



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

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



1-0038986

(51)^{2020.01} A61K 39/145; C12N 15/44; C07K 14/11 (13) B

(21) 1-2020-01883

(22) 03/09/2018

(86) PCT/JP2018/032537 03/09/2018

(87) WO 2019/045090 A1 07/03/2019

(30) 2017-169230 04/09/2017 JP; 2018-137952 23/07/2018 JP

(45) 26/02/2024 431

(43) 27/07/2020 388

(73) JAPAN as represented by DIRECTOR GENERAL of National Institute of Infectious Diseases (JP)

23-1, Toyama 1-chome, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640 Japan

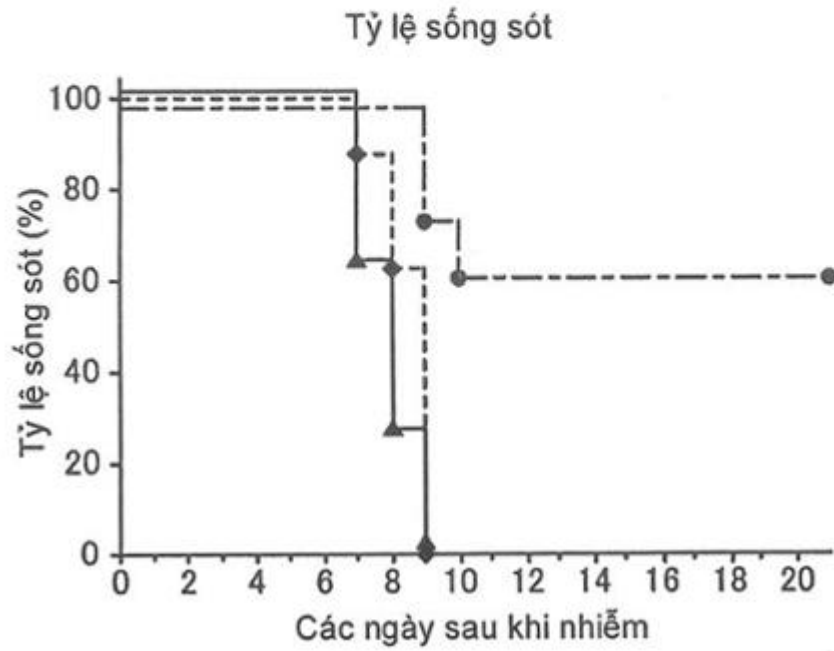
(72) TAKAHASHI Yoshimasa (JP); ADACHI Yu (JP); ATO Manabu (JP).

(74) Công ty TNHH một thành viên Sở hữu trí tuệ VCCI (VCCI-IP CO.,LTD)

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT VACXIN MẢNH VIRUT HA PHÒNG BỆNH CÚM VÀ VACXIN MẢNH VIRUT HA ĐƯỢC SẢN XUẤT TỪ PHƯƠNG PHÁP NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất vacxin mảnh virut HA phòng bệnh cúm mà sinh ra kháng thể mà liên kết với vùng thân HA của bệnh cúm, vùng thân HA ít có khả năng gây ra sự thay đổi kháng nguyên. Vacxin mảnh virut HA phòng bệnh cúm được đem đi xử lý axit. Nhờ quá trình xử lý axit, thu được vacxin mảnh virut HA phòng bệnh cúm mà sinh ra kháng thể liên kết với LAH của vùng thân HA. Vacxin mảnh virut HA phòng bệnh cúm này có khả năng tuyệt vời trong việc kháng lại sự nhiễm các virut cúm khác có tính kháng nguyên khác nhau.

- ▲— Huyết thanh chuột bình thường
- ◆--- Huyết thanh miễn dịch (vacxin mảnh virut)
- Huyết thanh miễn dịch
(Vacxin mảnh virut kiểu dung hợp màng)



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

[0001]

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất vaccin mảnh virus HA phòng bệnh cúm.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

[0002]

Các vaccin agglutinin hồng cầu (sau đây được gọi vắn tắt là “HA”) phòng bệnh cúm hiện nay tạo ra kháng thể kháng HA, nhờ đó tạo ra hiệu quả bảo vệ kháng lại sự lây nhiễm. Kháng thể kháng HA liên kết với một phần của virus được gọi là “vùng đầu” lộ ra ngoài màng virus. Vùng này trải qua sự thay đổi cấu trúc nhiều nhất trong chủng virus. Do vậy, trong vài trường hợp, kháng thể kháng HA có thể không liên kết được với virus mà gây ra sự thay đổi kháng nguyên và khác với chủng vaccin, và vaccin này không tạo ra hiệu quả bảo vệ kháng lại sự lây nhiễm.

[0003]

Gần đây, người ta đã công bố rằng các kháng thể mà liên kết với vùng thân mà ít có khả năng gây ra sự thay đổi kháng nguyên gồm cả các kháng thể bảo vệ kháng lại sự lây nhiễm (tài liệu sáng chế 1). Để tạo ra một cách hiệu quả kháng thể mà liên kết với vùng thân, protein gốc HA có phần thân ổn định đã được phát triển, và thử nghiệm lâm sàng ở người đã được tiến hành: phần thân, mà lúc ban đầu không ổn định, đã được làm ổn định thông qua sự biến đổi nhân tạo hoặc sự gắn kết của các tác nhân liên kết.

[0004]

Tuy nhiên, các vấn đề về sự sản xuất để sử dụng trong thực tế vẫn còn cần được giải quyết, và sự phát triển kháng nguyên vaccin HA mà có thể tạo ra

kháng thể kháng tế bào gốc dễ dàng hơn đã được mong muốn.

Danh sách tài liệu trích dẫn

Tài liệu sáng chế

[0005]

Tài liệu sáng chế 1: Công bố đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa thẩm định (bản dịch của đơn PCT) số 2016-516090

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

[0006]

Xét về các vấn đề nêu trên, mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất vaccin mảnh virus HA phòng bệnh cúm mà tạo ra kháng thể kháng bệnh cúm mà liên kết với vùng thân HA, ít khả năng gây ra sự thay đổi kháng nguyên.

Cách thức giải quyết vấn đề

[0007]

Phương pháp sản xuất vaccin mảnh virus HA theo sáng chế bao gồm bước đem vaccin mảnh virus HA phòng bệnh cúm đi xử lý axit, bằng cách đó tạo ra vaccin mảnh virus HA phòng bệnh cúm mà sinh ra kháng thể mà liên kết với chuỗi xoắn alpha dài (LAH - long alpha helix) của vùng thân HA, và hữu hiệu kháng lại virus cúm mà gây ra sự thay đổi kháng nguyên.

[0008]

Cụ thể, sáng chế là như sau.

[Mục 1]

Phương pháp sản xuất vaccin mảnh virus HA phòng bệnh cúm mà sinh ra kháng thể mà liên kết với LAH của vùng thân HA, phương pháp này bao gồm bước: đem vaccin mảnh virus HA phòng bệnh cúm đi xử lý axit.

[Mục 2]

Phương pháp sản xuất theo mục 1, trong đó vaccin mảnh virus HA phòng bệnh cúm cũng hữu hiệu kháng lại virus cúm mà gây ra sự thay đổi kháng nguyên.

[Mục 3]

Phương pháp sản xuất vaccin mảnh virus HA phòng bệnh cúm mà sinh ra kháng thể mà liên kết với LAH của vùng thân HA và hữu hiệu kháng lại virus cúm mà gây ra sự thay đổi kháng nguyên, phương pháp này bao gồm bước: đem vaccin mảnh virus HA phòng bệnh cúm đi xử lý axit.

[Mục 4]

Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 3, trong đó quá trình xử lý axit được thực hiện ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,4 đến 5,8.

[Mục 5]

Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 4, trong đó vaccin mảnh virus HA phòng bệnh cúm là kiểu H3N2 hoặc kiểu H1N1.

[Mục 6]

Vaccin mảnh virus HA phòng bệnh cúm mà sinh ra kháng thể mà liên kết với LAH của vùng thân HA.

[Mục 7]

Vaccin mảnh virus HA phòng bệnh cúm theo mục 6, cũng hữu hiệu kháng lại virus cúm mà gây ra sự thay đổi kháng nguyên.

[Mục 8]

Vaccin mảnh virus HA phòng bệnh cúm theo mục 6 hoặc 7, mà có vùng thân HA bộc lộ ra bên ngoài.

[Mục 9]

Vaccin mảnh virus HA phòng bệnh cúm theo mục bất kỳ trong số các

mục từ 6 đến 8, trong đó vùng thân HA của kháng nguyên vaccin mảnh virus HA phòng bệnh cúm, mà được lộ ra bên ngoài, tăng cường tính kháng nguyên của LAH của vùng thân HA, và vaccin mảnh virus HA phòng bệnh cúm có khả năng sản sinh kháng thể mà liên kết với LAH của vùng thân HA.

[Mục 10]

Vaccin mảnh virus HA phòng bệnh cúm hữu hiệu kháng lại virus cúm mà gây ra sự thay đổi kháng nguyên, và sinh ra kháng thể mà liên kết với LAH của vùng thân HA, vaccin này được sản xuất bằng cách đem vaccin mảnh virus HA phòng bệnh cúm đi xử lý axit.

[Mục 11]

Vaccin mảnh virus HA phòng bệnh cúm mà được sản xuất bằng cách đem vaccin mảnh virus HA phòng bệnh cúm đi xử lý axit, sản sinh kháng thể mà liên kết với LAH của vùng thân HA, và cũng hữu hiệu kháng lại virus cúm mà gây ra sự thay đổi kháng nguyên.

Hiệu quả của sáng chế

[0009]

Theo sáng chế, vaccin mảnh virus HA phòng bệnh cúm mà sinh ra kháng thể mà liên kết với vùng thân HA của bệnh cúm thu được bằng kỹ thuật đơn giản, vùng thân HA ít có khả năng gây ra sự thay đổi kháng nguyên. Do vậy, thu được vaccin mảnh virus HA phòng bệnh cúm cũng hữu hiệu kháng lại virus cúm mà gây ra sự thay đổi kháng nguyên.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

[0010]

Fig. 1 là giản đồ minh họa virus cúm.

Fig. 2 là biểu đồ thể hiện sự gia tăng độ chuẩn của kháng thể kháng LAH trong huyết thanh của chuột được cấy với vaccin mảnh virus HA H3N2 kiểu dung hợp màng.

Fig. 3 là biểu đồ thể hiện sự cải thiện về khả năng bảo vệ chéo của chuột được cấy với vacxin mảnh virus HA H3N2 kiểu dung hợp màng kháng lại thể biến dị kháng nguyên.

Fig. 4 là biểu đồ thể hiện sự gia tăng về độ chuẩn của kháng thể kháng LAH trong huyết thanh của chuột được cấy với vacxin mảnh virus HA H1N1 kiểu dung hợp màng.

Fig. 5 là biểu đồ thể hiện sự cải thiện về khả năng bảo vệ chéo của chuột được cấy với vacxin mảnh virus HA H1N1 kiểu dung hợp màng kháng lại thể biến dị kháng nguyên.

Fig. 6 thể hiện các biểu đồ cho thấy rằng kháng thể đơn dòng gắn kết LAH liên kết với vacxin mảnh virus HA kiểu dung hợp màng mạnh hơn so với vacxin mảnh virus HA hiện tại.

Mô tả vắn tắt sáng chế

[0011]

Các phương án của sáng chế sẽ được mô tả chi tiết dưới đây với sự tham khảo các hình vẽ đính kèm. Tuy nhiên, các phương án chỉ nhằm làm cho nguyên lý của sáng chế dễ hiểu hơn, và phạm vi của sáng chế không bị giới hạn ở các phương án dưới đây. Các phương án khác, trong đó kết cấu của các phương án sau đó đã được thay đổi một cách thích hợp bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, cũng được bao hàm trong phạm vi của sáng chế.

[0012]

Phương pháp sản xuất vacxin mảnh virus HA phòng bệnh cúm theo phương án này bao gồm bước đem vacxin mảnh virus HA phòng bệnh cúm đi xử lý axit.

[0013]

Vacxin mảnh virus HA phòng bệnh cúm được bào chế thông qua quá trình xử lý vacxin virus nguyên vẹn bằng ete để loại bỏ các thành phần lipid mà trở thành chất gây sốt. Vacxin mảnh virus HA phòng bệnh cúm có protein HA

làm thành phần chính bởi vì vacxin mảnh virus HA phòng bệnh cúm được tạo ra bằng cách thu gom protein HA, mà cần thiết cho sự gây miễn dịch, từ các bề mặt của các hạt virus bằng cách li tâm gradien tỷ trọng.

[0014]

Glycoprotein được gọi là “protein dằm” nhô ra khỏi bề mặt của virus cúm (FIG. 1). Virus cúm A có hai loại protein dằm, cụ thể là, HA và NA (neuraminidaza), mà trợ giúp virus gây ra sự lây nhiễm. HA liên kết với tế bào bị lây nhiễm và trợ giúp virus thâm nhập vào trong tế bào. HA thường gây ra sự thay đổi kháng nguyên. NA không liên kết với tế bào bị lây nhiễm từ HA, và đóng vai trò giải phóng các virus được sao chép khỏi tế bào.

[0015]

HA của virus cúm A được phân chia thành hai vùng, cụ thể là, vùng đầu và vùng thân (FIG. 1). Vùng đầu chứa vị trí gắn kết thụ thể ở đó virus liên kết với tế bào đích. Vùng thân chứa chuỗi peptit dung hợp cần cho sự dung hợp màng giữa màng virus và màng tế bào của tế bào đích.

[0016]

Quá trình xử lý axit trên vacxin mảnh virus HA phòng bệnh cúm làm thay đổi cấu trúc của protein HA thành cấu trúc được gọi là kiểu dung hợp màng. Trong protein HA kiểu dung hợp màng, vùng thân lộ ra bên ngoài từ màng virus thay vì vùng đầu, với sự thay đổi lớn về cấu trúc nhằm thích ứng với gốc kháng nguyên. Các tác giả sáng chế đã nhận thấy *in vivo* rằng khi protein HA kiểu dung hợp màng được sử dụng làm vacxin, kháng thể mà liên kết với LAH của vùng thân được tạo ra, và rằng kháng thể này có hiệu quả bảo vệ kháng lại chủng virus mà gây ra sự thay đổi kháng nguyên. Sáng chế đã được hoàn thành dựa trên thực tế này.

[0017]

Quá trình xử lý axit không bị giới hạn cụ thể, và có thể được thực hiện ở độ pH, ví dụ, nằm trong khoảng từ 3,0 đến 6,5, tốt hơn là nằm trong khoảng từ

4,0 đến 6,0, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 4,4 đến 5,8. Axit để sử dụng trong quá trình xử lý axit không bị giới hạn cụ thể, và có thể là, ví dụ, axit phosphoric, axit xitric, axit maleic, hoặc bất kỳ axit thích hợp khác.

[0018]

Dựa vào các sự khác biệt về tính kháng nguyên, HA của virus cúm A được phân loại thành 18 kiểu phụ (H1 đến H18), và NA được phân loại thành 9 kiểu phụ (N1 đến N9). Vacxin mảnh virus HA phòng bệnh cúm theo sáng chế có thể ứng dụng cho tất cả các kiểu phụ này. Ngoài ra, phương pháp sản xuất vacxin mảnh virus HA phòng bệnh cúm theo sáng chế có thể sản xuất vacxin mà hữu hiệu kháng lại không chỉ virus cúm A, mà còn cả virus cúm B có HA.

[0019]

Vacxin HA mảnh vi rút phòng bệnh cúm thu được bằng phương pháp sản xuất theo sáng chế sản sinh kháng thể mà liên kết với LAH mà ít khả năng gây ra sự biến đổi. Do vậy, vacxin có thể bảo vệ chéo kháng lại virus cúm, mà được biết là thể biến dị kháng nguyên, miễn là virus có cùng một kiểu phụ HA. Hơn nữa, vacxin HA mảnh vi rút phòng bệnh cúm thu được bằng phương pháp sản xuất theo sáng chế có thể phản ứng chéo giữa các kiểu phụ HA của cá trình tự axit amin tương tự của LAH (ví dụ, H3 và H7).

[0020]

Trong phương án được ưu tiên, vacxin mảnh virus HA phòng bệnh cúm thu được bằng phương pháp sản xuất theo sáng chế liên kết với kháng thể đơn dòng gắn kết LAH mạnh hơn so với vacxin mảnh virus HA hiện tại. Ví dụ, vacxin mảnh virus HA phòng bệnh cúm liên kết với kháng thể đơn dòng gắn kết LAH mạnh hơn ít nhất là 1,05 lần, tốt hơn là ít nhất là 1,1 lần, tốt hơn nữa là ít nhất là 1,5 lần, và thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất là hai lần so với vacxin mảnh virus HA hiện tại. Trong tình huống này, “vacxin mảnh virus HA phòng bệnh cúm liên kết mạnh hơn ít nhất là 1,05 lần, ít nhất là 1,1 lần, ít nhất là 1,5 lần, hoặc ít nhất là hai lần so với vacxin mảnh virus HA hiện tại” có nghĩa là, ví dụ, mức tương hỗ của nồng độ kháng thể ở thời điểm khi mức hấp thụ được xác

định bằng phép hồi quy là 0,7 ít nhất là 1,05 lần, ít nhất là 1,1 lần, ít nhất là 1,5 lần, hoặc ít nhất là hai lần mức tương hỗ của nồng độ kháng thể của vaccin mảnh virus HA hiện tại. Trong phương án được ưu tiên, khả năng gắn kết của vaccin mảnh virus HA phòng bệnh cúm theo sáng chế với kháng thể đơn dòng gắn kết LAH là cao hơn so với khả năng gắn kết của vaccin mảnh virus HA hiện tại. Mặc dù giới hạn trên không bị giới hạn cụ thể, khả năng gắn kết có thể nằm trong khoảng, ví dụ, từ 1,05 đến 200 lần, từ 1,1 đến 150 lần, từ 1,5 đến 100 lần, hoặc từ 2 đến 50 lần. Theo cách khác, phạm vi của khả năng gắn kết của vaccin mảnh virus HA phòng bệnh cúm theo sáng chế với kháng thể đơn dòng gắn kết LAH so với khả năng gắn kết của vaccin mảnh virus HA hiện tại có thể được biểu hiện bởi tổ hợp giá trị giới hạn dưới được chọn từ 1,05, 1,1, 1,5, 2, 3, 4, và 5 và giá trị giới hạn trên được chọn từ 200, 150, 100, 50, 30, và 20. Để đo khả năng gắn kết của vaccin mảnh virus HA phòng bệnh cúm với kháng thể đơn dòng gắn kết LAH, phương pháp bất kỳ có thể được sử dụng mà không có giới hạn cụ thể, và phương pháp thông thường đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể được sử dụng. Ví dụ, khả năng gắn kết có thể được đo bằng phương pháp được mô tả trong các ví dụ trong bản mô tả này.

[0021]

Trong bản mô tả này, cụm từ “kháng thể đơn dòng gắn kết LAH” có nghĩa là kháng thể đơn dòng mà liên kết với LAH. Để sản xuất kháng thể đơn dòng, phương pháp bất kỳ có thể được sử dụng mà không có giới hạn cụ thể, và phương pháp thông thường đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể được sử dụng. Trong quá trình đo khả năng gắn kết của vaccin mảnh virus HA phòng bệnh cúm với kháng thể đơn dòng gắn kết LAH, giả sử rằng kháng thể đơn dòng gắn kết LAH có khả năng gắn kết với peptit tương ứng với ít nhất là một phần của LAH của virus cúm mà từ đó thu được vaccin mảnh virus HA phòng bệnh cúm.

[0022]

Trong bản mô tả này, cụm từ “vacxin mảnh virus HA hiện tại” có nghĩa là vacxin mà từ đó các thành phần lipid mà trở thành chất gây sốt được loại bỏ nhờ quá trình xử lý vacxin virus nguyên vẹn bằng ete, và có thể được sản xuất bằng phương pháp được mô tả trong ví dụ 1 trong bản mô tả này. Vacxin mảnh virus HA hiện tại cũng có thể là vacxin mảnh virus HA phòng bệnh cúm được sản xuất mà không cần đem đi xử lý axit, trái ngược với vacxin mảnh virus HA phòng bệnh cúm theo sáng chế được bào chế bằng phương pháp gồm có quá trình xử lý axit sau đó.

[0023]

Phương pháp sản xuất vacxin mảnh virus HA phòng bệnh cúm theo sáng chế có thể bao gồm bước bổ sung tá dược. Các ví dụ về tá dược bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các muối nhôm như nhôm hydroxit và nhôm phosphat, chitosan, oligodeoxynucleotit, và các nhũ tương nước trong dầu. Trong số các chất nêu trên, nhôm hydroxit là được ưu tiên, và sử dụng nhôm hydroxit làm tá dược có thể tăng cường khả năng sinh miễn dịch.

[0024]

Vacxin mảnh virus HA phòng bệnh cúm thu được bằng phương pháp sản xuất theo sáng chế có thể được sử dụng, ví dụ, để chủng bổ sung sau thời gian định trước sau quá trình chủng ban đầu. Thời gian sau khi chủng ban đầu và trước khi chủng bổ sung không bị giới hạn cụ thể, nhưng có thể là, ví dụ, hai mươi ngày đến ba năm, tốt hơn là ba tháng đến hai năm, tốt hơn nữa là sáu tháng đến một năm. Lượng vacxin mảnh virus HA phòng bệnh cúm cho quá trình chủng ban đầu và quá trình chủng bổ sung không bị giới hạn cụ thể, nhưng có thể là, ví dụ, từ 1 µg đến 200 µg, tốt hơn là từ 10 µg đến 30 µg, tốt hơn nữa là 15 µg, trên một liều dùng. Liều dùng đơn là, ví dụ, 0,5 mL. Phương pháp sử dụng bất kỳ có thể được sử dụng cho quá trình chủng ban đầu và quá trình chủng bổ sung mà không có sự giới hạn cụ thể, và ví dụ, có thể dùng qua đường mũi, dưới da, trong da, qua da, trong mắt, niêm mạc, hoặc đường miệng. Dùng qua đường trong cơ là được ưu tiên.

[0025]

Vaccin mảnh virus HA phòng bệnh cúm thu được bằng phương pháp sản xuất theo sáng chế có tác dụng bảo vệ kháng lại chủng virus mà gây ra sự thay đổi kháng nguyên. Ví dụ, nếu vaccin mảnh virus HA hiện tại được bào chế từ các hạt virus cúm H3N2 (A/Fujian/411/02 (H3N2)) và được đem đi xử lý axit, vaccin có thể có tác dụng bảo vệ kháng lại sự lây nhiễm không chỉ chủng A/Fujian/411/02 (H3N2), mà còn các chủng A/Guizhou/54/89 (H3N2), A/OMS/5389/88 (H3N2), A/Beijing/32/92 (H3N2), A/England/427/88 (H3N2), A/Johannesburg/33/94 (H3N2), A/Leningrad/360/86 (H3N2), A/Mississippi/1/85 (H3N2), A/Philippines/2/82 (H3N2), A/Shangdong/9/93 (H3N2), A/Shanghai/16/89 (H3N2), A/Shanghai/24/90 (H3N2), A/Sichuan/2/87 (H3N2), A/Kitakyushu/159/93 (H3N2), A/Akita/1/94 (H3N2), A/Panama/2007/99 (H3N2), A/Wyoming/03/03 (H3N2), A/New York/55/2004 (H3N2), hoặc A/Hiroshima/52/2005 (H3N2). Ngoài ra, ví dụ, nếu vaccin mảnh virus HA hiện tại được bào chế từ các hạt virus cúm H1N1 (A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)) và được đem đi xử lý axit, vaccin cũng có thể có tác dụng bảo vệ kháng lại sự lây nhiễm của không chỉ chủng A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), mà còn các chủng A/Narita/1/09 (H1N1), A/Beijing/262/95 (H1N1), A/Brazil/11/78 (H1N1), A/Chile/1/83 (H1N1), A/New Jersey/8/76 (H1N1), A/Taiwan/1/86 (H1N1), A/Yamagata/32/89 (H1N1), A/New Caledonia/20/99 (H1N1), A/Solomon Islands/3/2006 (H1N1), A/Brisbane/59/2007 (H1N1), hoặc A/Mexico/4108/2009 (H1N1) chẳng hạn.

Ví dụ thực hiện sáng chế

[0026]

1. Bào chế vaccin mảnh virus HA

Tween 80 được bổ sung vào các hạt virus cúm H3N2 (chủng X31) hoặc các hạt virus cúm H1N1 (chủng A/Puerto Rico/8/34) được tạo huyền phù trong nước muối đệm phosphat đến nồng độ cuối là 0,2%, và được tạo huyền phù trong đó. Diethyl ete được bổ sung và được tạo huyền phù, và huyền phù được để

lắng cho đến khi lớp nước và lớp diethyl ete được tách riêng hoàn toàn, và sau đó lớp diethyl ete được loại bỏ. Sau khi lặp lại quá trình chiết ete này, diethyl ete còn lại trong lớp nước được chưng cất ở áp suất thường để thu vaccin mảnh virus HA.

[0027]

2. Xử lý axit

Vaccin mảnh virus HA được tạo huyền phù trong nước muối đệm phosphat, và quá trình xử lý axit sau đó được tiến hành bằng cách bổ sung dung dịch đệm xitrat 0,15M (độ pH = 3,5) để làm cho độ pH đạt đến 5,0.

Sau khi để lắng ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút, dung dịch đệm Tris 1M (độ pH = 8,0) được bổ sung sao cho độ pH trở về 7,3. Sau đó, quá trình li tâm được tiến hành để thu vaccin mảnh virus HA kiểu dung hợp màng. Formalin được bổ sung vào vaccin mảnh virus HA kiểu dung hợp màng được bào chế như vậy đến nồng độ cuối là 0,05%, và được để lắng trong vài ngày.

[0028]

Vaccin mảnh virus HA hiện tại được bào chế theo cách giống như được mô tả ở mục 1 ở trên, chỉ khác là không có quá trình xử lý axit.

[0029]

3. Đo độ chuẩn của kháng thể kháng LAH bằng ELISA

3-1. Chứng vaccin cúm H3N2

Chuột BALB/c (giống cái, từ 6 đến 12 tuần tuổi) được chủng trong phúc mạc với vaccin mảnh virus HA H3N2 hiện tại hoặc vaccin mảnh virus HA kiểu dung hợp màng (10µg vaccin + 20µg tá dược AddaVax (InvivoGen) được hòa tan trong nước muối đệm phosphat đến thể tích lỏng là 200µl). Hai mươi tám ngày sau khi chủng ban đầu, chuột được chủng trong phúc mạc vaccin HA kiểu dung hợp màng (chỉ 10µg vaccin được hòa tan trong nước muối đệm phosphat đến thể tích lỏng là 200µl). Ít nhất là 14 ngày sau khi chủng bổ sung, máu được thu gom từ chuột được chủng vaccin, từ đó huyết thanh được thu thập.

[0030]

3-2. Đo bằng ELISA

Nồng độ của kháng thể kháng LAH trong huyết thanh của chuột BALB/c trong phúc mạc được cấy với vacxin mảnh virus HA H3N2 hiện tại hoặc vacxin mảnh virus HA kiểu dung hợp màng được đo bằng ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay - thử nghiệm hấp thu miễn dịch liên kết enzym) theo cách sau đây.

[0031]

Cụ thể, peptit tổng hợp (H3; Ac-RIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSMNKLFEKTRRQLRENADYKDDDDKC) (SEQ ID NO: 1) tương ứng với một phần (chuỗi xoắn alpha dài) của phần thân được hòa tan trong nước muối đệm phosphat (độ pH = 7,3) ở 10µg/ml, và được bổ sung vào các đĩa có 96 lỗ khoảng 100µl mỗi lỗ. Sau khi để qua đêm ở 4°C, từng lỗ được rửa ba lần bằng nước muối đệm phosphat, và 150µl nước muối đệm phosphat chứa 1% albumin huyết thanh bò được bổ sung. Sau khi để ở nhiệt độ trong phòng trong hai giờ, mỗi lỗ được rửa ba lần bằng nước muối đệm phosphat. Sau đó, 100µl huyết thanh của chuột được pha loãng hàng loạt với dung dịch đệm phosphat chứa 0,05% Tween 20 và 1% albumin huyết thanh bò, và 100µl kháng thể đơn dòng chuẩn có nồng độ đã biết (H3; tên dòng V15-5) được bổ sung vào từng lỗ. Sau khi để ở nhiệt độ trong phòng trong hai giờ, mỗi lỗ được rửa ba lần bằng nước muối đệm phosphat (chứa 0,05% Tween 20), và 100µl kháng thể kháng IgG của chuột được đánh dấu peroxidaza (Southern Biotech) được pha loãng với nước muối đệm phosphat chứa 0,05% Tween 20 và 1% albumin huyết thanh bò được bổ sung vào từng lỗ. Sau khi để ở nhiệt độ trong phòng trong hai giờ, mỗi lỗ được rửa ba lần với nước muối đệm phosphat (chứa 0,05% Tween 20). Sau đó, 30mg viên nén o-phenylendiamin (Sigma) và 24µl của dung dịch hydro peroxit 30% (30% thể tích/thể tích; Sigma) được bổ sung vào 60ml dung dịch đệm xitrat (độ pH = 5,0) làm chất nền, và 100µl hỗn hợp thu được được bổ sung vào từng lỗ. Sau khi hiện

màu, 50µl axit sulfuric 2N (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) được bổ sung để dừng phản ứng, và giá trị hấp thụ ở 490nm được đo sử dụng thiết bị đọc Microplate Reader 450 (Biorad).

[0032]

Như được thể hiện ở FIG. 2, độ chuẩn của kháng thể kháng LAH trong huyết thanh của chuột BALB/c được chủng vaccin mảnh virus HA kiểu dung hợp màng vào trong phúc mạc cao hơn nhiều so với độ chuẩn của kháng thể kháng LAH trong huyết thanh của chuột BALB/c được chủng vaccin mảnh virus HA hiện tại vào trong phúc mạc.

[0033]

4. Bảo vệ chéo kháng lại thể biến dị kháng nguyên

Trong thử nghiệm bảo vệ kháng lại sự lây nhiễm virus H3N2, 200µl huyết thanh thu được từ chuột không được chủng, 200µl huyết thanh thu được từ chuột được chủng vaccin mảnh virus HA H3N2 hiện tại, hoặc 200µl huyết thanh thu được từ chuột được chủng vaccin mảnh virus HA kiểu dung hợp màng được tiêm vào chuột BALB/c theo đường trong phúc mạc (giống cái, từ 6 đến 12 tuần tuổi).

[0034]

Ba giờ sau khi sử dụng huyết thanh, virus cúm H3N2 khác (A/Guizhou/54/89) có tính kháng nguyên khác với chủng vaccin được sử dụng theo đường trong mũi ở 5 liều gây tử vong đối với chuột 50 (gấp năm lần lượng virus gây tử vong 50% số lượng chuột) dưới điều kiện gây mê.

[0035]

Chuột được cân và được quan sát hàng ngày trong 21 ngày từ khi nhiễm virus để nghiên cứu sự thay đổi về thể trọng và tỷ lệ sống sót. Chuột mà hao hụt 25% trọng lượng của chúng bị loại bỏ.

[0036]

Như được thể hiện ở Fig. 3, về chuột BALB/c được chủng vaccin mảnh virut HA kiểu dung hợp màng, sự giảm tỷ lệ sống sót được kìm hãm đáng kể và sau ngày thứ chín sau khi nhiễm virut cúm H3N2 khác có tính kháng nguyên khác nhau.

[0037]

5. Đo độ chuẩn của kháng thể kháng LAH bằng ELISA

5-1. Các hạt virut cúm H1N1

Chuột C57BL/6 (giống cái, từ 6 đến 12 tuần tuổi) được chủng theo đường trong phúc mạc với vaccin mảnh virut HA H1N1 hiện tại hoặc vaccin mảnh virut HA kiểu dung hợp màng (10 μ g vaccin + 10 μ g CpG-ODN 1760 được tạo huyền phù trong nước muối đệm phosphat và được trộn với thể tích tương đương của tá dược không hoàn chỉnh Freund (ROCKLAND) đến thể tích lỏng 200 μ l). Hai mươi tám ngày sau lần chủng ban đầu, chuột được chủng theo đường trong phúc mạc với vaccin mảnh virut HA kiểu dung hợp màng (10 μ g vaccin + 10 μ g CpG-ODN được tạo huyền phù trong nước muối đệm phosphat và được trộn với thể tích tương đương của tá dược không hoàn chỉnh Freund (ROCKLAND) đến thể tích lỏng 200 μ l, theo cách giống như lần chủng ban đầu). Ít nhất 14 ngày sau khi chủng bổ sung, máu thu được từ chuột được chủng vaccin, từ đó thu được huyết thanh.

[0038]

5-2. Đo bằng ELISA

Nồng độ của kháng thể kháng LAH trong huyết thanh của chuột C57BL/6 được chủng theo đường trong phúc mạc với vaccin mảnh virut HA H1N1 hiện tại hoặc vaccin mảnh virut HA kiểu dung hợp màng được đo bằng ELISA theo cách sau đây.

[0039]

Quá trình đo được tiến hành theo cách giống như được mô tả ở trên, chỉ khác là peptit tổng hợp (H1;

Ac-RIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLNERTLDYHDSNVKNLYEK
VRSQKNNADYKDDDDKC) (SEQ ID NO: 2) tương ứng với một phần
(chuỗi xoắn alpha dài) của phần thân được sử dụng và kháng thể đơn dòng
chuẩn có nồng độ đã biết (H1; tên dòng F2) được sử dụng.

[0040]

Như được thể hiện ở Fig. 4, độ chuẩn của kháng thể kháng LAH trong
huyết thanh của chuột C57BL/6 được chủng theo đường trong phúc mạc với
vacxin mảnh virus HA kiểu dung hợp màng là cao hơn nhiều so với độ chuẩn
của kháng thể kháng LAH trong huyết thanh chuột C57BL/6 được chủng theo
đường trong phúc mạc với vacxin mảnh virus HA hiện tại.

[0041]

6. Bảo vệ chéo kháng lại thể biến dị kháng nguyên

Trong thử nghiệm bảo vệ kháng lại sự nhiễm virus H1N1, 200µl huyết
thanh thu được từ chuột không được chủng, 200µl huyết thanh thu được từ chuột
được chủng vacxin mảnh virus HA H1N1 hiện tại, hoặc 200µl huyết thanh thu
được từ chuột được chủng vacxin mảnh virus HA kiểu dung hợp màng được
dùng theo đường trong phúc mạc cho chuột C57BL/6 (giống cái, từ 6 đến 12
tuần tuổi).

[0042]

Ba giờ sau khi sử dụng huyết thanh, virus cúm H1N1 khác
(A/Narita/1/09) có tính kháng nguyên khác với chủng vacxin được sử dụng
trong mũi ở 5 liều gây tử vong cho chuột 50 (gấp năm lần lượng virus gây tử
vong 50% số lượng chuột) dưới điều kiện gây mê.

[0043]

Chuột được quan sát hàng ngày trong 20 ngày từ khi nhiễm virus để
nghiên cứu tỷ lệ sống sót. Như được thể hiện ở Fig. 5, về chuột C57BL/6 được
chủng vacxin mảnh virus HA kiểu dung hợp màng, sự giảm tỷ lệ sống sót bị kìm
hãm đáng kể và sau ngày thứ chín sau khi nhiễm virus cúm H1N1 khác có tính

kháng nguyên khác nhau.

[0044]

7. Khả năng gắn kết kháng thể với LAH epitop

Sự gắn kết của các kháng thể đơn dòng kháng LAH được bào chế từ máu ngoại biên của người hoặc chuột nhiễm chủng X31 với vacxin mảnh virut HA hiện tại hoặc vacxin mảnh virut HA kiểu dung hợp màng được đo bằng ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay – thử nghiệm hấp thu miễn dịch liên kết enzym). Vacxin mảnh virut HA hiện tại hoặc vacxin mảnh virut HA kiểu dung hợp màng của virut cúm H3N2 (chủng X31) được hòa tan trong nước muối đệm phosphat (độ pH = 7,3), và được bổ sung vào đĩa có 96 lỗ với lượng 50 μ l mỗi lỗ. Sau khi để qua đêm ở nhiệt độ 4°C, mỗi lỗ được rửa ba lần với nước muối đệm phosphat, và 150 μ l nước muối đệm phosphat chứa 1% albumin huyết thanh bò được bổ sung. Sau khi để ở nhiệt độ trong phòng trong hai giờ, mỗi lỗ được rửa ba lần với nước muối đệm phosphat (chứa 0,05% Tween 20), và 50 μ l kháng thể đơn dòng gắn kết LAH được pha loãng hàng loạt với dung dịch đệm phosphat chứa 1% albumin huyết thanh bò được bổ sung. Sau khi để qua đêm ở nhiệt độ 4°C, mỗi lỗ được rửa ba lần với nước muối đệm phosphat (chứa 0,05% Tween 20), và 100 μ l kháng thể kháng IgG của chuột được đánh dấu peroxidaza (Southern Biotech) được pha loãng với nước muối đệm phosphat chứa 0,05% Tween 20 và 1% albumin huyết thanh bò được bổ sung vào từng lỗ. Sau khi để ở nhiệt độ trong phòng trong hai giờ, mỗi lỗ được rửa ba lần với nước muối đệm phosphat (chứa 0,05% Tween 20). Sau đó, 30mg viên nén o-phenylendiamin (Sigma) và 24 μ l dung dịch hydro peroxit 30% (30% thể tích/thể tích; Sigma) được bổ sung vào 60ml dung dịch đệm xitrat (độ pH = 5,0) là chất nền, và 50 μ l hỗn hợp thu được được bổ sung vào từng lỗ. Sau khi hiện màu, 25 μ L axit sulfuric 1mol/L (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) được bổ sung để dừng phản ứng, và giá trị hấp thu ở 490nm được đo sử dụng thiết bị đọc Microplate Reader 450 (Biorad). Sự thay đổi về khả năng gắn kết được tính từ giá trị hấp đo được đối với vacxin mảnh virut HA hiện tại hoặc vacxin mảnh virut HA kiểu

dung hợp màng.

[0045]

Như được thể hiện ở Fig. 6, khả năng gắn kết của kháng thể đơn dòng gắn kết LAH với vacxin mảnh virut HA kiểu dung hợp màng lớn hơn gấp 1,05 đến 21 lần so với khả năng gắn kết với vacxin mảnh virut HA hiện tại. Các kết quả cho thấy rằng quá trình xử lý axit của vacxin mảnh virut HA tăng cường khả năng gắn kết của kháng thể với LAH epitop.

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

[0046]

Sáng chế hữu ích để sản xuất các vacxin phòng bệnh cúm.

[Danh mục trình tự]

[0047]

SEQ ID NO: 1, 2: Peptit tổng hợp

[Liệt kê trình tự]

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất vacxin mảnh virus HA phòng bệnh cúm mà sinh ra kháng thể mà liên kết với LAH của vùng thân HA, phương pháp này bao gồm bước: đưa vacxin mảnh virus HA phòng bệnh cúm đi xử lý axit.
2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó vacxin mảnh virus HA phòng bệnh cúm còn hữu hiệu kháng lại virus cúm mà gây ra sự thay đổi kháng nguyên.
3. Phương pháp sản xuất vacxin mảnh virus HA phòng bệnh cúm mà sinh ra kháng thể mà liên kết với LAH của vùng thân HA và hữu hiệu kháng lại virus cúm mà gây ra sự thay đổi kháng nguyên, phương pháp này bao gồm bước: đưa vacxin mảnh virus HA phòng bệnh cúm đi xử lý axit.
4. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó việc xử lý axit được tiến hành ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,4 đến 5,8.
5. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó vacxin mảnh virus HA phòng bệnh cúm là typ H3N2 hoặc typ H1N1.
6. Vacxin mảnh virus HA phòng bệnh cúm mà sinh ra kháng thể mà liên kết với LAH của vùng thân HA.
7. Vacxin mảnh virus HA phòng bệnh cúm theo điểm 6, mà hữu hiệu kháng lại virus cúm mà gây ra sự thay đổi kháng nguyên.
8. Vacxin mảnh virus HA phòng bệnh cúm theo điểm 6 hoặc 7, mà có vùng thân HA bộc lộ ra bên ngoài.
9. Vacxin mảnh virus HA phòng bệnh cúm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 6 đến 8, trong đó vùng thân HA của kháng nguyên vacxin mảnh virus HA phòng bệnh cúm, mà được lộ ra bên ngoài, tăng cường tính kháng nguyên của LAH của vùng thân HA, và vacxin mảnh virus HA phòng bệnh cúm có khả năng sản sinh kháng thể mà liên kết với LAH của vùng thân HA.
10. Vacxin mảnh virus HA phòng bệnh cúm mà hữu hiệu kháng lại virus cúm mà gây ra sự thay đổi kháng nguyên, và sinh ra kháng thể mà liên kết với LAH của vùng thân HA, vacxin này được sản xuất bằng cách đem vacxin mảnh virus HA

phòng bệnh cúm đi xử lý axit.

11. Vacxin mảnh virut HA phòng bệnh cúm mà được sản xuất bằng cách đem vacxin mảnh virut HA phòng bệnh cúm đi xử lý axit, sinh ra kháng thể mà liên kết với LAH của vùng thân HA, và còn hữu hiệu kháng lại virut cúm mà gây ra sự thay đổi kháng nguyên.

FIG.1

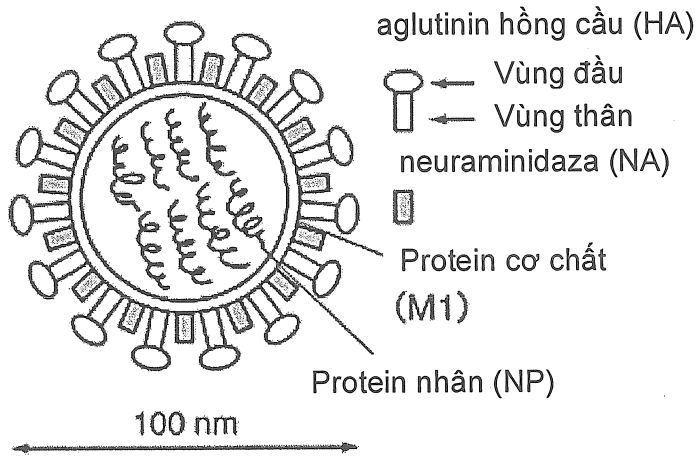


FIG.2

Độ chuẩn IgG của chuỗi xoắn alpha dài

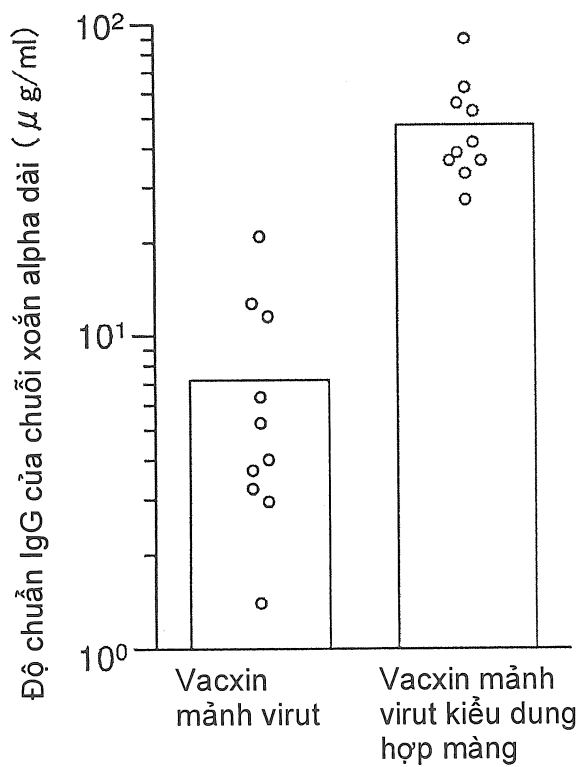


FIG.3

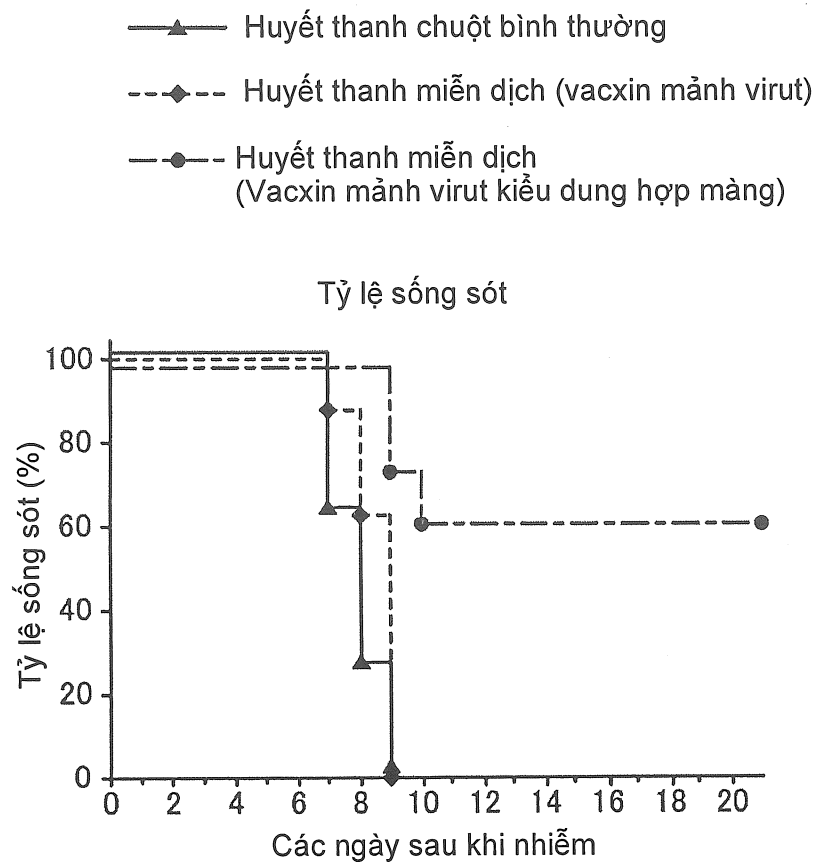


FIG.4

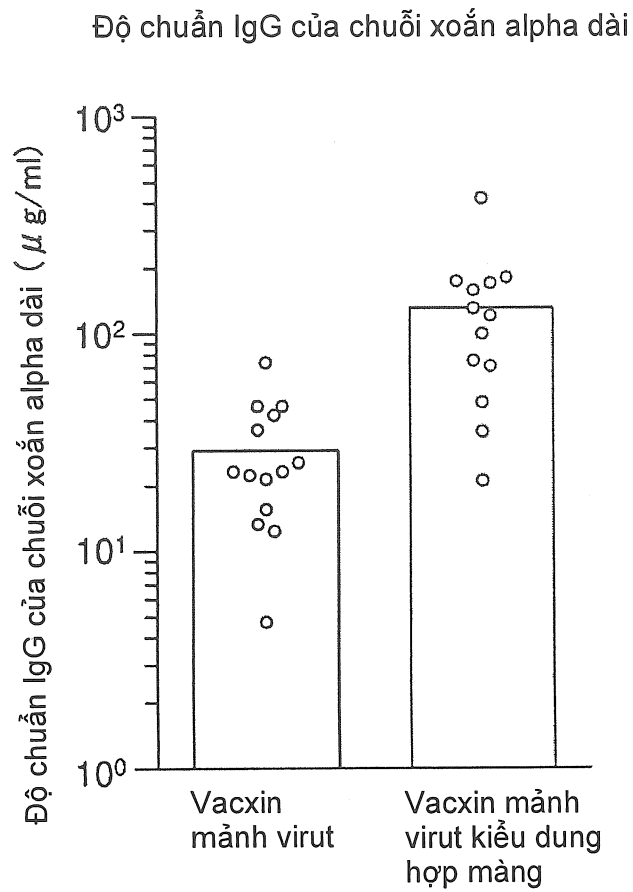


FIG.5

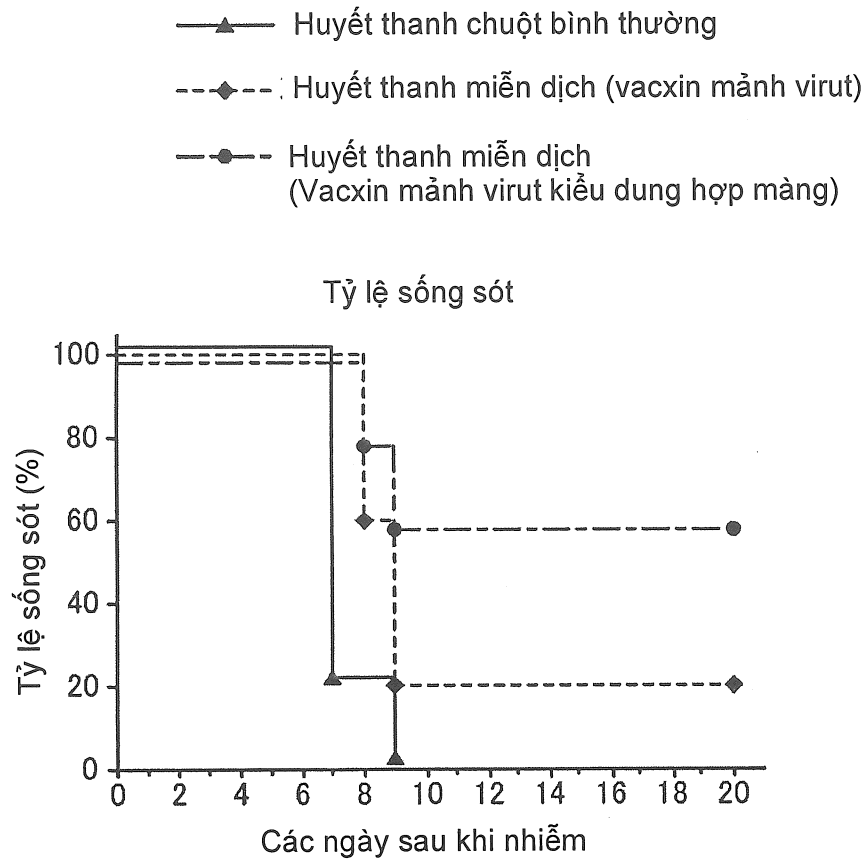
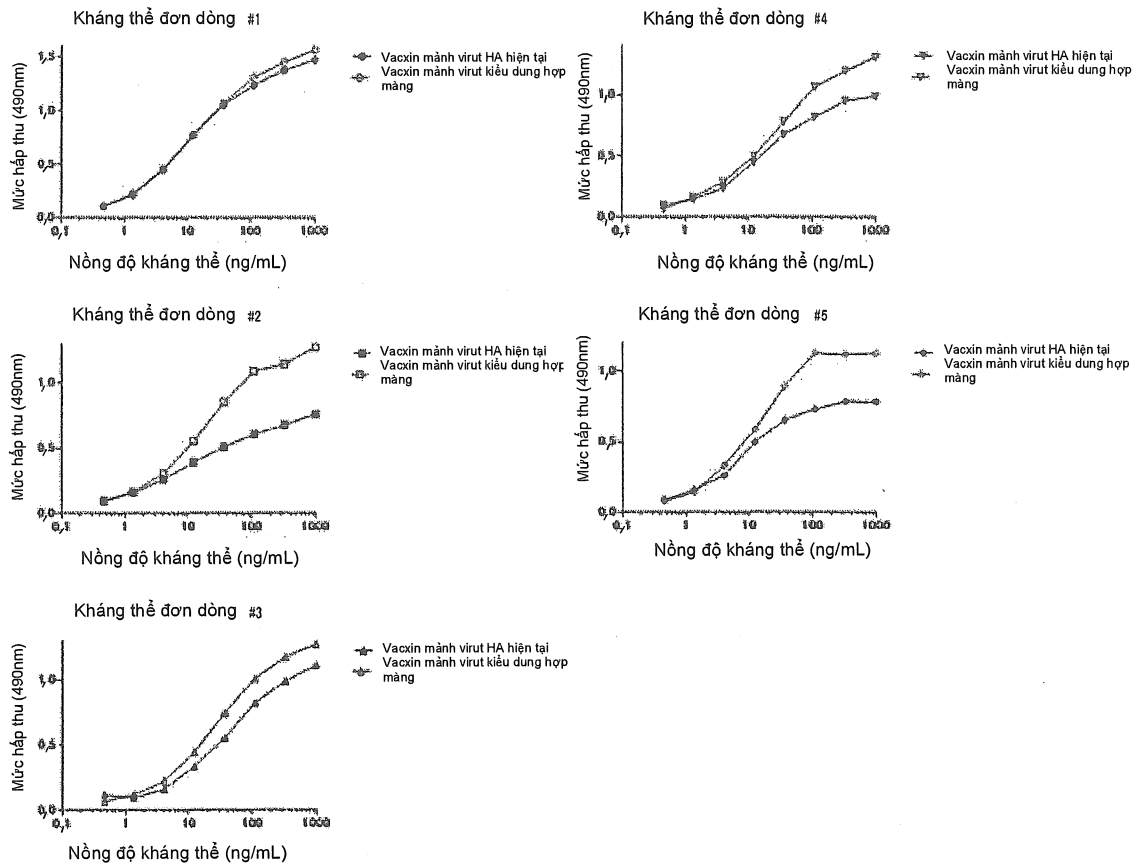


FIG.6



Danh mục trình tự

<110> Japan Health Sciences Foundation
 <120> Phương pháp sản xuất vacxin mảnh virut HA phòng bệnh cúm
 <130> H18-279WO
 <150> JP2017-169230
 <151> 2017-09-04
 <150> JP2018-137952
 <151> 2018-07-23
 <160> 2
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 64
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Peptit tổng hợp
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETYLTATION
 <400> 1
 Arg Ile Gln Asp Leu Glu Lys Tyr Val Glu Asp Thr Lys Ile Asp Leu
 1 5 10 15
 Trp Ser Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Ala Leu Glu Asn Gln His Thr
 20 25 30
 Ile Asp Leu Thr Asp Ser Glu Met Asn Lys Leu Phe Glu Lys Thr Arg
 35 40 45
 Arg Gln Leu Arg Glu Asn Ala Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Cys
 50 55 60
 <210> 2
 <211> 64

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit tổng hợp

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> AXETYL HÓA

<400> 2
 Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe Leu Asp Ile
 1 5 10 15

Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn Glu Arg Thr
 20 25 30

Leu Asp Tyr His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu Lys Val Arg
 35 40 45

Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Cys
 50 55 60