe	Ile	Met	Pro	Ala	Ala	His	Pro	Val	Ala	Ile	Asn
				485					490					495	
Ala	Ser	Ser	Glu	Leu	His	Leu	Leu	Gly	Phe	Gly	Ile	Asn	Ala	Glu	Asn
			500					505					510		
Asn	His	Arg	Ile	Phe	Leu	Ala	Gly	Asp	Lys	Asp	Asn	Val	Ile	Asp	Gln
		515					520					525			
Ile	Glu	Lys	Gln	Ala	Lys	Asp	Leu	Ala	Phe	Pro	Gly	Ser	Gly	Glu	Gln
		530				535					540				
Val	Glu	Lys	Leu	Ile	Lys	Asn	Gln	Lys	Glu	Ser	His	Phe	Val	Ser	Ala
545					550					555					560
Arg	Pro	Gln	Ser	Gln	Ser	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Pro	Glu	Lys	Glu	Ser
				565					570					575	
Pro	Glu	Lys	Glu	Asp	Gln	Glu	Glu	Glu	Asn	Gln	Gly	Gly	Lys	Gly	Pro
			580					585					590		
Leu	Leu	Ser	Ile	Leu	Lys	Ala	Phe	Asn							
		595					600								
<210>	65														
<211>	511														
<212>	PRT														
<213>	Trình tự nhân tạo														
<220>															
<223>	Ara h3														
<400>	65														
Met	Ala	Lys	Leu	Leu	Ala	Leu	Ser	Leu	Cys	Phe	Cys	Val	Leu	Val	Leu
1				5					10					15	
Gly	Ala	Ser	Ser	Val	Thr	Phe	Arg	Gln	Gly						

```

Gly Ala Ile Val Thr Val Lys Gly Gly Leu Arg Ile Leu Ser Pro Asp
    275          280          285
Glu Glu Asp Glu Ser Ser Arg Ser Pro Pro Asn Arg Arg Glu Glu Phe
    290          295          300
Asp Glu Asp Arg Ser Arg Pro Gln Gln Arg Gly Lys Tyr Asp Glu Asn
    305          310          315          320
Arg Arg Gly Tyr Lys Asn Gly Ile Glu Glu Thr Ile Cys Ser Ala Ser
    325          330          335
Val Lys Lys Asn Leu Gly Arg Ser Ser Asn Pro Asp Ile Asn Pro Gln
    340          345          350
Ala Gly Ser Leu Arg Ser Val Asn Glu Leu Asp Leu Pro Ile Leu Gly
    355          360          365
Trp Leu Gly Leu Ser Ala Gln His Gly Thr Ile Tyr Arg Asn Ala Met
    370          375          380
Phe Val Pro His Tyr Thr Leu Asn Ala His Thr Ile Val Val Ala Leu
    385          390          395          400
Asn Gly Arg Ala His Val Gln Val Val Asp Ser Asn Gly Asn Arg Val
    405          410          415
Tyr Asp Glu Glu Leu Gln Glu Gly His Val Leu Val Val Pro Gln Asn
    420          425          430
Phe Ala Val Ala Ala Lys Ala Gln Ser Glu Asn Tyr Glu Tyr Leu Ala
    435          440          445
Phe Lys Thr Asp Ser Arg Pro Ser Ile Ala Asn Gln Ala Gly Glu Asn
    450          455          460
Ser Ile Ile Asp Asn Leu Pro Glu Glu Val Val Ala Asn Ser Tyr Arg
    465          470          475          480
Leu Pro Arg Glu Gln Ala Arg Gln Leu Lys Asn Asn Asn Pro Phe Lys
    485          490          495
Phe Phe Val Pro Pro Phe Asp His Gln Ser Met Arg Glu Val Ala
    500          505          510

```