



(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) 
1-0019877

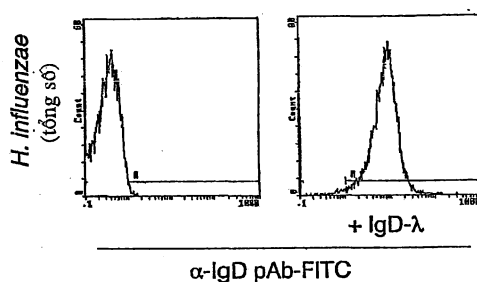
(51)⁷ **A61K 39/012, 48/00, 31/713, A61P 11/00, (13) B**
27/16

(21) 1-2008-02055 (22) 17.01.2007
(86) PCT/SE2007/000034 17.01.2007 (87) WO2007/084053 26.07.2007
(30) 60/758,987 17.01.2006 US
(45) 25.10.2018 367 (43) 27.04.2009 253
(73) FORSGREN, Arne (SE)
Sothonsvagen 4 B, S-230 11 Falsterbo, Sweden
(72) FORSGREN, Arne (SE), RIESBECK, Kristian (SE)
(74) Văn phòng luật sư Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

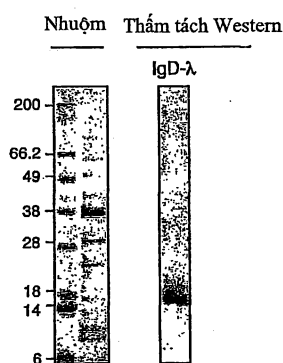
(54) **CHẾ PHẨM SINH MIỄN DỊCH VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT CHẾ PHẨM NÀY**

(57) Sáng chế đề cập đến protein bề mặt (protein E; pE), một yếu tố có độc lực, có thể thấy ở *Haemophilus influenzae*, có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO. 1, mảnh sinh miễn dịch của protein bề mặt này, và protein sinh miễn dịch tái tổ hợp (pE (A)) hoặc biến thể cắt ngắn của nó trên cơ sở protein bề mặt này. Trình tự axit nucleic, vacxin, plasmit và thể thực khuẩn, vật chủ không phải người, trình tự axit nucleic tái tổ hợp, protein dung hợp và sản phẩm dung hợp cũng được mô tả. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp sản xuất protein hoặc mảnh cắt ngắn của nó bằng cách tái tổ hợp.

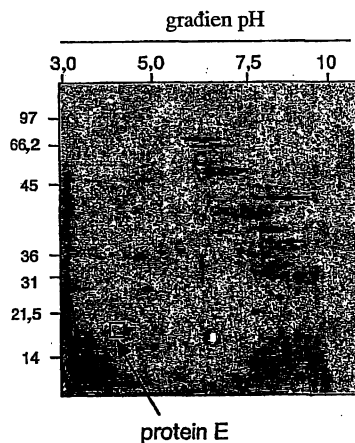
A



B



C



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến protein bề mặt E (surface exposed protein E), một yếu tố có độc lực tồn tại trong tất cả các *Haemophilus influenzae* có vỏ và không điển hình.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Cả *Haemophilus influenzae* typ b (*Haemophilus influenzae* type b - Hib) và *H. influenzae* không điển hình (nontypeable *H. influenzae* - NTHi) đều gây ra nhiều bệnh ở trẻ em và người lớn. Hib gây viêm màng não do vi khuẩn và các nhiễm trùng xâm lấn khác ở trẻ em dưới 4 tuổi, trong khi đó NTHi đã được phân lập từ các trường hợp viêm tai giữa, viêm xoang, viêm nắp thanh quản, viêm khí phế quản, và viêm phổi và có thể gây bệnh nhiễm trùng máu ở trẻ sơ sinh. Hiện nay trên thị trường không có vaccin kháng NTHi, nhưng có một số vaccin được sử dụng để kháng Hib. Các vaccin này chứa polysaccharit vỏ Hib, polyribosyl ribitol phosphat, được tiếp hợp với nhiều chất mang protein (phức hợp màng ngoài não cầu khuẩn, giải độc tố uốn ván, độc tố bạch hầu đột biến không gây độc, hoặc giải độc tố bạch hầu) để khắc phục đáp ứng miễn dịch yếu đối với polysaccharit vỏ ở trẻ em dưới 18 tháng tuổi. Protein màng ngoài (outer membrane protein - OMP) của *H. influenzae* cũng được coi là chất mang của polyribosyl ribitol phosphat do chúng được thể hiện là đích của kháng thể vật chủ sau khi nhiễm Hib và NTHi. Kháng thể đối với các OMP P1, P2, P4, P5, và P6 và protein có khối lượng phân tử 98-kDa đã được đánh giá trong các thử nghiệm bảo vệ *in vivo* và thử nghiệm diệt khuẩn *in vitro* kháng lại sự nhiễm *H. influenzae*, với kháng thể đối với P1, P4, và P6 thể hiện hoạt tính sinh học kháng lại cả chủng *H. influenzae* cùng loài và khác loài. Việc thiếu sự bảo vệ khác loài khỏi kháng thể đối với các OMP khác một phần là do tính đa dạng

kháng nguyên của các protein này trong số các chủng *H. influenzae* khác nhau. Do đó, một kháng nguyên lý tưởng phải được bộc lộ cả trên bề mặt vi khuẩn và được bảo toàn tính kháng nguyên tốt. Trong thử nghiệm này, protein màng có khối lượng phân tử 42-kDa (loại protein D) được phân bố rộng và được bảo toàn tính kháng nguyên trong cả hai chủng Hib và NTHi được phân lập, tách dòng, giải trình tự, và thể hiện là yếu tố gây bệnh và có thể dùng làm vaccin (1-5).

Hai thập kỷ trước, *Haemophilus influenzae* và *M. catarrhalis* đã được chứng minh là biểu hiện ái lực mạnh đối với cả IgD của người gắn kết với bề mặt và hòa tan (6). Việc gắn kết với IgD dường như là xảy ra song song bằng tương tác tương tự với IgD gắn kết với bề mặt ở mức độ tế bào, một hiện tượng giải thích tác dụng gây nguyên phân mạnh trên tế bào limphô của người bởi *H. influenzae* và *M. catarrhalis* (7-9). Protein màng ngoài gắn kết với IgD từ *H. influenzae* (protein D) được phân lập và tách dòng, và thể hiện là yếu tố gây bệnh quan trọng (1-5). Tuy nhiên, protein D không gắn kết chung với tất cả các IgD u tủy (10).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Thực tế, đã phát hiện thấy rằng *H. influenzae* là nguyên nhân hàng đầu của bệnh nhiễm trùng đường hô hấp trên và dưới, do đó phải cần phát triển các vaccin có thể dùng để kháng *H. influenzae*.

Vì vậy, mục đích của sáng chế là tìm ra cách thức mà *H. influenzae* tương tác với các tế bào trong cơ thể và tương tác với hệ miễn dịch, và có thể đề xuất loại vaccin mới.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất protein bề mặt, có thể được tìm thấy trong *Haemophilus influenzae*, có trình tự axit amin theo SEQ ID No. 1, hoặc mảnh, thể tương đồng, thể tương đương chức năng, chất dẫn xuất, sản

phẩm thoái hóa hoặc sản phẩm hydroxyl hóa, sulphonat hóa hoặc glycosyl hóa hoặc sản phẩm xử lý thứ cấp khác của chúng.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất mảnh sinh miễn dịch của protein bề mặt này, mảnh này có thể tìm thấy trong *Haemophilus influenzae*, hoặc các biến thể cải biến nhân tạo hoặc có trong tự nhiên của chúng.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất protein sinh miễn dịch tái tổ hợp trên cơ sở protein bề mặt nêu trên, trong đó các axit amin ở vị trí từ 1 đến 21 của SEQ ID No. 1 được loại bỏ hoặc được thay thế bởi một hoặc nhiều axit amin. Theo một phương án, các axit amin ở vị trí từ 1 đến 21 của SEQ ID No. 1 được thay thế bởi trình tự gồm từ 0 đến 21 axit amin tùy ý. Theo một phương án khác, protein sinh miễn dịch tái tổ hợp có trình tự axit amin theo SEQ ID No. 2, hoặc mảnh, thể tương đồng, thể tương đương chức năng, chất dẫn xuất, sản phẩm thoái hóa hoặc sản phẩm hydroxyl hóa, sulphonat hóa hoặc glycosyl hóa hoặc sản phẩm xử lý thứ cấp khác của chúng.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất peptit có trình tự axit amin theo SEQ ID No. 3, hoặc mảnh, thể tương đồng, thể tương đương chức năng, chất dẫn xuất, sản phẩm thoái hóa hoặc sản phẩm hydroxyl hóa, sulphonat hóa hoặc glycosyl hóa hoặc sản phẩm xử lý thứ cấp khác của chúng.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất peptit có trình tự axit amin theo SEQ ID No. 4, hoặc mảnh, thể tương đồng, thể tương đương chức năng, chất dẫn xuất, sản phẩm thoái hóa hoặc sản phẩm hydroxyl hóa, sulphonat hóa hoặc glycosyl hóa hoặc sản phẩm xử lý thứ cấp khác của chúng.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất peptit có trình tự axit amin theo SEQ ID No. 5, hoặc mảnh, thể tương đồng, thể tương đương chức năng, chất dẫn xuất, sản phẩm thoái hóa hoặc sản phẩm hydroxyl hóa, sulphonat hóa hoặc glycosyl hóa hoặc sản phẩm xử lý thứ cấp khác của chúng.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất peptit có trình tự axit amin theo SEQ ID No. 6, hoặc mảnh, thể tương đồng, thể tương đương chức năng, chất dẫn xuất, sản phẩm thoái hóa hoặc sản phẩm hydroxyl hóa, sulphonat hóa hoặc glycosyl hóa hoặc sản phẩm xử lý thứ cấp khác của chúng.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất peptit có trình tự axit amin theo SEQ ID No. 7, hoặc mảnh, thể tương đồng, thể tương đương chức năng, chất dẫn xuất, sản phẩm thoái hóa hoặc sản phẩm hydroxyl hóa, sulphonat hóa hoặc glycosyl hóa hoặc sản phẩm xử lý thứ cấp khác của chúng.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất peptit có trình tự axit amin theo SEQ ID No. 8, hoặc mảnh, thể tương đồng, thể tương đương chức năng, chất dẫn xuất, sản phẩm thoái hóa hoặc sản phẩm hydroxyl hóa, sulphonat hóa hoặc glycosyl hóa hoặc sản phẩm xử lý thứ cấp khác của chúng.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất peptit có trình tự axit amin theo SEQ ID No. 9, hoặc mảnh, thể tương đồng, thể tương đương chức năng, chất dẫn xuất, sản phẩm thoái hóa hoặc sản phẩm hydroxyl hóa, sulphonat hóa hoặc glycosyl hóa hoặc sản phẩm xử lý thứ cấp khác của chúng.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất peptit có trình tự axit amin theo SEQ ID No. 10, hoặc mảnh, thể tương đồng, thể tương đương chức năng, chất dẫn xuất, sản phẩm thoái hóa hoặc sản phẩm hydroxyl hóa, sulphonat hóa hoặc glycosyl hóa hoặc sản phẩm xử lý thứ cấp khác của chúng.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế mô tả việc sử dụng ít nhất một protein, mảnh hoặc peptit như được mô tả trên đây để sản xuất thuốc dùng để phòng hoặc điều trị bệnh nhiễm trùng. Theo một phương án, bệnh nhiễm trùng là do *Haemophilus influenzae* gây ra, và theo một phương án khác, *Haemophilus influenzae* có vỏ hoặc không điển hình. Theo một phương án khác nữa, việc sử dụng này để phòng hoặc điều trị bệnh viêm tai giữa, bệnh viêm xoang hoặc bệnh nhiễm trùng đường hô hấp dưới, ở trẻ em cũng như

người lớn bị, ví dụ, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (chronic obstructive pulmonary disease - COPD).

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất thuốc chứa ít nhất một protein, mảnh hoặc peptit như được mô tả trên đây và một hoặc nhiều tá chất, chất dẫn, tá dược, chất kết dính, chất mang, chất bảo quản, chất đệm, chất nhũ hóa, chất thẩm ướt, hoặc hợp chất làm dễ chuyển nhiễm.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm vaccin chứa ít nhất một protein, mảnh hoặc peptit như được mô tả trên đây. Theo một phương án, chế phẩm vaccin này chứa ít nhất một đi-, tri- hoặc multime của protein, mảnh hoặc peptit này. Theo một phương án khác, chế phẩm vaccin này còn chứa một hoặc nhiều tá chất, chất dẫn, tá dược, chất kết dính, chất mang, chất bảo quản, chất đệm, chất nhũ hóa, chất thẩm ướt, hoặc hợp chất làm dễ chuyển nhiễm. Theo một phương án khác nữa, chế phẩm vaccin này chứa ít nhất một vaccin nữa, và theo một phương án khác nữa, chế phẩm này chứa phần sinh miễn dịch của một phân tử khác, trong đó phần sinh miễn dịch của phân tử khác này có thể được chọn từ nhóm bao gồm Protein D của *H. influenzae* (EP 594 610), MID của *Moraxella catarrhalis* (WO 03/004651, WO 97/41731 và WO96/34960), UspA1 hoặc UspA2 của *Moraxella catarrhalis* (WO93/03761), và protein màng ngoài hoặc vỏ hydrat cacbon của mầm gây bệnh đường hô hấp bất kỳ, hoặc ADN oligonucleotit, như motif CpG.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất trình tự axit nucleic mã hóa protein, mảnh hoặc peptit như được mô tả trên đây, cũng như thể tương đồng, dạng đa hình, sản phẩm thoái hóa và biến thể ghép của chúng. Theo một phương án, trình tự axit nucleic này được dung hợp với ít nhất một gen khác.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất plasmit hoặc thể thực khuẩn chứa trình tự axit nucleic như được mô tả trên đây.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất vật chủ không phải người chứa ít nhất một plasmid như được mô tả trên đây và có khả năng sản sinh protein, mảnh hoặc peptit như nêu trên, cũng như thể tương đồng, dạng đa hình, sản phẩm thoái hóa và biến thể ghép của chúng, vật chủ này được chọn trong số vi khuẩn, nấm men và thực vật. Theo một phương án, vật chủ này là *E. coli*.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất protein hoặc polypeptit dung hợp, trong đó protein, mảnh hoặc peptit như được mô tả trên đây được kết hợp với ít nhất một protein khác bằng cách sử dụng trình tự axit nucleic tái tổ hợp như nêu trên. Theo một phương án, protein dung hợp này là đi-, tri hoặc multimer của protein, mảnh hoặc peptit như nêu trên.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến sản phẩm dung hợp, trong đó protein, mảnh hoặc peptit như được mô tả trên đây được gắn kết đồng hóa trị, hoặc theo cách khác bất kỳ, với protein, hydrat cacbon hoặc cơ chất.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề cập đến phương pháp phân lập protein, mảnh hoặc peptit như được mô tả trên đây, phương pháp này bao gồm các bước:

a) nuôi cấy *Haemophilus influenzae* hoặc *E. coli* chứa ADN mã hóa protein, mảnh hoặc peptit này, thu vi khuẩn và phân lập thể màng ngoài hoặc thể vùi;

b) hòa tan thể vùi bằng chất solvat hóa mạnh;

c) bổ sung chất hồi tính; và

d) thẩm tách huyền phù thu được bằng dung dịch đệm có độ pH nằm trong khoảng từ 8 đến 10.

Theo một phương án của phương pháp này, chất solvat hóa là guanidium hydroclorua, và theo một phương án khác, chất hồi tính là arginin.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất thuốc hoặc chế phẩm vaccin như nêu trên, chứa protein hoặc polypeptit dung hợp nêu trên, hoặc sản phẩm dung hợp nêu trên.

Sáng chế mô tả phương pháp phòng hoặc điều trị bệnh nhiễm trùng cho cá thể bao gồm việc dùng thuốc hoặc chế phẩm vaccin như được mô tả trên đây với lượng hữu hiệu được dụng. Theo một phương án, bệnh nhiễm trùng này là do *Haemophilus influenzae* gây ra, cả loại có vỏ hoặc không điển hình, và theo một phương án khác nữa, bệnh nhiễm trùng này được chọn từ nhóm bao gồm bệnh viêm tai giữa, bệnh viêm xoang hoặc bệnh nhiễm trùng đường hô hấp dưới.

Sáng chế đề xuất protein E, đặc biệt polypeptit protein E và polynucleotit protein E, nguyên liệu tái tổ hợp và phương pháp sản xuất chúng. Sáng chế còn mô tả phương pháp sử dụng các polypeptit và polynucleotit này, bao gồm việc phòng và điều trị các bệnh nhiễm khuẩn, trong số các bệnh khác. Theo một khía cạnh nữa, sáng chế mô tả các thử nghiệm chẩn đoán để phát hiện các bệnh có liên quan đến bệnh nhiễm trùng và tình trạng bệnh liên quan đến các bệnh nhiễm trùng này, như thử nghiệm phát hiện sự biểu hiện hoặc hoạt tính của polynucleotit hoặc polypeptit protein E.

Các thay đổi và cải biến khác nhau nằm trong ý tưởng và phạm vi của sáng chế sẽ là hiển nhiên đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này qua việc đọc phần mô tả sau đây và các phần khác của sáng chế.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1. Protein E *Haemophilus influenzae* có khối lượng phân tử 16,3 kDa được phát hiện bởi protein u tùy IgD(λ). Ở hình A, biểu thị phân tích miễn dịch dòng tế bào của sự biểu hiện pE trong *H. influenzae* 772. SDS-PAGE và phân tích thẩm tách Western (B) và phân tích điện di trên gel SDS-polyacrylamit 2 chiều (C) của protein màng ngoài được xử lý bằng Empigen®

của *H. influenzae* MinnA được biểu thị. Chiết phẩm protein màng ngoài được biểu thị trước (B) và sau khi tách trên Q-Sepharose (C). Mũi tên trên hình C chỉ vị trí dự đoán của pE trên cơ sở phương pháp thẩm tách Western (sử dụng IgD(λ) để thăm dò) của gel tương ứng. Ở hình A, vi khuẩn được nạp bằng protein u tủy IgD(λ) sau đó ủ bằng pAb của thỏ kháng IgD được tiếp hợp với FITC và phân tích miễn dịch dòng tế bào. Ở hình B, SDS-gel được nhuộm xanh Coomassie (nhuộm màu) và phân tích thẩm tách Western được dò bằng IgD(λ) u tủy của người, sau đó ủ với kháng thể đa dòng IgD dê kháng người được tiếp hợp với horseradish peroxidaza. Các mẫu được đun sôi với sự có mặt của 2-mercaptoetanol trong 10 phút trước khi nạp.

Fig. 2. là profin miễn dịch dòng tế bào của *E. coli* biểu hiện pE được so sánh với *H. influenzae* 3655 kiểu dại và đột biến không có pE. *E. coli* chứa vectơ pUC18 rỗng (A) được so sánh với vi khuẩn được biến nạp bằng pUC18 chứa ADN hệ gen từ *H. influenzae* 772 (các gen từ HI0175 đến HI0178) (B). Sự biểu hiện pE trong *H. influenzae* 3655 kiểu dại không điển hình (C) và đột biến tương ứng (D) được thể hiện. Chúng *E. coli* JM83 và *H. influenzae* được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy lỏng qua đêm. *E. coli* được ủ bằng IgD(λ) u tủy của người trong đá lạnh. Sau 1 giờ và sau khi rửa, bổ sung pAb IgD thỏ kháng người được tiếp hợp với FITC trong thêm 30 phút nữa, sau đó rửa và phân tích miễn dịch dòng tế bào. Các bước tương tự cũng được thực hiện với *H. influenzae* 3655 hoặc đột biến pE có nguồn gốc từ đó bằng cách sử dụng kháng thể đa dòng kháng pE đặc hiệu của thỏ và pAb dê kháng thỏ được tiếp hợp với FITC.

Fig. 3. Sự biểu hiện pE của *H. influenzae* và loài liên quan được minh họa bằng phân tích miễn dịch dòng tế bào và IgD(λ) huyết thanh u tủy. Chúng 22 của NTHi và chủng 27 của loài *haemophilus* hoặc vi khuẩn liên quan được phân tích. Vi khuẩn được nuôi đến pha ổn định và ủ bằng IgD(λ) u tủy của người trong đá lạnh. Sau 1 giờ và sau khi rửa, kháng thể đa dòng (polyclonal

antibody - pAb) IgD thử kháng người được tiếp hợp với FITC được bổ sung trong thêm 30 phút nữa, tiếp theo rửa và phân tích miễn dịch dòng tế bào.

Fig. 4. pE được biểu hiện trong *H. influenzae* NTHi và có vỏ được minh họa bởi phân tích thẩm tách Western. Protein vi khuẩn từ các chủng đã định được điều chế bằng cách sử dụng Empigen[®] và được đưa vào SDS-gel, sau đó phân tích thẩm tách Western được dò bằng IgD(λ) u tủy của người và kháng thể đa dòng pAb IgD dê kháng người được tiếp hợp với horseradish peroxidaza làm kháng thể phát hiện.

Fig. 5. pE22-160 tái tổ hợp trên cơ sở trình tự từ NTHi 772 so với pE tự nhiên từ *H. influenzae* MinnA. Trên hình A, trình tự có đầu amino của mảnh A có nguồn gốc từ pE được so sánh với trình tự có đầu amino được dự đoán của protein pE nguyên thể. Trên hình B, đưa ra minh họa sơ lược của pE(A) với Histidin đánh dấu. Trên hình C, kích thước và độ tinh khiết được thể hiện trên PAGE được nhuộm Commassie. Trên hình D và E, chiết phẩm protein màng ngoài (OMP) từ *H. influenzae* MinnA được so sánh với pE(A) được tạo ra bằng cách tái tổ hợp lần lượt trong phân tích gel được nhuộm bằng Coomassie và phân tích thẩm tách Western. Trên hình A, trình tự peptit tín hiệu được loại bỏ ngoài gốc axit amin glutamin 21. Chín axit amin có nguồn gốc từ vector biểu hiện pET26(+) như đã được biểu thị. Các số đại diện cho các vị trí axit amin bắt đầu từ vị trí khởi đầu dịch mã của pE. pE(A) tái tổ hợp được sản xuất trong *E. coli*, được tinh chế, và đem phân hủy Edman để phân tích vị trí tách peptidaza tín hiệu. Trên hình D và E, hai gel được tiến hành đồng thời, một gel được nhuộm màu xanh sáng Coomassie và một gel được thấm trên màng Immobilon-P, được dò bằng protein u tủy IgD(λ) của người, tiếp đó ủ bằng kháng thể thứ cấp thích hợp được tiếp hợp với horseradish peroxidaza. Phần OMP được tinh chế bằng cách sử dụng Empigen[®] như đã được mô tả trong phần nguyên liệu và phương pháp.

Fig. 6. Protein E được bảo toàn đặc biệt. Tần số đột biến điểm trong 13 đến 31 chủng *Haemophilus influenzae* (Bảng 2) bao gồm cả thể phân lập có vỏ và không điển hình được biểu thị. Các kết quả thu được bằng cách giải trình tự có sử dụng đoạn mỗi năm cạnh sườn. Tất cả các trình tự được so sánh với trình tự pE của *H. influenzae* Rd được sử dụng làm trình tự so sánh và được thể hiện trên hình này.

Fig. 7. Profin ky nước/ura nước của pE. Minh họa các phần ura nước và ky nước của các gốc axit amin riêng rẽ. Peptit tín hiệu dự đoán cũng được chỉ ra. Số liệu thu được bằng cách sử dụng phương pháp chuẩn như đã được mô tả (21).

Fig. 8. SDS-PAGE minh họa pE22-160 tái tổ hợp (mảnh A) và một loạt các mảnh được cắt ngắn từ B đến H. Trên hình A, biểu thị các mảnh khác nhau, trong khi đó trên hình B, biểu thị SDS-PAGE. ADN mã hóa các protein khác nhau được gắn vào vectơ biểu hiện pET26(+) và được biểu hiện tái tổ hợp trong *E. coli*. Protein biểu hiện quá mức thu được được tinh chế trên nhựa niken và được tách trên SDS-PAGE, tiếp đó nhuộm màu xanh sáng Coomassie.

Fig. 9. Chủng đột biến không có pE (NTHi 3655) có khả năng gây bệnh viêm tai giữa cấp tính ở chuột thấp hơn từ 100 đến 1.000 lần. Sự nhiễm trùng được gây ra ở chuột đực Sprague-Dawley bằng cách rạch vào dưới cổ, sau đó tiêm vào trong hốc tai giữa một số lượng vi khuẩn đã định trong thể tích 0,05 ml. Số liệu được thể hiện là từ ngày 3 của thử nghiệm và là đại diện của 5 con trong mỗi nhóm.

Fig. 10. Nồng độ trung bình của kháng thể IgG và IgA trực tiếp kháng pE trong huyết thanh từ các nhóm tuổi khác nhau. Kháng thể kháng pE được phân tích bằng thử nghiệm kẹp ELISA có sử dụng pE(A) tái tổ hợp làm chất ngấm. Độ tinh khiết của pE(A) như được chỉ ra trên Fig. 5.

Fig. 11 pE được bảo toàn đặc biệt trong các chủng *haemophilus* khác nhau. Gen *pe* được giải trình tự trong *H. influenzae* có vỏ typ a (n=2), b (n=2), c (n=2), d (n=1), e (n=2), và f (n=3), NTHi (n=8), *H. influenzae* biovar *aegypticus* (n=6) và *H. aegypticus* (n=5), có sử dụng đoạn môi nằm cạnh sườn. Rd thể hiện chủng *H. influenzae* Rd (Hi0178) và 772 thể hiện chủng NTHi 772. Các số từ 65 đến 577 tương ứng với các chủng được minh họa trong bảng 1.

Mô tả chi tiết sáng chế

Trước khi mô tả chi tiết sáng chế, điều quan trọng cần phải hiểu rằng sáng chế trong bản mô tả này không chỉ giới hạn ở các phương án và các bước chi tiết được mô tả trong bản mô tả này. Các ví dụ được đề cập là để minh họa cho sáng chế nhưng không giới hạn phạm vi của sáng chế theo cách bất kỳ. Sáng chế có thể bao gồm các phương án khác và được thực hiện hoặc tiến hành theo nhiều cách khác nhau. Cần phải hiểu rằng cách diễn đạt và thuật ngữ dùng trong bản mô tả này nhằm mục đích mô tả chứ không giới hạn phạm vi của sáng chế.

Sáng chế mô tả việc tách dòng và biểu hiện protein màng ngoài của *H. influenzae* mới được gọi là protein E (pE). Protein này được phát hiện bằng cách sử dụng IgD (λ) huyết thanh u tủy của người có ái lực đặc hiệu đối với pE.

Để tăng tối đa lợi ích của pE tái tổ hợp, mảnh pE được cắt ngắn gồm các gốc axit amin từ lysin22 đến lysin160 được tạo ra. Do đó, peptit tín hiệu đầu N bao gồm axit amin glutamin21 được loại bỏ và thay thế bằng peptit dẫn ngoài chín gốc có nguồn gốc từ vector pET26(+). pE được cắt ngắn (tức là pE22-160) được gọi là pE(A).

Sáng chế bao gồm protein pE màng ngoài của *Haemophilus* và các peptit có nguồn gốc từ pE pE22-60, pE22-95, pE22-125, pE41-68, pE56-125, pE56-

160, pE86-160, pE115-160, và đi-, tri- hoặc oligome của chúng. Cụ thể, ưu tiên hơn là trình tự của pE hoặc peptit có nguồn gốc từ đó được bộc lộ trên bề mặt.

Do vậy, chế phẩm vaccin theo sáng chế chứa thành phần sinh miễn dịch là protein bề mặt có thể được tìm thấy trong tất cả *Haemophilus influenzae*, mảnh sinh miễn dịch của protein bề mặt này, protein sinh miễn dịch tái tổ hợp trên cơ sở protein bề mặt này, protein sinh miễn dịch tái tổ hợp có trình tự axit amin theo SEQ ID No. 2, và/hoặc peptit có trình tự axit amin theo SEQ ID No. 3-10, hoặc mảnh, thể tương đồng, thể tương đương chức năng, chất dẫn xuất, sản phẩm thoái hóa hoặc sản phẩm hydroxyl hóa, sulphonat hóa hoặc glycosyl hóa, hoặc sản phẩm xử lý thứ cấp khác của chúng. Chế phẩm vaccin còn có thể chứa protein hoặc polypeptit dung hợp, hoặc sản phẩm dung hợp theo sáng chế làm thành phần sinh miễn dịch. Các thành phần sinh miễn dịch có khả năng tạo ra kháng thể hoặc đáp ứng miễn dịch khác đối với *Haemophilus influenzae*, trong đó kháng thể được tạo ra ức chế sự phát sinh bệnh của vi khuẩn *Haemophilus influenzae* đối với tế bào của đối tượng. “Liều sinh miễn dịch” của chế phẩm vaccin theo sáng chế là liều mà sau khi dùng tạo ra được đáp ứng miễn dịch thể dịch và/hoặc tế bào có thể nhận thấy được so với đáp ứng miễn dịch chuẩn trước khi dùng.

Trình tự axit nucleic được sử dụng trong chế phẩm vaccin theo sáng chế để tạo ra kháng nguyên có thể được cài xen vào vectơ biểu hiện bất kỳ trong số nhiều vectơ biểu hiện bằng nhiều quy trình khác nhau. Các quy trình này là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Chế phẩm vaccin được sản xuất dễ dàng bằng cách sử dụng các phương pháp và kỹ thuật đã biết, và có thể được dùng theo nhiều cách khác nhau, tốt hơn là đường dùng ngoài ruột hoặc trong mũi. Dạng bào chế thích hợp để dùng ngoài đường tiêu hóa hoặc trong mũi bao gồm dung dịch tiêm nước và không phải nước vô trùng có thể chứa chất chống oxy hóa, chất đệm, chất kìm khuẩn và chất hòa tan làm cho dạng bào chế đẳng trương với dịch cơ thể của đối

tượng đang nghiên cứu; và huyền phù nước và không phải nước vô trùng có thể bao gồm chất tạo huyền phù hoặc chất làm đặc. Thành phần gây miễn dịch chủ động thường được trộn với tá dược là loại dược dụng, như nước, dung dịch nước muối, dextroza, glyxerol, etanol, hoặc các chất tương tự. Ngoài ra, chế phẩm vaccin còn có thể chứa lượng nhỏ các chất phụ trợ như chất thẩm ướt hoặc nhũ hóa, chất đệm pH, chất kết dính, chất mang hoặc chất bảo quản.

Chế phẩm vaccin cũng có thể chứa các tá chất để làm tăng khả năng sinh miễn dịch của chế phẩm, như tá chất Freund và các hệ khác đã biết trong lĩnh vực này. Các thành phần sinh miễn dịch của chế phẩm vaccin, như protein, mảnh, peptit, protein dung hợp hoặc polypeptit, hoặc sản phẩm dung hợp theo sáng chế, có thể được dùng để bào chế vaccin ở dạng trung tính hoặc dạng muối.

Liều lượng của chế phẩm vaccin sẽ phụ thuộc vào hoạt tính cụ thể của vaccin và có thể xác định dễ dàng bằng các thử nghiệm thông thường. Chế phẩm vaccin được dùng với lượng sao cho có hiệu quả điều trị và gây được miễn dịch, và số lượng phụ thuộc vào đối tượng.

Sáng chế đề cập đến polypeptit và polynucleotit protein E như được mô tả chi tiết hơn dưới đây. Cụ thể, sáng chế đề cập đến polypeptit và polynucleotit của protein E của *H. influenzae* không điển hình. Polypeptit protein E có một trình tự tín hiệu và được bộc lộ ở bề mặt của vi khuẩn. Peptit tín hiệu nằm từ gốc 1 đến gốc 20 của polypeptit protein E.

Việc đề cập đến “protein E” trong bản mô tả này là đề cập đến peptit, mảnh sinh miễn dịch, thể dung hợp, polypeptit hoặc protein bất kỳ theo sáng chế (như SEQ ID NO: 1 có hoặc không có trình tự tín hiệu). “Polynucleotit mã hóa protein D” được dùng để chỉ trình tự polynucleotit bất kỳ mã hóa cho peptit, mảnh sinh miễn dịch, thể dung hợp, polypeptit hoặc protein bất kỳ theo sáng chế.

Thuật ngữ “chứa” trong bản mô tả này có thể được dùng thay thế cho thuật ngữ “được cấu thành từ”.

Sáng chế đặc biệt đề cập đến polynucleotit protein E và polypeptit được mã hóa được liệt kê trong bản mô tả này.

Cần phải hiểu rằng trình tự được trích dẫn trong Danh mục trình tự dưới đây dưới dạng “ADN” là ví dụ minh họa của một phương án theo sáng chế, do đó người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ biết được rằng trình tự này có thể được dùng hữu ích trong polynucleotit nói chung, kể cả ribopolynucleotit.

Trình tự của polynucleotit protein E được nêu trong SEQ ID NO:11 (từ chủng ntHi 772).

Trình tự của polypeptit được mã hóa của protein E được nêu trong SEQ ID NO:1 (từ chủng ntHi 772), 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10.

Polypeptit

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất polypeptit của *H. influenzae* (cụ thể là *H. influenzae* không điển hình) trong bản mô tả này được gọi là "protein E" và "polypeptit protein E" cũng như các biến thể hữu ích về mặt sinh học, chẩn đoán, dự phòng, lâm sàng hoặc điều trị của chúng, và các chế phẩm chứa chúng.

Sáng chế còn đề xuất:

(a) polypeptit phân lập chứa trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất là 85%, tốt hơn là có độ đồng nhất ít nhất là 90%, tốt hơn nữa là có độ đồng nhất ít nhất là 95%, tốt nhất là độ đồng nhất ít nhất là 97-99% hoặc đồng nhất hoàn toàn, so với trình tự bất kỳ nêu trong SEQ ID NO: 1-10;

(b) polypeptit được mã hóa bởi polynucleotit phân lập chứa trình tự polynucleotit có độ đồng nhất ít nhất là 85%, tốt hơn là có độ đồng nhất ít nhất

là 90%, tốt hơn nữa là có độ đồng nhất ít nhất là 95%, thậm chí tốt hơn nữa là độ đồng nhất ít nhất là 97-99% hoặc đồng nhất hoàn toàn so với trình tự bất kỳ nêu trong SEQ ID NO: 11 trên toàn bộ chiều dài của trình tự được chọn nêu trong SEQ ID NO: 0; hoặc

(c) polypeptit được mã hóa bởi polynucleotit phân lập chứa trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có độ đồng nhất ít nhất là 85%, tốt hơn là có độ đồng nhất ít nhất là 90%, tốt hơn nữa là có độ đồng nhất ít nhất là 95%, thậm chí tốt hơn nữa là độ đồng nhất ít nhất là 97-99% hoặc đồng nhất hoàn toàn, so với trình tự axit amin của trình tự bất kỳ nêu trong SEQ ID NO: 1-10.

Polypeptit protein E được nêu trong SEQ ID NO: 1-10 là polypeptit protein E từ chủng *H. influenzae* không điển hình. Các trình tự protein E khác cũng được xác định từ chủng *H. influenzae* được liệt kê trong bảng 1.

Sáng chế còn đề xuất mảnh sinh miễn dịch của polypeptit protein E, là phần liên kết của polypeptit protein E có hoạt tính sinh miễn dịch giống hoặc gần giống với polypeptit chứa trình tự axit amin tương ứng được chọn từ SEQ ID NO: 1-10; Tức là mảnh này (nếu cần có thể được phối cặp với chất mang) có khả năng làm tăng đáp ứng miễn dịch nhận biết polypeptit protein E. Theo cách khác, hoặc ngoài ra, mảnh sinh miễn dịch có thể duy trì chức năng gắn kết với IgD của protein có chiều dài đầy đủ (như đã được mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế, ví dụ như khả năng gắn kết với IgD(λ) từ vị trí gắn kết (Birmingham, England). Mảnh sinh miễn dịch này có thể chứa, ví dụ, polypeptit protein E không có trình tự dẫn ở đầu N, và/hoặc miền xuyên màng và/hoặc miền mỏ neo ở đầu C. Theo một khía cạnh ưu tiên, mảnh sinh miễn dịch của protein E theo sáng chế bao gồm gần như tất cả miền ngoại bào của polypeptit có độ đồng nhất ít nhất là 85%, tốt hơn là có độ đồng nhất ít nhất là 90%, tốt hơn nữa là có độ đồng nhất ít nhất là 95%, tốt nhất là độ đồng nhất ít nhất là 97-99% đồng nhất, so với trình tự được chọn từ SEQ ID NO: 1-10 trên toàn bộ chiều dài của trình tự này.

Mảnh là polypeptit có trình tự axit amin mà toàn bộ trình tự này giống một phần nhưng không phải là tất cả trình tự axit amin bất kỳ của polypeptit bất kỳ theo sáng chế. Như với polypeptit protein E, mảnh có thể "tồn tại tự do", hoặc được chứa trong một polypeptit lớn hơn trong đó chúng tạo thành một phần hoặc vùng, tốt hơn nữa là làm một vùng liền kề trong một polypeptit lớn hơn. Do đó, mảnh này có thể ngắn hơn trình tự nguyên thể có chiều dài đầy đủ, hoặc, nếu được chứa trong polypeptit lớn hơn, có thể là trình tự nguyên thể có chiều dài đầy đủ hoặc protein dung hợp dài hơn.

Mảnh được ưu tiên bao gồm, ví dụ, polypeptit cắt ngắn có một phần là trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 1-10 hoặc là các biến thể của chúng, như chuỗi liên tục của các gốc mà bao gồm trình tự axit amin có đầu amino và/hoặc carboxyl. Các dạng thoái hóa của polypeptit theo sáng chế được tạo ra bởi hoặc trong tế bào vật chủ, cũng được ưu tiên. Ưu tiên hơn là các mảnh được đặc trưng bởi các đặc tính về cấu trúc hoặc chức năng như các mảnh chứa vùng xoắn alpha và vùng tạo xoắn alpha, vùng phiến beta và vùng tạo phiến beta, vùng vòng và vùng tạo vòng, vùng cuộn và vùng tạo cuộn, vùng ưa nước, vùng kỵ nước, vùng lưỡng tính alpha, vùng lưỡng tính beta, vùng linh động, vùng tạo bề mặt, vùng gắn kết cơ chất, và vùng có chỉ số kháng nguyên cao.

Mảnh được ưu tiên khác bao gồm polypeptit phân lập chứa trình tự axit amin có ít nhất 15, 20, 30, 40, 50 hoặc 100 axit amin liền kề của trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 1-10 hoặc polypeptit phân lập chứa trình tự axit amin có ít nhất 15, 20, 30, 40, 50 hoặc 100 axit amin liền kề được cắt ngắn hoặc loại bỏ khỏi trình tự axit amin chọn từ SEQ ID NO: 1-10.

Mảnh được ưu tiên khác nữa là các mảnh bao gồm epitop tế bào B, ví dụ các mảnh/peptit được mô tả trong Ví dụ 10.

Mảnh của polypeptit theo sáng chế có thể được dùng để sản xuất polypeptit có chiều dài đầy đủ tương ứng bằng cách tổng hợp peptit; do đó, các

mảnh này có thể được dùng làm chất trung gian để sản xuất polypeptit có chiều dài đầy đủ theo sáng chế.

Đặc biệt ưu tiên các biến thể trong đó một số, 5-10, 1-5, 1-3, 1-2 hoặc 1 axit amin được thay thế, loại bỏ, hoặc bổ sung theo tổ hợp bất kỳ.

Polypeptit, hoặc mảnh sinh miễn dịch, theo sáng chế có thể ở dạng protein “trưởng thành” hoặc có thể là một phần của protein lớn hơn như tiền chất hoặc protein dung hợp. Thường tốt hơn nếu bao gồm trình tự axit amin bổ sung mà chứa trình tự tiết hoặc dẫn, tiền trình tự, trình tự trợ giúp cho quá trình tinh chế như các gốc chứa nhiều histidin, hoặc trình tự bổ sung để làm ổn định trong quá trình sản xuất tái tổ hợp. Ngoài ra, việc bổ sung polypeptit ngoại sinh hoặc đuôi lipit hoặc trình tự polynucleotit để làm tăng khả năng sinh miễn dịch của phân tử cuối cùng cũng được xem xét.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến protein dung hợp hòa tan được xử lý bằng kỹ thuật di truyền chứa polypeptit theo sáng chế, hoặc mảnh của chúng, và các phần khác nhau của vùng cố định của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch thuộc các phân lớp khác nhau (IgG, IgM, IgA, IgE). Globulin miễn dịch được ưu tiên là phần cố định của chuỗi nặng của IgG của người, đặc biệt là IgG1, ở đó sự dung hợp xảy ra tại vùng bản lề. Theo một phương án đặc biệt, phần Fc có thể được loại bỏ một cách đơn giản bằng cách phối hợp trình tự tách mà có thể được tách ra bằng yếu tố đông máu Xa.

Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến quy trình sản xuất các protein dung hợp này bằng ứng dụng di truyền, và việc sử dụng chúng để sàng lọc thuốc, chẩn đoán và điều trị. Theo một khía cạnh khác, sáng chế cũng đề cập đến polynucleotit mã hóa các protein dung hợp này. Ví dụ về kỹ thuật protein dung hợp này có thể thấy trong công bố đơn sáng chế quốc tế các số WO94/29458 và WO94/22914.

Các protein này có thể được tiếp hợp hóa học, hoặc được biểu hiện dưới dạng protein dung hợp tái tổ hợp cho phép làm tăng mức độ sản xuất trong hệ biểu hiện so với protein không được dung hợp. Đối tác dung hợp có thể giúp trong việc cung cấp epitop tế bào T trợ giúp (đối tác dung hợp miễn dịch), tốt hơn là epitop tế bào T trợ giúp được nhận biết bởi người, hoặc trợ giúp trong việc biểu hiện protein (chất làm tăng mức độ biểu hiện) ở hiệu suất cao hơn so với protein tái tổ hợp nguyên thể. Tốt hơn là đối tác dung hợp đồng thời là đối tác dung hợp miễn dịch và đối tác làm tăng mức độ biểu hiện.

Đối tác dung hợp bao gồm protein D từ *Haemophilus influenzae* (EP 594610) và protein không cấu trúc từ virus *influenza*, NS1 (hemagglutinin). Một đối tác dung hợp khác là protein đã biết như là Omp26 (WO 97/01638). Một đối tác dung hợp khác là protein đã biết như là LytA. Tốt hơn là phần đầu C của phân tử được sử dụng. LytA có nguồn gốc từ *Streptococcus pneumoniae*, là chủng tổng hợp N-acetyl-L-alanin amidaza, amidaza LytA, (được mã hóa bởi gen *lytA* {Gen, 43 (1986) trang 265-272}) autolysin thoái hóa đặc hiệu một số liên kết trong khung peptidoglycan. Miền đầu C của LytA protein đảm nhiệm về ái lực đối với cholin hoặc với một số chất tương tự cholin như DEAE. Đặc tính này đã được khai thác đối với sự phát triển của plasmit biểu hiện C-LytA ở *E.coli* hữu ích để biểu hiện protein dung hợp. Sự tinh chế protein lai chứa mảnh C-LytA ở đầu amino của nó đã được mô tả {Biotechnology: 10, (1992) trang 795-798}. Có thể sử dụng phần lặp lại của phân tử LytA tìm thấy ở đầu C bắt đầu ở gốc 178, ví dụ, các gốc 188-305.

Sáng chế cũng bao gồm các biến thể của các polypeptit nêu trên, đó là các polypeptit biến đổi từ polypeptit ban đầu bằng cách thay thế bảo toàn axit amin, nhờ đó một gốc được thay thế bằng một gốc khác có đặc điểm tương tự. Sự thay thế này thường là trong số Ala, Val, Leu và Ile; trong số Ser và Thr; trong số các gốc axit Asp và Glu; trong số Asn và Gln; và trong số các gốc bazơ Lys và Arg; hoặc các gốc thơm Phe và Tyr.

Polypeptit theo sáng chế có thể được tạo ra theo cách thích hợp bất kỳ. Các polypeptit này bao gồm polypeptit có trong tự nhiên được phân lập, polypeptit được sản xuất tái tổ hợp, polypeptit được sản xuất tổng hợp, hoặc polypeptit được sản xuất bằng cách kết hợp các phương pháp này. Các cách tạo ra polypeptit là đã biết trong tình trạng kỹ thuật.

Ưu tiên hơn cả là polypeptit theo sáng chế có nguồn gốc từ *H. influenzae* không điển hình, tuy nhiên, tốt hơn là polypeptit này được thu các sinh vật khác cùng giống trong bảng phân loại. Polypeptit theo sáng chế cũng có thể thu được từ, ví dụ, các sinh vật có cùng họ hoặc bộ trong bảng phân loại.

Polynucleotit

Một mục đích của sáng chế là đề xuất polynucleotit mã hóa polypeptit protein E, đặc biệt là polynucleotit mã hóa polypeptit mà trong bản mô tả này gọi là protein E.

Theo một phương án đặc biệt ưu tiên của sáng chế, polynucleotit chứa vùng mã hóa polypeptit protein E chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 11 mà bao gồm gen có chiều dài đầy đủ, hoặc biến thể của nó.

Polynucleotit protein E được nêu trong SEQ ID NO: 11 là các polynucleotit protein E từ chủng *H. influenzae* 772 không điển hình. Các trình tự khác đã được xác định của gen mã hóa protein E từ chủng *H. influenzae* được liệt kê trong bảng 1.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phân tử axit nucleic phân lập mã hóa và/hoặc biểu hiện polypeptit và polynucleotit protein E, đặc biệt polypeptit và polynucleotit protein E của *H. influenzae* không điển hình, bao gồm, ví dụ, ARN, ribozym ARN, ARN thông tin, ADN bổ trợ, ADN hệ gen, B- và Z-ADN không được xử lý. Theo các phương án khác, sáng chế đề xuất các polynucleotit và polypeptit, và biến thể của chúng, và chế phẩm chứa chúng có thể được sử dụng trong sinh học, chẩn đoán, dự phòng, lâm sàng hoặc điều trị.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các polynucleotit phân lập, chứa ít nhất một gen có chiều dài đầy đủ, mã hóa polypeptit protein E có trình tự axit amin được suy luận nêu trong SEQ ID NO: 1-10 và polynucleotit liên quan mật thiết với chúng và các biến thể của chúng.

Theo một phương án đặc biệt ưu tiên khác, sáng chế đề xuất polypeptit protein E từ *H. influenzae* không điển hình chứa hoặc được cấu thành từ trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 1-10 hoặc biến thể của nó.

Bằng cách sử dụng các thông tin nêu trong bản mô tả này, như trình tự polynucleotit nêu trong SEQ ID NO: 11, polynucleotit theo sáng chế mã hóa polypeptit protein E có thể được điều chế bằng cách sử dụng các phương pháp tách dòng và sàng lọc chuẩn, như các phương pháp tách dòng và giải trình tự mảnh ADN nhiễm sắc thể từ vi khuẩn bằng cách sử dụng chủng tế bào *H. influenzae* 3224A (hoặc 772) không điển hình làm nguyên liệu ban đầu, sau đó tạo ra dòng vô tính có chiều dài đầy đủ. Ví dụ, để tạo ra trình tự polynucleotit theo sáng chế, như trình tự polynucleotit nêu trong SEQ ID NO: 0, thông thường một thư viện dòng vô tính của ADN nhiễm sắc thể của chủng *H. influenzae* 3224A (hoặc 772) không điển hình trong *E.coli* hoặc một số vật chủ thích hợp khác được nghiên cứu bằng oligonucleotit đánh dấu phóng xạ, tốt hơn là 17-mer hoặc dài hơn, có nguồn gốc từ trình tự một phần. Dòng vô tính mang ADN giống như dòng vô tính của mẫu dò sau đó có thể được phân biệt bằng cách sử dụng điều kiện lai nghiêm ngặt. Bằng cách giải trình tự các dòng vô tính riêng biệt xác định bởi việc lai với đoạn môi giải trình tự được thiết kế từ trình tự polypeptit hoặc polynucleotit ban đầu, sau đó có thể kéo dài trình tự polynucleotit theo cả hai hướng để xác định trình tự gen có chiều dài đầy đủ. Một cách thuận tiện, việc giải trình tự này có thể được thực hiện bằng cách, ví dụ, sử dụng ADN sợi kép được làm biến tính được tạo ra từ dòng vô tính plasmit. Các kỹ thuật thích hợp được mô tả bởi Maniatis, T., Fritsch, E.F. và Sambrook et al., *MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL*, 2nd

Ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989). (xem cụ thể Screening By Hybridization 1.90 và Sequencing Denatured Double-Stranded ADN Templates 13.70). Việc giải trình tự ADN hệ gen trực tiếp cũng có thể được thực hiện để thu được trình tự gen có chiều dài đầy đủ. Theo minh họa của sáng chế, polynucleotit nêu trong SEQ ID NO: 11 được tìm thấy trong thư viện ADN có nguồn gốc từ *H. influenzae* không điển hình.

Ngoài ra, mỗi trình tự ADN nêu trong SEQ ID NO: 11 chứa một khung đọc mở mã hóa protein có một số các gốc axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 có khối lượng phân tử giảm có thể tính toán được bằng cách sử dụng giá trị khối lượng phân tử của các gốc axit amin mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết.

Polynucleotit có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 0, nằm giữa codon khởi đầu và codon kết thúc, mã hóa tương ứng polypeptit có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1.

Theo một khía cạnh nữa, sáng chế đề xuất polynucleotit phân lập chứa hoặc được cấu thành từ:

(a) trình tự polynucleotit có độ đồng nhất ít nhất là 85%, tốt hơn là có độ đồng nhất ít nhất là 90%, tốt hơn nữa là có độ đồng nhất ít nhất là 95%, thậm chí tốt hơn nữa là độ đồng nhất ít nhất là 97-99% hoặc đồng nhất hoàn toàn, so với trình tự polynucleotit bất kỳ từ SEQ ID NO: 11 trên toàn bộ chiều dài của trình tự polynucleotit từ SEQ ID NO: 0; hoặc

(b) trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có độ đồng nhất ít nhất là 85%, tốt hơn là có độ đồng nhất ít nhất là 90%, tốt hơn nữa là có độ đồng nhất ít nhất là 95%, thậm chí tốt hơn nữa là độ đồng nhất ít nhất là 97-99% hoặc đồng nhất hoàn toàn 100%, so với trình tự axit amin bất kỳ được chọn từ SEQ ID NO: 1-10 (hoặc mảnh của nó), trên toàn bộ chiều dài của trình tự axit amin từ SEQ ID NO: 1-10 (hoặc mảnh).

Polynucleotit mã hóa polypeptit theo sáng chế, bao gồm thể tương đồng và thể tương đồng khác loài từ các loài khác *H. influenzae* không điển hình, có thể thu được bằng quy trình bao gồm các bước sàng lọc thư viện thích hợp trong điều kiện lai nghiêm ngặt (ví dụ, sử dụng nhiệt độ nằm trong khoảng từ 45–65°C và nồng độ SDS từ 0,1–1%) với mẫu dò đánh dấu hoặc có thể phát hiện được chứa hoặc được cấu thành từ trình tự bất kỳ được chọn từ SEQ ID NO: 11 hoặc mảnh của nó; và phân lập gen có chiều dài đầy đủ và/hoặc gen vô tính chứa trình tự polynucleotit này.

Sáng chế đề xuất trình tự polynucleotit giống trên toàn bộ chiều dài so với trình tự mã hóa (khung đọc mở) nêu trong SEQ ID NO: 11. Sáng chế cũng đề xuất trình tự mã hóa cho polypeptit trưởng thành hoặc mảnh của nó, cũng như trình tự mã hóa cho polypeptit trưởng thành hoặc mảnh trong khung đọc có trình tự mã hóa khác, như trình tự mã hóa cho trình tự dẫn hoặc trình tự tiết, trình tự pre, hoặc pro- hoặc prepro-protein. Polynucleotit theo sáng chế cũng có thể chứa ít nhất một trình tự không mã hóa, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, ví dụ ít nhất một trình tự 5' và 3' không mã hóa, như trình tự được phiên mã nhưng không được dịch mã, tín hiệu kết thúc (như tín hiệu kết thúc phụ thuộc rho và không phụ thuộc rho), vị trí gắn kết ribosom, trình tự Kozak, trình tự ổn định mARN, intron, và tín hiệu polyadenyl hóa. Trình tự polynucleotit còn có thể bao gồm trình tự mã hóa bổ sung mã hóa các axit amin bổ sung. Ví dụ, trình tự đánh dấu tạo điều kiện dễ dàng cho việc tinh chế của polypeptit dung hợp có thể được mã hóa. Theo một số phương án của sáng chế, trình tự đánh dấu là hexa-histidin peptit, như đã được đề xuất trong vector pQE (Qiagen, Inc.) và được mô tả trong Gentz *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 86: 821-824 (1989), hoặc nhãn peptit HA (Wilson *et al.*, *Cell* 37: 767 (1984), cả hai có thể được sử dụng trong tinh chế trình tự polypeptit dung hợp với chúng. Polynucleotit theo sáng chế còn bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, polynucleotit chứa gen cấu trúc và trình tự liên kết tự nhiên của nó kiểm soát sự biểu hiện của gen này.

Trình tự nucleotit mã hóa polypeptit protein E của SEQ ID NO: 1-10 có thể giống với trình tự mã hóa polynucleotit tương ứng nêu trong SEQ ID NO: 11 (hoặc bao gồm trong SEQ ID NO: 11). Theo cách khác, nó có thể là trình tự bất kỳ, mà do sự lặp lại (sự thoái hóa) của việc mã hóa di truyền, cũng mã hóa polypeptit có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-10.

Thuật ngữ "polynucleotit mã hóa polypeptit" được sử dụng trong bản mô tả này gồm các polynucleotit chứa trình tự mã hóa polypeptit theo sáng chế, đặc biệt là polypeptit của vi khuẩn và đặc biệt hơn là polypeptit của protein E của *H. influenzae* không điển hình có trình tự axit amin nêu trong trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1-10 hoặc mảnh của chúng. Thuật ngữ này cũng bao gồm các polynucleotit chứa vùng liên kế đơn hoặc vùng gián đoạn mã hóa polypeptit (ví dụ, polynucleotit bị ngắt bởi thể thực khuẩn xâm nhập, trình tự xen xâm nhập, trình tự vectơ xâm nhập, trình tự gen chuyển xâm nhập, hoặc do việc hiệu chỉnh ARN hoặc tổ chức lại ADN của gen) cùng với các vùng bổ sung, cũng có thể chứa trình tự mã hóa và/hoặc không mã hóa.

Sáng chế còn đề cập đến các biến thể của polynucleotit được mô tả trong bản mô tả này mã hóa các biến thể của polypeptit có trình tự axit amin được suy ra từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 1-10. Mảnh của polynucleotit theo sáng chế có thể được sử dụng để, ví dụ, tổng hợp polynucleotit có chiều dài đầy đủ theo sáng chế.

Mảnh được ưu tiên là mảnh polynucleotit mã hóa epitop tế bào B, ví dụ mảnh/peptit được mô tả trong Ví dụ 10, và các gen khảm, tái tổ hợp chứa mảnh polynucleotit này.

Các phương án đặc biệt ưu tiên khác là polynucleotit mã hóa biến thể protein E, có trình tự axit amin của polypeptit protein E của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 1-10 trong đó một số, rất ít, từ 5 đến 10, từ 1 đến 5, từ 1 đến 3, 2, 1 hoặc không có các gốc axit amin nào được thay thế, cải biến, loại

bỏ và/hoặc bổ sung, theo tổ hợp bất kỳ. Đặc biệt ưu tiên trong số này là sự thay thế, bổ sung và sự khuyết đoạn yên lặng mà không làm biến đổi các đặc tính và hoạt tính của polypeptit protein E (ví dụ, các đặc tính được mô tả trong phần ví dụ của bản mô tả này).

Các phương án ưu tiên khác của sáng chế là polynucleotit giống ít nhất 85% trên toàn bộ chiều dài của chúng so với các polynucleotit mã hóa polypeptit protein E có trình tự axit amin đã nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 1-10, và polynucleotit bổ sung vào các polynucleotit này. Mặt khác, ưu tiên hơn nữa là polynucleotit bao gồm vùng giống ít nhất là 90% trên toàn bộ chiều dài của nó so với polynucleotit mã hóa polypeptit và polynucleotit protein E bổ sung vào đó. Về mặt này, đặc biệt ưu tiên polynucleotit giống ít nhất 95% trên toàn bộ chiều dài của nó so với các polynucleotit mã hóa polypeptit và polynucleotit protein E bổ sung vào đó. Ngoài ra, polynucleotit giống ít nhất 97% là ưu tiên hơn so với polynucleotit giống ít nhất 95%, và trong số này polynucleotit giống ít nhất 98% và ít nhất 99% là ưu tiên đặc biệt hơn, trong số đó polynucleotit giống ít nhất 99% là ưu tiên hơn nữa.

Các phương án ưu tiên là polynucleotit mã hóa polypeptit về cơ bản có chức năng hoặc hoạt tính sinh học giống với polypeptit trưởng thành được mã hóa bởi trình tự ADN chọn từ SEQ ID NO: 11 (ví dụ các hoạt tính được mô tả trong phần ví dụ của bản mô tả này).

Theo một số phương án ưu tiên, sáng chế đề xuất polynucleotit mà lai, đặc biệt trong điều kiện nghiêm ngặt, với trình tự polynucleotit protein E, như các polynucleotit có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 11.

Sáng chế còn đề cập đến polynucleotit mà lai với trình tự polynucleotit được đề xuất trong bản mô tả này. Về mặt này, sáng chế đặc biệt đề cập đến polynucleotit mà lai trong điều kiện nghiêm ngặt với polynucleotit mô tả trong bản mô tả này. Khi sử dụng trong bản mô tả này, các thuật ngữ "điều kiện

nghiêm ngặt" và "điều kiện lai nghiêm ngặt" có nghĩa là việc lai chỉ xảy ra nếu có độ đồng nhất giữa các trình tự ít nhất là 95% và tốt hơn là ít nhất 97%. Ví dụ cụ thể về điều kiện lai nghiêm ngặt là ủ qua đêm ở nhiệt độ 42°C trong dung dịch chứa: 50% formamit, 5x SSC (150mM NaCl, 15mM trisnatri xitrat), 50 mM natri phosphat (pH=7,6), 5x dung dịch Denhardt, 10% đextran sulfat, và 20 microgam/ml ADN tinh dịch cá hồi được làm biến tính, biến dạng, sau đó là rửa khung lai hóa trong 0,1x SSC ở khoảng 65°C. Sự lai và điều kiện rửa là đã biết và đã được minh họa trong Sambrook, *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989), đặc biệt là ở chương 11. Sự lai trong dung dịch cũng có thể được sử dụng với trình tự polynucleotit theo sáng chế.

Sáng chế còn đề xuất polynucleotit được cấu thành từ hoặc chứa trình tự polynucleotit thu được bằng cách sàng lọc thư viện thích hợp chứa gen đầy đủ đối với trình tự polynucleotit nêu trong trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO: 11 trong điều kiện lai nghiêm ngặt với mẫu dò có trình tự của trình tự polynucleotit này nêu trong trình tự tương ứng SEQ ID NO: 11 hoặc mảnh của nó; và phân lập trình tự polynucleotit này. Các mảnh có thể sử dụng để thu được polynucleotit này bao gồm, ví dụ, mẫu dò và đoạn mồi đã được mô tả đầy đủ trong bản mô tả này.

Như đã bàn luận về thử nghiệm polynucleotit trong sáng chế, ví dụ, polynucleotit theo sáng chế, có thể được sử dụng làm mẫu dò sự lai đối với ARN, ADN bổ trợ và ADN hệ gen để phân lập ADN bổ trợ có chiều dài đầy đủ và gen dòng vô tính mã hóa protein E và để phân lập ADN bổ trợ và gen dòng vô tính của các gen khác có sự đồng nhất cao, đặc biệt là sự đồng nhất trình tự cao, đối với các gen protein E. Các mẫu dò này thường bao gồm ít nhất 15 gốc nucleotit hoặc cặp bazơ. Tốt hơn là, các mẫu dò này sẽ có ít nhất 30 gốc nucleotit hoặc cặp bazơ và có thể có ít nhất 50 gốc nucleotit hoặc cặp bazơ. Mẫu dò đặc biệt ưu tiên

sẽ có ít nhất 20 gốc nucleotit hoặc cặp bazơ và sẽ có ít hơn 30 gốc nucleotit hoặc cặp bazơ.

Vùng mã hóa của gen protein E có thể được phân lập bằng cách sàng lọc sử dụng trình tự ADN nêu trong SEQ ID NO: 11 để tổng hợp mẫu dò oligonucleotit. Oligonucleotit được đánh dấu có trình tự bổ sung vào trình tự gen theo sáng chế sau đó được sử dụng để sàng lọc thư viện của ADN bổ trợ, ADN hệ gen hoặc mARN để xác định thành phần nào của thư viện mà mẫu dò lai cùng.

Có một số phương pháp có thể áp dụng và đã biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này để tạo ra ADN có chiều dài đầy đủ, hoặc kéo dài các ADN ngắn, ví dụ các phương pháp dựa trên tác dụng khuếch đại nhanh đầu ADN bổ trợ (RACE) (xem, ví dụ, Frohman, et al., PNAS USA 85: 8998-9002, 1988). Sự cải biến gần đây của kỹ thuật này, được minh họa bởi công nghệ Marathon™ (Clontech Laboratories Inc.) chẳng hạn, đã làm đơn giản hóa đáng kể việc nghiên cứu đối với các ADN bổ trợ dài hơn. Trong công nghệ Marathon™, ADN bổ trợ được tạo ra từ mARN được chiết từ mô được chọn và trình tự 'thích ứng' gắn với mỗi đầu. Sự khuếch đại axit nucleic (PCR) sau đó được thực hiện để khuếch đại đầu 5' "khuyết" của ADN bằng cách sử dụng sự phối hợp của đoạn môi oligonucleotit đặc hiệu gen và đặc hiệu thích ứng. Sau đó phản ứng PCR được lặp lại bằng cách sử dụng đoạn môi "được lồng vào", là đoạn môi được tạo ra để phối hợp trong sản phẩm được khuếch đại (thường là đoạn môi đặc hiệu thích ứng còn được phối hợp ở vị trí 3' trong trình tự thích ứng và đoạn môi đặc hiệu gen còn được phối hợp ở vị trí 5' trong trình tự gen được chọn). Các sản phẩm của phản ứng này sau đó có thể được phân tích bằng việc giải trình tự ADN và ADN có chiều dài đầy đủ được tạo ra bằng việc liên kết trực tiếp sản phẩm vào ADN đang có để thu được trình tự đầy đủ, hoặc tiến hành PCR chiều dài đầy đủ riêng biệt bằng cách sử dụng thông tin trình tự mới đối với sự sắp xếp của đoạn môi 5'.

Polynucleotit và polypeptit theo sáng chế có thể được dùng làm, ví dụ, các chất phản ứng và nguyên liệu nghiên cứu để phát hiện ra việc điều trị và chẩn đoán bệnh, đặc biệt là các bệnh ở người, như đã bàn luận trong các thử nghiệm về polynucleotit.

Polynucleotit theo sáng chế là oligonucleotit có nguồn gốc từ trình tự của SEQ ID NO: 11 có thể được sử dụng trong quy trình nêu dưới đây, nhưng tốt hơn là đối với PCR, để xác định xem polynucleotit được xác định trong bản mô tả này toàn bộ hoặc một phần có được phiên mã trong vi khuẩn ở mô bị nhiễm khuẩn hay không. Nhận thấy rằng các trình tự này cũng có thể được dùng trong chẩn đoán giai đoạn nhiễm trùng và loại nhiễm trùng mà mầm bệnh gây ra.

Sáng chế cũng đề xuất polynucleotit mã hóa polypeptit là protein trưởng thành có bổ sung thêm các axit amin có đầu amino hoặc carboxyl, hoặc axit amin ở bên trong polypeptit trưởng thành (khi dạng trưởng thành có nhiều hơn một chuỗi polypeptit, chẳng hạn). Các trình tự này có thể đóng vai trò trong xử lý protein từ tiền chất thành dạng trưởng thành, có thể cho phép việc vận chuyển protein, có thể kéo dài hoặc rút ngắn thời gian bán hủy của protein hoặc có thể dễ dàng thao tác với protein trong thử nghiệm hoặc sản xuất, ngoài các ứng dụng khác. Thông thường trong trường hợp *in vivo*, các axit amin bổ sung có thể được xử lý tách khỏi protein trưởng thành bằng các enzym của tế bào.

Đối với mỗi và mọi polynucleotit theo sáng chế, sáng chế đề xuất polynucleotit bổ sung vào nó. Ưu tiên các polynucleotit bổ sung này bổ sung đầy đủ vào mỗi polynucleotit mà chúng bổ sung.

Protein tiền chất, có dạng trưởng thành của polypeptit được dung hợp với một hoặc nhiều tiền trình tự có thể là dạng không hoạt hóa của polypeptit. Khi tiền trình tự được loại đi, các tiền chất không hoạt hóa này thường được hoạt hóa.

Một số hoặc tất cả các tiền trình tự có thể được loại đi trước khi hoạt hóa. Thông thường, các tiền chất này được gọi là các proprotein.

Ngoài các chữ cái đại diện A, G, C, T/U chuẩn cho nucleotit, thuật ngữ "N" cũng có thể được sử dụng trong mô tả một số polynucleotit theo sáng chế. "N" có nghĩa là nucleotit bất kỳ trong số bốn nucleotit ADN hoặc ARN có thể có mặt ở vị trí đã định trong trình tự ADN hoặc ARN, trừ khi ưu tiên rằng N không phải là axit nucleic khi phối hợp với các vị trí nucleotit liền kề, khi đọc ở khung đọc đúng, sẽ có tác dụng tạo ra codon kết thúc sớm trong khung đọc này.

Tóm lại, polynucleotit theo sáng chế có thể mã hóa protein trưởng thành, protein trưởng thành cộng với trình tự dẫn (trình tự này có thể được coi là preprotein), tiền chất của protein trưởng thành có một hoặc nhiều tiền trình tự không phải là trình tự dẫn của preprotein, hoặc preproprotein, là tiền chất đối với proprotein, có trình tự dẫn và một hoặc nhiều tiền trình tự, thường được loại đi trong các bước xử lý tạo dạng hoạt hóa và trưởng thành của polypeptit.

Theo một khía cạnh, sáng chế mô tả việc sử dụng polynucleotit theo sáng chế nhằm mục đích điều trị hoặc dự phòng, đặc biệt là trong miễn dịch di truyền.

Việc sử dụng polynucleotit theo sáng chế trong miễn dịch di truyền tốt hơn là dùng phương pháp phân phối thích hợp như tiêm trực tiếp plasmid ADN vào cơ (Wolff *et al.*, *Hum Mol Genet* (1992) 1: 363, Manthorpe *et al.*, *Hum. Gene Ther.* (1983) 4: 419), sự phân phối của ADN được tạo phức với chất mang protein đặc hiệu (Wu *et al.*, *J Biol Chem.* (1989) 264: 16985), đồng kết tủa ADN với canxi phosphat (Benvenisty & Reshef, *PNAS USA*, (1986) 83: 9551), tạo vỏ của ADN ở các dạng liposom khác nhau (Kaneda *et al.*, *Science* (1989) 243: 375), dùng hạt bắn phá (Tang *et al.*, *Nature* (1992) 356:152, Eisenbraun *et al.*, *ADN Cell Biol* (1993) 12: 791) và sự nhiễm *in vivo* bằng

cách sử dụng vectơ retrovirus tách dòng (Seeger *et al.*, *PNAS USA* (1984) 81: 5849).

Vectơ, tế bào vật chủ, hệ biểu hiện

Sáng chế còn đề cập đến vectơ chứa polynucleotit hoặc polynucleotit theo sáng chế, tế bào vật chủ được xử lý bằng kỹ thuật di truyền với vectơ theo sáng chế và sự sản xuất polypeptit theo sáng chế bằng kỹ thuật tái tổ hợp. Hệ dịch mã không tế bào cũng có thể được dùng để sản xuất các protein này có sử dụng các ARN có nguồn gốc từ cấu trúc ADN theo sáng chế.

Polypeptit tái tổ hợp theo sáng chế có thể được điều chế bằng các quy trình mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết từ tế bào vật chủ được xử lý bằng kỹ thuật di truyền chứa các hệ biểu hiện. Do đó, theo một khía cạnh nữa, sáng chế đề cập đến hệ biểu hiện bao gồm một polynucleotit hoặc các polynucleotit theo sáng chế, đề cập đến tế bào vật chủ được xử lý bằng kỹ thuật di truyền với các hệ biểu hiện này, và đến việc sản xuất polypeptit theo sáng chế bằng kỹ thuật tái tổ hợp.

Đối với việc sản xuất tái tổ hợp polypeptit theo sáng chế, tế bào vật chủ có thể được xử lý bằng kỹ thuật di truyền để kết hợp với hệ biểu hiện hoặc các phần của chúng hoặc polynucleotit theo sáng chế. Việc đưa polynucleotit vào trong tế bào vật chủ có thể được thực hiện bằng các phương pháp được mô tả trong nhiều hướng dẫn thử nghiệm chuẩn, như Davis, *et al.*, *BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY*, (1986) và Sambrook, *et al.*, *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), như, sự chuyển nhiễm canxi phosphat, sự chuyển nhiễm qua trung gian DEAE-dextran, sự chuyển truyền bệnh (transvection), vi tiêm, sự chuyển nhiễm cation qua trung gian lipid, xung điện, sự tiếp hợp, sự tải nạp, nạp vết (scrape loading), dùng súng bắn gen và nhiễm trùng.

Các ví dụ tiêu biểu về vật chủ thích hợp bao gồm tế bào vi khuẩn, như tế bào của streptococci, staphylococci, enterococci, *E. coli*, streptomyces, cyanobacteria, *Bacillus subtilis*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* và *Moraxella catarrhalis*; tế bào nấm, như tế bào nấm men, *Kluveromyces*, *Saccharomyces*, *Pichia*, basidiomycete, *Candida albicans* và *Aspergillus*; tế bào côn trùng như tế bào của *Drosophila* S2 và *Spodoptera* Sf9; tế bào động vật như CHO, COS, HeLa, C127, 3T3, BHK, 293, CV-1 và tế bào u melanin Bowes; và tế bào thực vật, như tế bào của cây hạt trần hoặc cây hạt kín.

Nhiều hệ biểu hiện có thể được sử dụng để sản xuất polypeptit theo sáng chế. Các vector này bao gồm, trong số các vector khác, các vector có nguồn gốc từ nhiễm sắc thể, episom và virus, ví dụ, vector có nguồn gốc từ plasmid vi khuẩn, từ thể thực khuẩn, từ transposon, từ episom nấm men, từ yếu tố xen đoạn, từ yếu tố nhiễm sắc thể nấm men, từ virus như baculovirus, papova virus, như SV40, virus gây bệnh đậu bò, adenovirus, virus gây bệnh đậu gà, virus giả dại, picornavirus, retrovirus, và alphavirus và vector có nguồn gốc từ sự kết hợp giữa chúng, như sự kết hợp có nguồn gốc từ yếu tố di truyền plasmid và thể thực khuẩn, như cosmid và phagemid. Khái niệm hệ biểu hiện có thể chứa vùng kiểm soát điều hòa cũng như gây ra sự biểu hiện. Nói chung, hệ hoặc vector bất kỳ thích hợp để duy trì, truyền giống hoặc biểu hiện polynucleotit và/hoặc biểu hiện polypeptit ở vật chủ có thể được sử dụng để biểu hiện về mặt này. Trình tự ADN thích hợp có thể được cài xen vào hệ biểu hiện này bằng nhiều kỹ thuật thông thường đã biết, như, kỹ thuật đã nêu trong Sambrook *et al.*, *MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL*, (nêu trên).

Trong hệ biểu hiện tái tổ hợp ở sinh vật có nhân điển hình, để tiết protein đã được dịch mã vào khoang của lưới nội chất, vào chất ngoại vi hoặc vào môi trường ngoại bào, tín hiệu tiết thích hợp có thể được kết hợp vào trong polypeptit đã được biểu hiện. Các tín hiệu này có thể là nội sinh đối với polypeptit hoặc chúng có thể là các tín hiệu khác loài.

Polypeptit theo sáng chế có thể được thu hồi và tinh chế từ môi trường nuôi cấy tế bào tái tổ hợp bằng các phương pháp đã biết bao gồm sự kết tủa amoni sulfat hoặc etanol, sự chiết bằng axit, sắc ký trao đổi anion hoặc cation, sắc ký phosphoxenluloza, sắc ký tương tác kỵ nước, sắc ký ái lực, sắc ký hydroxylapatit và sắc ký lectin. Tốt hơn nữa, sắc ký ái lực ion kim loại (IMAC) được dùng để tinh chế. Các kỹ thuật đã biết để tái gấp cuộn protein có thể được dùng để tái sinh thể hoạt hóa khi polypeptit bị thoái hóa trong quá trình tổng hợp ở nội bào, quá trình phân lập và/hoặc tinh chế.

Hệ biểu hiện cũng có thể là vi sinh vật sống tái tổ hợp, như virus hoặc vi khuẩn. Gen quan tâm có thể được cài xen vào hệ gen của virus hoặc vi khuẩn sống tái tổ hợp. Sự cấy ghép và gây nhiễm *in vivo* bằng vector sống này sẽ dẫn đến biểu hiện *in vivo* của kháng nguyên và gây ra đáp ứng miễn dịch. Virus và vi khuẩn được sử dụng nhằm mục đích này là, chẳng hạn: virus truyền bệnh đậu (ví dụ, đậu bò, đậu gà, đậu chim), alphavirus (Sindbis virus, Semliki Forest Virus, Venezuelan Equine Encephalitis Virus), adenovirus, virus liên quan đến adeno, picornavirus (virus bại liệt, rhinovirus), herpesvirus (varicella zoster virus, v.v.), *Listeria*, *Salmonella*, *Shigella*, BCG, streptococci. Các virus và vi khuẩn này có thể độc, hoặc được làm giảm độc theo nhiều cách để thu được vaccine sống. Vaccine sống này cũng tạo nên một phần của sáng chế.

Thử nghiệm chẩn đoán, tiên lượng, phân loại typ huyết thanh và gây đột biến

Sáng chế còn mô tả việc sử dụng polynucleotit và polypeptit protein E theo sáng chế để sử dụng làm chất phản ứng chẩn đoán. Việc phát hiện polynucleotit và/hoặc polypeptit protein E trong sinh vật có nhân điển hình, cụ thể là động vật có vú, và đặc biệt là người, sẽ tạo ra phương pháp chẩn đoán để chẩn đoán bệnh, giai đoạn của bệnh hoặc đáp ứng của sinh vật bị nhiễm với thuốc. Sinh vật có nhân điển hình, cụ thể là động vật có vú, và đặc biệt là người, cụ thể là người bị nhiễm hoặc nghi ngờ bị nhiễm sinh vật chứa gen protein E hoặc protein, có thể được phát hiện bởi hàm lượng axit nucleic hoặc axit amin

bằng nhiều kỹ thuật đã biết cũng như bằng các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này.

Polypeptit và polynucleotit để tiên lượng, chẩn đoán hoặc làm các phép phân tích khác có thể thu được từ phần cơ thể cá thể bị nhiễm và/hoặc được coi là bị nhiễm. Polynucleotit từ bất kỳ trong các nguồn này, cụ thể là ADN hoặc ARN, có thể được sử dụng trực tiếp để phát hiện hoặc có thể được khuếch đại enzym bằng cách sử dụng PCR hoặc kỹ thuật khuếch đại khác bất kỳ trước khi phân tích. ARN, cụ thể là mARN, ADN bổ trợ và ADN hệ gen cũng có thể được sử dụng theo cách này. Việc sử dụng sự khuếch đại, mô tả đặc điểm của loài và chủng của sinh vật nhiễm hoặc cư trú ở cá thể, có thể được thực hiện bằng cách phân tích kiểu gen của polynucleotit được chọn của sinh vật này. Sự khuyết đoạn và xen đoạn có thể được phát hiện theo sự thay đổi về kích thước của sản phẩm được khuếch đại so với kiểu gen của trình tự so sánh được chọn từ sinh vật liên quan, tốt hơn là loài khác nhau của cùng một giống hoặc chủng khác nhau của cùng một loài. Đột biến điểm có thể được xác định bằng cách lai ADN đã được khuếch đại với trình tự polynucleotit protein E đánh dấu. Trình tự được làm phù hợp hoàn hảo hoặc đáng kể có thể được phân biệt so với dạng kép không phù hợp không hoàn hảo hoặc đáng kể hơn bởi việc tiêu hóa ADNaza hoặc ARNaza, lần lượt đối với ADN hoặc ARN, hoặc bằng việc phát hiện sự khác nhau về nhiệt độ chảy hoặc động học phân hủy. Sự khác nhau về trình tự polynucleotit cũng có thể được phát hiện bằng cách biến đổi tính lưu động điện di của mảnh polynucleotit trong gel so với trình tự so sánh. Điều này có thể được thực hiện với sự có hoặc không có chất làm biến tính. Sự khác nhau của polynucleotit cũng có thể được phát hiện bằng việc sắp xếp trực tiếp trình tự ADN hoặc ARN. Xem, ví dụ, Myers *et al.*, *Science*, 230: 1242 (1985). Sự thay đổi về trình tự ở các vị trí đặc hiệu cũng có thể được phát hiện bằng thử nghiệm bảo vệ nucleaza, như ARNaza, thử nghiệm bảo vệ V1 và S1 hoặc phương pháp tách hóa học. Xem, ví dụ, Cotton *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 85: 4397-4401 (1985).

Theo một phương án khác, dãy mẫu dò oligonucleotit bao gồm trình tự nucleotit protein E hoặc mảnh của chúng có thể được xây dựng để kiểm soát sự sàng lọc của, ví dụ, đột biến di truyền, typ huyết thanh, phân loại hoặc xác định sinh giới. Phương pháp này là đã biết và có khả năng ứng dụng chung và có thể được sử dụng để giải thích nhiều vấn đề trong di truyền phân tử bao gồm sự biểu hiện gen, sự liên kết di truyền, và khả năng biến đổi di truyền (xem, ví dụ, Chee et al., Science, 274: 610 (1996)).

Do đó, theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến kit chẩn đoán bao gồm:

- (a) polynucleotit theo sáng chế, tốt hơn là trình tự nucleotit bất kỳ của SEQ ID NO: 11, hoặc mảnh của chúng;
- (b) trình tự nucleotit bổ sung vào polynucleotit (a);
- (c) polypeptit theo sáng chế, tốt hơn là polypeptit bất kỳ có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-10 hoặc mảnh của chúng; hoặc
- (d) kháng thể đối với polypeptit theo sáng chế, tốt hơn là với polypeptit bất kỳ có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-10 .

Cần phải hiểu rằng trong các kit (a), (b), (c) hoặc (d) này có thể bao gồm thành phần cơ bản. Kit như vậy sẽ được dùng trong chẩn đoán bệnh hoặc độ nhạy với bệnh, trong số các tác dụng khác.

Sáng chế còn mô tả việc sử dụng polynucleotit theo sáng chế làm chất phản ứng chẩn đoán. Việc phát hiện dạng đột biến của polynucleotit theo sáng chế, tốt hơn là trình tự bất kỳ nêu trong SEQ ID NO: 11, có liên quan đến bệnh hoặc khả năng gây bệnh sẽ là công cụ chẩn đoán có thể bổ sung vào, hoặc xác định, sự chẩn đoán bệnh, tiên lượng tiến triển bệnh, sự xác định tình trạng bệnh, hoặc độ nhạy với bệnh, thu được từ sự biểu hiện dưới mức, sự biểu hiện quá mức hoặc biểu hiện biến đổi của polynucleotit. Các sinh vật, đặc biệt là sinh vật bị nhiễm, mang đột biến trong polynucleotit này có thể được phát hiện bởi mức

polynucleotit bằng nhiều kỹ thuật, như các kỹ thuật được mô tả trong bản mô tả này.

Các tế bào của sinh vật mang đột biến hoặc dạng đa hình (sự biến dị alen) trong polynucleotit và/hoặc polypeptit theo sáng chế cũng có thể được phát hiện bởi mức polynucleotit hoặc polypeptit bằng nhiều kỹ thuật, cho phép phân loại typ huyết thanh, chẳng hạn. Ví dụ, RT-PCR có thể được sử dụng để phát hiện đột biến trong ARN. Đặc biệt ưu tiên việc sử dụng RT-PCR cùng với hệ phát hiện tự động, như GeneScan. ARN, ADN bổ trợ hoặc ADN hệ gen cũng có thể được sử dụng cho mục đích tương tự, PCR. Ví dụ, đoạn môi PCR bổ sung cho polynucleotit mã hóa polypeptit protein E có thể được sử dụng để xác định và phân tích đột biến.

Sáng chế còn đề xuất đoạn môi có 1, 2, 3 hoặc 4 nucleotit được loại bỏ khỏi đầu 5' và/hoặc 3'. Các đoạn môi này có thể được sử dụng cho, ngoài các ứng dụng khác, khuếch đại protein E ADN và/hoặc ARN được phân lập từ các mẫu có nguồn gốc từ cá thể, như bộ phận cơ thể. Các đoạn môi cũng có thể được sử dụng để khuếch đại polynucleotit được phân lập từ cá thể bị nhiễm, sau đó polynucleotit có thể được dùng trong nhiều kỹ thuật khác nhau để phân tích trình tự polynucleotit. Trong cách này, đột biến trong trình tự polynucleotit có thể được phát hiện và được sử dụng để chẩn đoán và/hoặc tiên lượng bệnh nhiễm trùng hoặc tình trạng hoặc tiến triển của nó, hoặc để phân loại typ huyết thanh và/hoặc phân loại chất gây nhiễm.

Sáng chế còn đề cập đến quy trình để chẩn đoán bệnh, tốt hơn đó là bệnh nhiễm vi khuẩn, tốt hơn nữa là bệnh nhiễm trùng do *H. influenzae* không điển hình gây ra, bao gồm việc xác định từ mẫu có nguồn gốc từ cá thể, như các chất trong cơ thể, sự tăng mức độ biểu hiện của polynucleotit có trình tự bất kỳ nêu trong SEQ ID NO: 11. Sự tăng hoặc giảm mức độ biểu hiện của polynucleotit protein E có thể đo được bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực để định lượng polynucleotit, như phương pháp khuếch đại, phương

pháp bảo vệ PCR, RT-PCR, ARNza, phương pháp thẩm tách Northern, phương pháp đo phổ và các phương pháp lai khác.

Ngoài ra, thử nghiệm chẩn đoán theo sáng chế để phát hiện sự biểu hiện quá mức của polypeptit protein E so với các mẫu mô đối chứng bình thường có thể được sử dụng để phát hiện bệnh nhiễm trùng, chẳng hạn. Các kỹ thuật thử nghiệm có thể được sử dụng để xác định mức polypeptit protein E, trong mẫu có nguồn gốc từ vật chủ, như bộ phận cơ thể, được biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Các phương pháp thử nghiệm này bao gồm thử nghiệm miễn dịch phóng xạ, thử nghiệm gắn kết cạnh tranh, phân tích thẩm tách Western, thử nghiệm kẹp kháng thể, thử nghiệm ELISA và phát hiện kháng thể.

Polynucleotit theo sáng chế có thể được sử dụng làm các thành phần của dây polynucleotit, tốt hơn là dây hoặc mạng lưới có mật độ cao. Các dây có mật độ cao này đặc biệt có thể được sử dụng cho mục đích chẩn đoán và tiên lượng. Ví dụ, bộ các điểm, mỗi điểm bao gồm một gen khác nhau, và còn bao gồm polynucleotit hoặc polynucleotit theo sáng chế, có thể được sử dụng để dò, như sử dụng sự lai hoặc sự khuếch đại axit nucleic, sử dụng mẫu dò thu được hoặc có nguồn gốc từ mẫu cơ thể, để xác định sự có mặt của trình tự polynucleotit cụ thể hoặc trình tự liên quan trong cá thể. Sự có mặt này có thể chỉ sự có mặt của mầm bệnh, cụ thể là *H. influenzae* không điển hình, và có thể sử dụng trong chẩn đoán và/hoặc tiên lượng bệnh hoặc tiến triển bệnh. Mạng lưới bao gồm một số lượng biến thể của trình tự polynucleotit bất kỳ nêu trong SEQ ID NO: 11 được ưu tiên. Cũng ưu tiên một số lượng biến thể của trình tự polynucleotit mã hóa trình tự polypeptit bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 1-10.

Kháng thể

Polypeptit và polynucleotit theo sáng chế hoặc biến thể của chúng, hoặc các tế bào biểu hiện các thành phần này có thể được sử dụng làm chất kháng

nguyên để sản xuất kháng thể tương ứng đặc hiệu miễn dịch đối với các polypeptit hoặc polynucleotit này. Mặt khác, mimotop, đặc biệt là mimotop peptit, của các epitop trong trình tự polypeptit cũng có thể được sử dụng làm chất kháng nguyên để sản xuất kháng thể đặc hiệu miễn dịch đối với polypeptit theo sáng chế. Thuật ngữ “đặc hiệu miễn dịch” có nghĩa là kháng thể về cơ bản có ái lực đối với polypeptit theo sáng chế lớn hơn so với ái lực của chúng đối với các polypeptit liên quan khác trong tình trạng kỹ thuật.

Theo một số phương án ưu tiên của sáng chế, sáng chế đề xuất kháng thể chống polypeptit hoặc polynucleotit protein E.

Kháng thể được tạo ra chống polypeptit hoặc polynucleotit theo sáng chế có thể thu được bằng cách dùng polypeptit và/hoặc polynucleotit theo sáng chế, hoặc mảnh mang epitop của mỗi chất hoặc cả hai, thể tương đồng của mỗi chất hoặc cả hai, hoặc các tế bào biểu hiện mỗi chất hoặc cả hai, cho động vật, tốt hơn là đối tượng không phải người, bằng cách sử dụng các protocol thông thường. Đối với việc sản xuất kháng thể đơn dòng, có thể sử dụng kỹ thuật bất kỳ đã biết trong lĩnh vực trong đó kháng thể được tạo ra bằng nuôi cấy liên tục dòng tế bào. Ví dụ bao gồm các kỹ thuật khác nhau, như kỹ thuật nêu trong Kohler, G. and Milstein, C., *Nature* 256: 495-497 (1975); Kozbor *et al.*, *Immunology Today* 4: 72 (1983); Cole *et al.*, pg. 77-96 in *MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY*, Alan R. Liss, Inc. (1985).

Các kỹ thuật để sản xuất kháng thể chuỗi đơn (patent Mỹ số 4,946,778) có thể thích hợp để sản xuất kháng thể chuỗi đơn đối với polypeptit hoặc polynucleotit theo sáng chế. Cũng vậy, chuột chuyển gen, hoặc các sinh vật hoặc động vật khác, như động vật có vú khác, có thể được sử dụng để biểu hiện kháng thể được làm giống như của người đặc hiệu miễn dịch đối với polypeptit hoặc polynucleotit theo sáng chế.

Mặt khác, kỹ thuật hiển thị thể thực khuẩn có thể được dùng để chọn gen kháng thể có hoạt tính gắn kết hướng polypeptit theo sáng chế từ kho gen-v được khuếch đại PCR của tế bào limphô của người được sàng lọc về kháng protein E hoặc từ thư viện non (McCafferty, *et al.*, (1990), *Nature* 348, 552-554; Marks, *et al.*, (1992) *Biotechnology* 10, 779-783). Ái lực của các kháng thể này cũng có thể được cải thiện bằng cách, chẳng hạn, sắp xếp lại chuỗi (Clackson *et al.*, (1991) *Nature* 352: 628).

Kháng thể được mô tả ở trên có thể được dùng để phân lập hoặc để xác định dòng vô tính biểu hiện polypeptit hoặc polynucleotit theo sáng chế để tinh chế polypeptit hoặc polynucleotit bằng, chẳng hạn, sắc ký ái lực.

Như vậy, trong các kháng thể, kháng thể chống polypeptit protein E hoặc polynucleotit protein E có thể được dùng để điều trị bệnh nhiễm trùng, đặc biệt là nhiễm vi khuẩn.

Biến thể polypeptit bao gồm các biến thể tương đương về mặt kháng nguyên, epitop hoặc miễn dịch cũng là một khía cạnh đặc biệt của sáng chế.

Tốt hơn là, kháng thể hoặc biến thể của chúng được biến đổi để làm cho nó ít tính kháng nguyên hơn trong cá thể. Ví dụ, nếu cá thể là người thì tốt hơn là kháng thể được "làm giống như của người", trong đó vùng quyết định bổ sung hoặc các vùng của kháng thể có nguồn gốc từ tế bào lai được cấy ghép vào kháng thể người đơn dòng, ví dụ như đã được mô tả trong Jones *et al.* (1986), *Nature* 321, 522-525 hoặc Tempest *et al.*, (1991) *Biotechnology* 9, 266-273.

Chất đối kháng và chất chủ vận – Thử nghiệm và phân tử

Polypeptit và polynucleotit theo sáng chế cũng có thể được sử dụng để đánh giá sự gắn kết của cơ chất và phối tử phân tử nhỏ trong, ví dụ, các tế bào, chế phẩm vô bào, thư viện hóa học, và hỗn hợp sản phẩm tự nhiên. Các cơ chất và phối tử này có thể là cơ chất và phối tử tự nhiên hoặc có thể là chất giả về cấu

trúc hoặc chức năng. Xem, ví dụ, Coligan *et al.*, *Current Protocols in Immunology* 1(2): Chapter 5 (1991).

Các phương pháp sàng lọc có thể đo lường đơn giản việc gắn kết của hợp chất đang xét với polypeptit hoặc polynucleotit, hoặc với tế bào hoặc màng mang polypeptit hoặc polynucleotit, hoặc protein dung hợp của polypeptit bằng cách liên kết trực tiếp hoặc gián tiếp chất đánh dấu với hợp chất đang xét. Mặt khác, phương pháp sàng lọc có thể bao gồm sự cạnh tranh với chất đánh dấu cạnh tranh. Ngoài ra, các phương pháp sàng lọc này có thể kiểm tra xem hợp chất đang xét dẫn đến sự tạo tín hiệu bằng sự hoạt hóa hay ức chế của polypeptit hoặc polynucleotit, có sử dụng hệ phát hiện thích hợp với các tế bào chứa polypeptit hoặc polynucleotit. Chất ức chế sự hoạt hóa thường được thử nghiệm với sự có mặt của chất chủ vận đã biết và hiệu quả hoạt hóa bởi chất chủ vận thu được với sự có mặt của hợp chất đang xét. Polypeptit hoạt hóa cơ bản và/hoặc polypeptit và polynucleotit biểu hiện cơ bản có thể được dùng trong phương pháp sàng lọc chất chủ vận hoặc chất ức chế nghịch đảo, với sự vắng mặt của chất chủ vận hoặc chất ức chế, bằng cách kiểm tra xem hợp chất đang xét có dẫn đến sự ức chế hoạt hóa polypeptit hoặc polynucleotit hay không, là trường hợp có thể xảy ra. Ngoài ra, phương pháp sàng lọc đơn giản có thể bao gồm các bước trộn hợp chất đang xét với dung dịch chứa polypeptit hoặc polynucleotit theo sáng chế, để tạo thành hỗn hợp, đo lường hoạt tính polypeptit protein E và/hoặc polynucleotit trong hỗn hợp, và so sánh hoạt tính của polypeptit protein E và/hoặc polynucleotit của hỗn hợp với mẫu chuẩn. Protein dung hợp, như protein được sản xuất từ phần Fc và polypeptit protein E, như được mô tả trên đây, cũng có thể được sử dụng cho thử nghiệm sàng lọc hiệu suất cao để xác định chất đối kháng của polypeptit theo sáng chế, cũng như polypeptit liên quan đến phát sinh loài và và/hoặc chức năng (xem D. Bennett *et al.*, *J Mol Recognition*, 8:52-58 (1995); và K. Johanson *et al.*, *J Biol Chem*, 270(16):9459-9471 (1995)).

Polynucleotit, polypeptit và kháng thể gắn kết với và/hoặc tương tác với polypeptit theo sáng chế cũng có thể được sử dụng để định hình phương pháp sàng lọc phát hiện tác dụng của hợp chất bổ sung lên sự sản xuất mARN và/hoặc polypeptit trong tế bào. Ví dụ, thử nghiệm ELISA có thể được xây dựng để đo lường mức polypeptit tiết hoặc liên quan đến tế bào bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng và đa dòng bằng các phương pháp chuẩn đã biết trong lĩnh vực. Phương pháp này cũng có thể được dùng để phát hiện các chất có thể ức chế hoặc làm tăng sự sản xuất polypeptit (cũng được gọi tương ứng là chất đối kháng hoặc chất chủ vận) từ các tế bào hoặc mô được điều khiển thích hợp.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp sàng lọc các hợp chất để xác định các hợp chất mà làm tăng (chất chủ vận) hoặc ngăn cản (chất đối kháng) hoạt tính của polypeptit hoặc polynucleotit protein E, đặc biệt là các hợp chất là chất kích khuẩn và/hoặc chất diệt khuẩn. Phương pháp sàng lọc có thể bao gồm các kỹ thuật có hiệu suất cao. Ví dụ, để sàng lọc chất chủ vận hoặc chất đối kháng, hỗn hợp phản ứng tổng hợp, ngăn tế bào, như màng, vỏ tế bào hoặc thành tế bào, hoặc chế phẩm của chúng, bao gồm polypeptit protein E và cơ chất hoặc phối tử đánh dấu của polypeptit này được sử dụng với sự có mặt hoặc vắng mặt của phân tử đang xét, phân tử này có thể là chất chủ vận hoặc chất đối kháng Protein E. Khả năng của phân tử đang xét chủ vận hoặc đối vận với polypeptit protein E được phản ánh với sự giảm gắn kết của phối tử đánh dấu hoặc giảm sản xuất sản phẩm từ cơ chất này. Phân tử gắn kết tự do, *tức là* không gây ra ảnh hưởng của polypeptit protein E là thích hợp nhất làm chất đối kháng tốt. Phân tử gắn kết tốt và, như trường hợp có thể xảy ra, làm tăng mức sản phẩm sản xuất từ cơ chất, làm tăng sự tải nạp tín hiệu, hoặc làm tăng hoạt tính kênh hóa học là các chất chủ vận. Sự phát hiện tốc độ hoặc mức độ, như trường hợp có thể xảy ra, sản xuất sản phẩm từ cơ chất, sự tải nạp tín hiệu, hoặc hoạt tính kênh hóa học có thể tăng bằng cách sử dụng hệ báo cáo. Hệ báo cáo có thể được sử dụng về mặt này bao gồm,

nhưng không chỉ giới hạn ở, thiết bị so màu, cơ chất được đánh dấu được chuyển hóa thành sản phẩm, gen báo cáo đáp ứng với sự thay đổi hoạt tính của polynucleotit hoặc polypeptit protein E, và thử nghiệm gắn kết đã biết trong tình trạng kỹ thuật.

Ví dụ khác về thử nghiệm đối với chất chủ vận protein E là thử nghiệm cạnh tranh mà gắn kết protein E và chất chủ vận tiềm năng với phân tử gắn kết protein E, phân tử gắn kết protein E tái tổ hợp, cơ chất hoặc phối tử tự nhiên, hoặc chất giả cơ chất hoặc phối tử, trong điều kiện thích hợp đối với thử nghiệm ức chế cạnh tranh. Protein E có thể được đánh dấu bằng, chẳng hạn hợp chất có hoạt tính phóng xạ hoặc hợp chất so màu, như vậy số phân tử protein E gắn kết với phân tử gắn kết hoặc được chuyển hóa thành sản phẩm có thể được xác định chính xác để đánh giá hiệu quả của chất đối kháng tiềm năng.

Chất đối kháng tiềm năng bao gồm, trong số các chất khác, các phân tử hữu cơ nhỏ, peptit, polypeptit và kháng thể gắn kết với polynucleotit và/hoặc polypeptit theo sáng chế và do đó ức chế hoặc làm mất hoạt tính hoặc biểu hiện của nó. Chất đối kháng tiềm năng cũng có thể là phân tử hữu cơ nhỏ, peptit, polypeptit như protein hoặc kháng thể liên quan chặt chẽ gắn kết ở cùng vị trí trên phân tử gắn kết, như phân tử gắn kết, mà không gây ra hoạt tính cảm ứng bởi Protein E, từ đó ngăn cản hoạt tính hoặc biểu hiện của polypeptit protein E và/hoặc polynucleotit bằng cách loại trừ polypeptit protein E và/hoặc polynucleotit ra khỏi gắn kết.

Chất đối kháng tiềm năng bao gồm phân tử nhỏ gắn kết với và giữ vị trí gắn kết của polypeptit từ đó ngăn cản gắn kết với phân tử gắn kết tế bào, như vậy hoạt tính sinh học bình thường được ngăn chặn. Ví dụ về phân tử nhỏ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phân tử hữu cơ nhỏ, peptit hoặc phân tử giống peptit. Các chất đối kháng tiềm năng khác bao gồm phân tử đối mã (xem Okano, *J. Neurochem.* 56: 560 (1991); *OLIGODEOXYNUCLEOTIDES AS ANTISENSE INHIBITORS OF GENE EXPRESSION*, CRC Press, Boca Raton, FL (1988), mô

tả các phân tử này). Chất đối kháng tiềm năng được ưu tiên bao gồm các hợp chất liên quan đến và các biến thể của protein E.

Theo một khía cạnh nữa, sáng chế đề cập đến protein dung hợp hòa tan được xử lý bằng kỹ thuật di truyền bao gồm polypeptit theo sáng chế, hoặc mảnh của nó, và các phần khác nhau của vùng cố định của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch thuộc các phân lớp khác nhau (IgG, IgM, IgA, IgE). Ưu tiên làm globulin miễn dịch là phân cố định của chuỗi nặng IgG người, đặc biệt là IgG1, tại đó xảy ra sự dung hợp ở vùng bản lề. Theo một phương án đặc biệt, phần Fc có thể được loại bỏ một cách đơn giản bằng việc kết hợp trình tự tách, trình tự này có thể tách khỏi yếu tố đông máu Xa. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến quy trình điều chế các protein dung hợp này bằng cách xử lý bằng kỹ thuật di truyền, và việc sử dụng chúng để sàng lọc thuốc, chẩn đoán và điều trị. Một khía cạnh khác của sáng chế cũng đề cập đến polynucleotit mã hóa các protein dung hợp này. Ví dụ về kỹ thuật protein dung hợp có thể tìm thấy trong công bố đơn sáng chế quốc tế các số WO94/29458 và WO94/22914.

Mỗi trình tự polynucleotit được đề xuất trong bản mô tả này có thể được sử dụng trong nghiên cứu và phát triển các hợp chất kháng khuẩn. Protein được mã hóa, về mặt biểu hiện, có thể được sử dụng làm đích để sàng lọc các thuốc kháng khuẩn. Ngoài ra, trình tự polynucleotit mã hóa vùng đầu amino của protein được mã hóa hoặc Shine-Delgarno hoặc trình tự tạo điều kiện dễ dàng cho việc dịch mã khác của mARN tương ứng có thể được sử dụng để xây dựng trình tự đối mã để kiểm soát sự biểu hiện của trình tự mã hóa đang xét.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng polypeptit, polynucleotit, chất chủ vận hoặc chất đối kháng theo sáng chế để cản trở tương tác vật lý ban đầu giữa mầm bệnh hoặc các mầm bệnh và sinh vật có nhân điển hình, tốt hơn là động vật có vú, vật chủ là nguyên nhân gây ra di chứng nhiễm trùng. Cụ thể, phân tử theo sáng chế có thể sử dụng trong: ngăn ngừa sự bám dính của vi khuẩn, cụ

thể là vi khuẩn gram dương và/hoặc gram âm, với sinh vật có nhân điển hình, tốt hơn là động vật có vú, protein cơ chất ngoại bào trên thiết bị được ghép vào trong cơ thể hoặc với protein cơ chất ngoại bào ở vết thương; ngăn cản sự bám dính của vi khuẩn giữa sinh vật có nhân điển hình, tốt hơn là động vật có vú, protein cơ chất ngoại bào và protein của Protein E của vi khuẩn gián tiếp phá hủy mô và/hoặc; ngăn cản sự phát triển bình thường sự phát sinh nhiễm trùng nguyên nhân ban đầu do cấy ghép thiết bị được ghép vào trong cơ thể hoặc do các kỹ thuật phẫu thuật khác.

Theo một khía cạnh khác nữa của sáng chế, sáng chế đề xuất chất chủ vận và chất đối kháng protein E, tốt hơn là chất chủ vận và chất đối kháng kim khuẩn hoặc diệt khuẩn.

Chất đối kháng và chất chủ vận theo sáng chế có thể được dùng để, chẳng hạn, ngăn cản, ức chế và/hoặc trị bệnh.

Theo một khía cạnh nữa, sáng chế đề cập đến mimotop của polypeptit theo sáng chế. Mimotop là trình tự peptit, đủ giống với peptit nguyên thể (về mặt trình tự hoặc cấu trúc), có khả năng được nhận biết bởi những kháng thể nhận biết được peptit nguyên thể; hoặc có khả năng làm tăng kháng thể nhận biết peptit nguyên thể khi phối cặp với chất mang thích hợp.

Mimotop peptit có thể được tạo ra nhằm mục đích đặc biệt bởi sự bổ sung, sự khuyết đoạn hoặc thay thế các axit amin được chọn. Do đó, các peptit có thể được biến đổi nhằm mục đích dễ dàng cho việc tiếp hợp với chất mang protein. Ví dụ, mong muốn có một số phương pháp tiếp hợp hóa học để bao gồm đầu xystein. Ngoài ra, có thể mong muốn các peptit được tiếp hợp với chất mang protein để bao gồm các đầu kỵ nước ở xa đầu được tiếp hợp của peptit, như vậy đầu tự do không được tiếp hợp của phần còn lại của peptit được liên kết với bề mặt protein chất mang. Nhờ đó việc trình diện peptit dưới dạng gần giống nhất so với dạng peptit được tìm thấy trong toàn bộ phân tử nguyên

thể. Ví dụ, các peptit có thể được biến đổi để có xystein đầu N và đuôi amit hóa kỵ nước đầu C. Mặt khác, sự bổ sung hoặc thay thế dạng đồng phân lập thể D của một hoặc nhiều axit amin (trình tự đảo (inverso sequence)) có thể được thực hiện để tạo ra chất dẫn xuất có lợi, ví dụ để tăng tính ổn định của peptit. Mimotop cũng có thể là trình tự ngược (retro sequence) của trình tự peptit nguyên thể, trong đó sự định hướng trình tự bị đảo ngược. Mimotop cũng có thể có bản chất là đảo-ngược. Peptit ngược, đảo và đảo-ngược đã được mô tả trong WO 95/24916 và WO 94/05311.

Mặt khác, mimotop peptit có thể được xác định bằng cách sử dụng kháng thể có khả năng tự gắn kết với các polypeptit theo sáng chế bằng cách sử dụng các kỹ thuật như kỹ thuật hiển thị thể thực khuẩn (EP 0 552 267 B1). Với kỹ thuật này, tạo ra một số lượng lớn các trình tự peptit có cấu trúc giống với cấu trúc peptit nguyên thể và do đó, có khả năng gắn kết với kháng thể kháng peptit nguyên thể, nhưng không cần chúng phải có độ tương đồng trình tự đáng kể với polypeptit nguyên thể.

Vaccin

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, sáng chế mô tả phương pháp gây đáp ứng miễn dịch cho cá thể, cụ thể là động vật có vú, tốt hơn là người, bao gồm bước tiêm chủng cho cá thể polynucleotit và/hoặc polypeptit protein E, hoặc mảnh hoặc biến thể của chúng, đủ để tạo ra kháng thể và/hoặc đáp ứng miễn dịch qua tế bào T để bảo vệ cá thể này khỏi bệnh nhiễm trùng, đặc biệt là nhiễm vi khuẩn và đặc biệt hơn là nhiễm *H. influenzae* không điển hình. Sáng chế cũng đề xuất các phương pháp mà nhờ đó đáp ứng miễn dịch này làm chậm sự sao chép của vi khuẩn. Một khía cạnh khác nữa của sáng chế đề cập đến phương pháp gây đáp ứng miễn dịch cho cá thể bao gồm bước phân phối vào cá thể này vector axit nucleic, trình tự hoặc ribozym để điều khiển biểu hiện của polynucleotit và/hoặc polypeptit protein E, hoặc mảnh hoặc biến thể của chúng, nhằm biểu hiện polynucleotit và/hoặc polypeptit protein E, hoặc mảnh

hoặc biến thể của chúng *in vivo* để gây đáp ứng miễn dịch, như, tạo kháng thể và/hoặc đáp ứng miễn dịch qua tế bào T, bao gồm, chẳng hạn, tế bào T sản xuất cytokin hoặc tế bào T độc, để bảo vệ cá thể này, tốt hơn là người, khỏi bị bệnh, cho dù bệnh này đã bị nhiễm vào cá thể hay chưa. Một ví dụ về việc dùng gen là bằng cách cấy nhanh gen này vào trong tế bào mong muốn làm màng bao tiểu phân hoặc cách khác. Vector axit nucleic này có thể bao gồm ADN, ARN, ribozym, axit nucleic cải biến, thể lai ADN/ARN, phức hợp ADN-protein hoặc phức hợp ARN-protein.

Một khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến chế phẩm miễn dịch mà khi được đưa vào cá thể, tốt hơn là người, có khả năng gây ra đáp ứng miễn dịch cho cá thể, gây ra đáp ứng miễn dịch trong cá thể này với polynucleotit và/hoặc polypeptit protein E mã hóa chúng, trong đó chế phẩm này bao gồm polynucleotit và/hoặc polypeptit protein E tái tổ hợp mã hóa chúng và/hoặc bao gồm ADN và/hoặc ARN mã hóa và biểu hiện kháng nguyên của polynucleotit protein E, polypeptit mã hóa chúng, hoặc polypeptit khác theo sáng chế. Đáp ứng miễn dịch có thể được sử dụng điều trị hoặc dự phòng và có thể là dạng miễn dịch dịch thể và/hoặc miễn dịch tế bào, như miễn dịch tế bào sinh ra từ các tế bào T CTL hoặc CD4+.

Polypeptit protein E hoặc mảnh của nó có thể được dung hợp với đồng protein hoặc gốc hóa học có thể hoặc không thể tự sản xuất kháng thể, nhưng có khả năng làm ổn định protein đầu tiên và tạo ra protein dung hợp hoặc cải biến có các đặc tính kháng nguyên và/hoặc miễn dịch, và tốt hơn là các đặc tính bảo vệ. Như vậy protein tái tổ hợp được dung hợp này, tốt hơn là còn bao gồm đồng protein có tính kháng nguyên, như lipoprotein hoặc protein D từ *Haemophilus influenzae* (EP 594610), Glutathion-S-transferaza (GST) hoặc beta-galactosidaza, hoặc đồng protein lớn có liên quan khác bất kỳ hòa tan protein và tạo điều kiện dễ dàng cho việc sản xuất và tinh chế chúng. Ngoài ra, đồng protein có thể có tác dụng làm tá chất có vai trò kích thích rộng hệ miễn

dịch của sinh vật nhận protein. Đồng protein có thể được gắn với đầu amino- hoặc carboxy- của protein thứ nhất.

Trong chế phẩm vacxin theo sáng chế, polypeptit và/hoặc polynucleotit protein E, hoặc mảnh, hoặc mimotop, hoặc biến thể của chúng có thể có mặt trong vector, như vector tái tổ hợp sống nêu trên, ví dụ, vector vi khuẩn sống.

Các vector không sống cũng thích hợp đối với polypeptit protein E, ví dụ, túi màng ngoài vi khuẩn hoặc “mụn nước” (bleb). Mụn nước màng ngoài có nguồn gốc từ màng ngoài của lớp màng kép của vi khuẩn gram âm và đã được dẫn chứng trong nhiều tài liệu về vi khuẩn gram âm (Zhou, L *et al.* 1998. *FEMS Microbiol. Lett.* 163:223-228) bao gồm *C. trachomatis* và *C. psittaci*. Danh sách tiêu biểu các vi khuẩn mầm bệnh đã được báo cáo tạo ra mụn nước bao gồm: *Bordetella pertussis*, *Borrelia burgdorferi*, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Legionella pneumophila*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa* và *Yersinia enterocolitica*.

Mụn nước có ưu điểm là cung cấp các protein màng ngoài ở cấu dạng tự nhiên của chúng và do đó đặc biệt hữu ích làm vacxin. Mụn nước cũng có thể được cải thiện để sử dụng làm vacxin bằng cách tạo ra vi khuẩn biến đổi sự biểu hiện của một hoặc nhiều phân tử ở màng ngoài. Như vậy, chẳng hạn, sự biểu hiện của protein miễn dịch mong muốn ở màng ngoài, như polypeptit protein E, có thể được đưa vào hoặc điều chỉnh lên (ví dụ, bằng cách biến đổi trình tự khởi đầu). Mặt khác hoặc ngoài ra, sự biểu hiện của các phân tử màng ngoài không có liên quan (chẳng hạn, kháng nguyên không bảo vệ hoặc protein trội miễn dịch nhưng biến đổi được) hoặc có thiệt hại (chẳng hạn, phân tử gây độc như LPS, hoặc các chất tiềm năng gây ra đáp ứng tự miễn) có thể được điều chỉnh xuống. Các nghiên cứu này được bàn luận chi tiết hơn dưới đây.

Vùng sườn không được mã hóa của gen protein E chứa các yếu tố điều hòa quan trọng trong sự biểu hiện gen. Sự điều hòa này xảy ra ở cả giai đoạn phiên mã và dịch mã. Trình tự của vùng này, theo chiều phía trước hoặc phía sau của khung đọc mở của gen, có thể thu được bằng cách giải trình tự ADN. Thông tin của trình tự này cho phép xác định motif điều hòa tiềm năng như các yếu tố trình tự khởi đầu khác nhau, trình tự kết thúc, yếu tố trình tự cảm ứng, trình tự kìm hãm, yếu tố đảm nhiệm việc biến đổi pha, trình tự shine-dalgarno, các vùng có cấu trúc bậc hai tiềm năng bao gồm trong quá trình điều hòa, cũng như các kiểu motif hoặc trình tự điều hòa khác. Trình tự này là một khía cạnh khác của sáng chế.

Thông tin trình tự này cho phép điều biến sự biểu hiện tự nhiên của gen protein E. Sự điều chỉnh lên của biểu hiện gen có thể được thực hiện bằng cách biến đổi trình tự khởi đầu, trình tự shine-dalgarno, trình tự kìm hãm tiềm tàng hoặc yếu tố điều khiển, hoặc yếu tố khác bất kỳ bao gồm trong đó. Cũng như vậy, sự điều chỉnh xuống của sự biểu hiện có thể thu được bằng kiểu điều biến tương tự. Mặt khác, bằng cách biến đổi trình tự biến đổi pha, sự biểu hiện gen có thể đặt dưới sự kiểm soát sự biến đổi pha, hoặc có thể được tách cặp khỏi sự điều hòa này. Theo cách tiếp cận khác, sự biểu hiện gen có thể đặt dưới sự kiểm soát của một hoặc nhiều yếu tố cảm ứng cho phép điều hòa biểu hiện. Ví dụ về sự điều hòa này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, sự cảm ứng bởi sự thay đổi nhiệt độ, sự bổ sung cơ chất cảm ứng như hydrat cacbon hoặc các dẫn xuất của nó được chọn, yếu tố vi lượng, vitamin, yếu tố bổ trợ, ion kim loại, v.v. được chọn.

Các cải biến này như được mô tả trên đây có thể được đưa vào bằng một số cách khác nhau. Sự cải biến trình tự bao gồm trong biểu hiện gen có thể được thực hiện *in vivo* bằng đột biến ngẫu nhiên sau đó chọn lọc kiểu hình mong muốn. Một tiếp cận khác bao gồm bước phân lập vùng quan tâm và biến đổi nó bằng đột biến ngẫu nhiên, hoặc sự thay thế trực tiếp vị trí, đột biến xen

đoạn hoặc khuyết đoạn. Sau đó vùng được cải biến có thể được đưa lại vào hệ gen vi khuẩn bằng tái tổ hợp tương đồng, và đánh giá hiệu quả biểu hiện gen. Theo một cách tiếp cận khác, sự hiểu biết về trình tự của vùng quan tâm có thể được sử dụng để thay thế hoặc loại bỏ tất cả hoặc một phần trình tự điều hòa tự nhiên. Trong trường hợp này, vùng điều hòa đích được phân lập và cải biến để chứa các yếu tố điều hòa từ một gen khác, sự tái tổ hợp của các yếu tố điều hòa từ các gen khác nhau, vùng điều hòa tổng hợp, hoặc vùng điều hòa khác bất kỳ, hoặc để loại bỏ các phần đã chọn của trình tự điều hòa kiểu dại. Tiếp đó các trình tự cải biến này có thể được đưa lại vào vi khuẩn qua sự tái tổ hợp tương đồng trong hệ gen. Danh sách tiêu biểu các trình tự khởi đầu ưu tiên có thể được sử dụng để điều chỉnh lên sự biểu hiện gen bao gồm các trình tự khởi đầu *porA*, *porB*, *lbpB*, *tbpB*, *p110*, *lst*, *hpuAB* từ *N. meningitidis* hoặc *N. gonorrhoeae*; *ompCD*, *copB*, *lbpB*, *ompE*, *UspA1*; *UspA2*; *TbpB* từ *M. Catarrhalis*; *p1*, *p2*, *p4*, *p5*, *p6*, *lpD*, *tbpB*, *D15*, *Hia*, *Hmw1*, *Hmw2* từ *H. influenzae*.

Theo một ví dụ, sự biểu hiện của gen có thể được điều biến bằng cách trao đổi trình tự khởi đầu của nó với trình tự khởi đầu mạnh hơn (qua việc phân lập trình tự phía trước của gen, sự cải biến *in vitro* của trình tự này, và tái đưa vào hệ gen bằng sự tái tổ hợp tương đồng). Sự biểu hiện điều chỉnh lên có thể thu được trong cả vi khuẩn cũng như trong túi màng ngoài được hình thành (hoặc tạo ra) từ vi khuẩn.

Theo các ví dụ khác, các cách tiếp cận được mô tả có thể được sử dụng để tạo ra các chủng vi khuẩn tái tổ hợp có các đặc điểm được cải thiện để ứng dụng làm vacxin. Các chủng này có thể là, nhưng không chỉ giới hạn ở, chủng được giảm độc, chủng có mức độ biểu hiện các kháng nguyên được chọn tăng, chủng có các gen cản trở đáp ứng miễn dịch bị bất hoạt (hoặc mức độ biểu hiện giảm), chủng có mức độ biểu hiện protein trội miễn dịch được điều biến, chủng có sự hình thành túi màng ngoài được điều biến.

Từ đó, sáng chế cũng đề cập đến vùng phía trước cải biến của gen protein E, trong đó vùng phía trước cải biến này chứa yếu tố điều hòa khác loài biến đổi mức biểu hiện của protein của protein E nằm ở màng ngoài. Vùng phía trước theo khía cạnh này của sáng chế bao gồm trình tự phía trước của gen protein E. Vùng phía trước khởi đầu ngay từ vị trí phía trước của gen protein E và thường tiếp tục đến vị trí không quá 1000 bp phía trước của gen từ codon khởi đầu ATG. Trong trường hợp gen nằm ở trình tự đa cistron (operon), vùng phía trước có thể khởi đầu ngay trước gen quan tâm, hoặc trước gen đầu tiên trong operon. Tốt hơn là, vùng phía trước cải biến theo khía cạnh này của sáng chế chứa trình tự khởi đầu khác loài ở vị trí nằm giữa 500 và 700 bp phía trước của ATG.

Việc sử dụng vùng phía trước đã được bộc lộ để điều chỉnh lên sự biểu hiện của gen protein E, quy trình để thu được nó qua sự tái tổ hợp tương đồng (ví dụ, như được mô tả trong WO 01/09350 được kết hợp vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn), vector chứa trình tự phía trước thích hợp cho mục đích này, và tế bào vật chủ được biến đổi như vậy cũng là khía cạnh khác của sáng chế.

Do vậy, sáng chế đề xuất polypeptit protein E, trong mụn nước vi khuẩn cải biến. Sáng chế còn đề xuất tế bào vật chủ cải biến có khả năng sản xuất vector mụn nước có màng không sống. Sáng chế còn đề xuất vector axit nucleic chứa gen protein E có vùng phía trước cải biến chứa yếu tố điều hòa khác loài.

Sáng chế còn đề xuất quy trình sản xuất tế bào vật chủ và mụn nước vi khuẩn theo sáng chế.

Sáng chế cũng đề xuất chế phẩm, đặc biệt là chế phẩm vacxin, và phương pháp bao gồm polypeptit và/hoặc polynucleotit theo sáng chế và trình tự ADN kích thích miễn dịch, như đã được mô tả trong Sato, Y. *et al.* Science 273: 352 (1996).

Sáng chế cũng mô tả phương pháp sử dụng polynucleotit đã mô tả hoặc mảnh cụ thể của nó, được cho thấy là mã hóa vùng không biến đổi của protein bề mặt tế bào vi khuẩn, trong cấu trúc polynucleotit được sử dụng trong các thích nghiệm miễn dịch di truyền này trong các mẫu động vật bị nhiễm *H. influenzae* không điển hình. Các thử nghiệm này đặc biệt có thể sử dụng để xác định epitop protein có thể gây ra đáp ứng miễn dịch dự phòng hoặc điều trị. Tin tưởng rằng nghiên cứu này sẽ cho phép sản xuất tiếp kháng thể đơn dòng có ý nghĩa cụ thể, có nguồn gốc từ cơ quan cần thiết của động vật đã được kháng hoặc loại thành công bệnh nhiễm trùng, phát triển các chất dự phòng hoặc phương pháp trị liệu nhiễm vi khuẩn, đặc biệt là bệnh nhiễm trùng *H. influenzae* không điển hình, ở động vật có vú, đặc biệt là người.

Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm vacxin chứa polypeptit và/hoặc polynucleotit tái tổ hợp miễn dịch theo sáng chế cùng với chất mang thích hợp, như chất mang được dụng. Do polypeptit và polynucleotit có thể bị phân hủy trong dạ dày, nên tốt hơn là mỗi chất được dùng qua đường ngoài ruột, bao gồm, ví dụ, đường dùng dưới da, trong cơ, trong tĩnh mạch, hoặc trong da. Các chế phẩm thích hợp để dùng qua đường ngoài ruột bao gồm dung dịch tiêm nước và không phải nước vô trùng có thể chứa các chất chống oxy hóa, chất đệm, các hợp chất kìm khuẩn và các chất hòa tan làm cho chế phẩm đẳng trương với dịch cơ thể, tốt hơn là với máu, của cá thể; và huyền phù nước và không phải nước vô trùng có thể bao gồm chất tạo huyền phù hoặc chất làm đặc. Các chế phẩm có thể đựng trong vật chứa ở dạng đơn liều hoặc đa liều, ví dụ, ống tiêm và lọ được hàn kín và có thể được bảo quản trong điều kiện đông khô chỉ cần bổ sung chất mang lỏng vô trùng ngay trước khi sử dụng.

Chế phẩm vacxin theo sáng chế cũng có thể bao gồm hệ tá chất để làm tăng khả năng sinh miễn dịch của chế phẩm. Tốt hơn là hệ tá chất ưu tiên làm tăng đáp ứng typ TH1.

Đáp ứng miễn dịch có thể được phân biệt chung thành hai loại khác biệt, là đáp ứng miễn dịch dịch thể hoặc qua trung gian tế bào (đặc trưng cơ bản bởi cơ chế bảo vệ kích thích lần lượt bởi kháng thể và tế bào). Các loại đáp ứng này còn được gọi là đáp ứng typ TH1 (đáp ứng qua trung gian tế bào), và đáp ứng miễn dịch typ TH2 (đáp ứng dịch thể).

Các đáp ứng miễn dịch typ TH1 khác biệt này có thể được đặc trưng bởi sự tạo kháng nguyên đặc hiệu, kiểu đơn hạn chế tế bào limphô T độc, và đáp ứng tế bào giết tự nhiên. Đáp ứng typ TH1 ở chuột thường được đặc trưng bởi sự tạo kháng thể của typ phụ IgG2a, trong khi đó ở người đáp ứng này tương ứng với kháng thể typ IgG1. Đáp ứng miễn dịch typ TH2 được đặc trưng bởi sự tạo ở mức độ lớn isotip globulin miễn dịch bao gồm IgG1, IgA, và IgM ở chuột.

Cần tính đến rằng động lực đằng sau sự phát triển của hai typ đáp ứng miễn dịch này là cytokin. Mức độ cao của cytokin typ TH1 hướng ưu tiên gây ra đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào đối với kháng nguyên nhất định, trong khi đó mức độ cao của cytokin typ TH2 hướng ưu tiên gây ra đáp ứng miễn dịch dịch thể đối với kháng nguyên.

Sự phân biệt giữa đáp ứng miễn dịch typ TH1 và TH2 là không hoàn toàn. Trên thực tế, một cá thể sẽ tạo ra đáp ứng miễn dịch được mô tả với TH1 là chủ yếu hoặc TH2 là chủ yếu. Tuy nhiên, để thuận tiện coi như là các họ cytokin trong thuật ngữ này đã được mô tả các dòng vô tính CD4 +ve T cell của loài gặm nhấm bởi Mosmann và Coffman (*Mosmann, T.R. và Coffman, R.L. (1989) TH1 và TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annual Review of Immunology, 7, trang 145-173*). Theo truyền thống, đáp ứng typ TH1 có liên quan đến việc sản xuất cytokin INF- γ và IL-2 bởi tế bào limphô T. Các cytokin khác thường liên quan trực tiếp tới việc gây ra đáp ứng miễn dịch typ TH1 không được sản xuất bởi tế

bào T, như IL-12. Ngược lại, đáp ứng typ TH2 có liên quan đến việc tiết IL-4, IL-5, IL-6 và IL-13.

Đã biết rằng một số tá chất vacxin là đặc biệt thích hợp tới việc kích thích đáp ứng cytokin typ TH1 hoặc TH2. Theo truyền thống, chất chỉ thị tốt nhất cho sự cân bằng TH1:TH2 của đáp ứng miễn dịch sau khi chủng ngừa hoặc bệnh nhiễm trùng bao gồm các phép đo lường trực tiếp sự sản xuất cytokin TH1 hoặc TH2 bởi tế bào limphô T *in vitro* sau khi kích thích lại bằng kháng nguyên, và/hoặc các phép đo lường tỷ lệ IgG1:IgG2a của đáp ứng kháng thể đặc hiệu với kháng nguyên.

Do đó, tá chất typ TH1 là chất kích thích ưu tiên tập hợp tế bào T phân lập để sản xuất ở mức cao cytokin typ TH1 khi được kích thích lại bằng kháng nguyên *in vitro*, và thúc đẩy sự phát triển của cả tế bào limphô T độc CD8+ và đáp ứng globulin miễn dịch đặc hiệu với kháng nguyên có liên quan đến isotyp typ TH1.

Các tá chất có khả năng kích thích ưu tiên đáp ứng tế bào TH1 đã được mô tả trong công bố đơn sáng chế quốc tế các số WO 94/00153 và WO 95/17209.

Lipit A monophosphoryl đã khử axyl tại vị trí O thứ 3, hay 3D-MPL là một tá chất như vậy. Nó đã được biết trong GB 2220211 (Ribi). Về mặt hóa học, nó là hỗn hợp của lipit A monophosphoryl đã khử axyl tại vị trí O thứ 3 với chuỗi được axyl hóa ở vị trí 4, 5 hoặc 6 và được sản xuất bởi Ribi Immunochem, Montana. Dạng được ưu tiên của lipit A monophosphoryl đã khử axyl tại vị trí O thứ 3 được bộc lộ trong patent châu Âu số 0689454 B1 (SmithKline Beecham Biologicals SA).

Tốt hơn là, tiểu phân 3D-MPL đủ nhỏ để lọc tiệt trùng được qua màng lọc 0,22micron (patent châu Âu số 0689454).

3D-MPL có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 10 μ g – 100 μ g, tốt hơn là 25-50 μ g mỗi liều, trong đó kháng nguyên thường có mặt với lượng nằm trong khoảng 2-50 μ g mỗi liều.

Tá chất được ưu tiên khác bao gồm QS21, một phần Hplc được tinh chế, không độc, có nguồn gốc từ vỏ cây *Quillaja Saponaria Molina*. Phần này tùy ý có thể được trộn với 3 De-O-acylated monophosphoryl lipid A (3D-MPL), tùy ý cùng với chất mang.

Phương pháp sản xuất QS21 đã được bộc lộ trong patent Mỹ số 5,057,540.

Chế phẩm tá chất không gây phản ứng chứa QS21 là đã biết (WO 96/33739). Chế phẩm này bao gồm QS21 và cholesterol được chỉ ra là tá chất kích thích TH1 hiệu quả khi được bào chế trong chế phẩm cùng với kháng nguyên.

Các tá chất khác là các chất kích thích ưu tiên của đáp ứng tế bào TH1 bao gồm oligonucleotit điều biến miễn dịch, ví dụ trình tự CpG không được metyl hóa như đã được bộc lộ trong WO 96/02555.

Hỗn hợp của các tá chất kích thích TH1 khác nhau, như các tá chất nêu trên, cũng được coi là một tá chất, chất kích thích ưu tiên đáp ứng tế bào TH1. Ví dụ, QS21 có thể được bào chế cùng với 3D-MPL. Tỷ lệ QS21 : 3D-MPL thường nằm trong khoảng từ 1:10 đến 10:1; tốt hơn là từ 1:5 đến 5:1 và thường là 1:1. Khoảng tỷ lệ 3D-MPL: QS21 ưu tiên cho hiệp đồng tối ưu là từ 2,5:1 đến 1:1.

Tốt hơn là chất mang cũng có trong chế phẩm vacxin theo sáng chế. Chất mang có thể là nhũ tương dầu trong nước, hoặc muối nhôm, như nhôm phosphat hoặc nhôm hydroxit.

Nhũ tương dầu trong nước ưu tiên bao gồm dầu có thể chuyển hóa được, như squalen, alpha tocopherol và Tween 80. Theo một khía cạnh đặc biệt ưu

tiên, kháng nguyên trong chế phẩm vacxin theo sáng chế được phối hợp với QS21 và 3D-MPL trong nhũ tương này. Ngoài ra, nhũ tương dầu trong nước có thể chứa Span 85 và/hoặc lexitin và/hoặc tricaprylin.

Thường khi dùng cho người, QS21 và 3D-MPL có mặt trong vacxin với lượng nằm trong khoảng $1\mu\text{g}$ – $200\mu\text{g}$, như 10 – $100\mu\text{g}$, tốt hơn là $10\mu\text{g}$ – $50\mu\text{g}$ mỗi liều. Thông thường nhũ tương dầu trong nước bao gồm từ 2 đến 10% squalen, từ 2 đến 10% alpha tocopherol và từ 0,3 đến 3% Tween 80. Tốt hơn là tỷ lệ squalen : alpha tocopherol tương đương hoặc nhỏ hơn 1 như vậy sẽ làm nhũ tương ổn định hơn. Span 85 cũng có thể có mặt với lượng 1%. Trong một số trường hợp, có thể có lợi nếu vacxin theo sáng chế còn chứa thêm chất làm ổn định.

Tốt hơn là nhũ tương dầu trong nước không độc chứa dầu không độc, như squalan hoặc squalen, chất nhũ hóa, như Tween 80, trong chất mang nước. Chất mang nước có thể là, ví dụ, dung dịch đệm phosphat.

Chế phẩm tá chất đặc biệt có hiệu lực gồm QS21, 3D-MPL và tocopherol trong nhũ tương dầu trong nước đã được mô tả trong WO 95/17210.

Khi sáng chế được mô tả có liên quan đến một số polypeptit và polynucleotit protein E, cần hiểu rằng điều này bao gồm cả các mảnh của polypeptit và polynucleotit có trong tự nhiên, và polypeptit và polynucleotit tương tự có sự bổ sung, khuyết đoạn hoặc thay thế về cơ bản không ảnh hưởng đến các đặc tính miễn dịch của polypeptit hoặc polynucleotit tái tổ hợp. Các mảnh/peptit ưu tiên được mô tả trong ví dụ 10.

Sáng chế còn đề xuất chế phẩm vacxin đa giá chứa chế phẩm vacxin theo sáng chế phối hợp với các kháng nguyên khác, cụ thể là các kháng nguyên có thể được sử dụng để điều trị bệnh viêm tai giữa. Chế phẩm vacxin đa giá này có thể chứa tá chất gây ra TH1 như được mô tả trên đây.

Theo một phương án ưu tiên, polypeptit, mảnh và chất kháng nguyên theo sáng chế được bào chế với một hoặc nhiều các nhóm kháng nguyên sau: a) một hoặc nhiều polysacarit vỏ phế cầu khuẩn (nguyên hoặc được tiếp hợp với protein chất mang); b) một hoặc nhiều kháng nguyên có thể bảo vệ vật chủ chống nhiễm *M. catarrhalis*; c) một hoặc nhiều kháng nguyên protein có thể bảo vệ vật chủ chống nhiễm *Streptococcus pneumoniae*; d) một hoặc nhiều kháng nguyên protein *Haemophilus influenzae* không điển hình nữa; e) một hoặc nhiều kháng nguyên có thể bảo vệ vật chủ chống RSV; và f) một hoặc nhiều kháng nguyên có thể bảo vệ vật chủ chống virus cúm. Ưu tiên phối hợp các nhóm a) và b); b) và c); b), d), và a) và/hoặc c); b), d), e), f), và a) và/hoặc c). Các vaccin này có thể có lợi khi được sử dụng làm vaccin viêm tai giữa toàn cầu.

Kháng nguyên polysacarit vỏ phế cầu khuẩn tốt hơn là được chọn từ các typ huyết thanh 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F và 33F (tốt hơn nữa là từ các typ huyết thanh 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F và 23F).

Kháng nguyên protein phế cầu khuẩn là các protein phế cầu khuẩn được bộc lộ trên bề mặt ngoài của phế cầu khuẩn (có khả năng được nhận biết bởi hệ miễn dịch của vật chủ trong ít nhất một phần vòng đời của phế cầu khuẩn), hoặc là các protein được tiết hoặc giải phóng bởi phế cầu khuẩn. Tốt hơn nữa là, protein là độc tố, chất bám dính, chất tải nạp tín hiệu hai thành phần, hoặc lipoprotein của *Streptococcus pneumoniae*, hoặc mảnh của nó. Protein được đặc biệt ưu tiên bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: pneumolysin (tốt hơn là được loại độc tố bằng cách xử lý hóa học hoặc gây đột biến) [Mitchell *et al.* Nucleic Acids Res. 1990 Jul 11; 18(13): 4010 "Comparison of pneumolysin genes and proteins from *Streptococcus pneumoniae* types 1 and 2.", Mitchell *et al.* Biochim Biophys Acta 1989 Jan 23; 1007(1): 67-72 "Expression of the pneumolysin gene in *Escherichia coli*: rapid purification and biological

properties.", WO 96/05859 (A. Cyanamid), WO 90/06951 (Paton và các đồng tác giả), WO 99/03884 (NAVA)]; PspA và các biến thể khuyết đoạn xuyên màng của nó (WO 92/14488; WO 99/53940; US 5804193 - Briles và các đồng tác giả); PspC và các biến thể khuyết đoạn xuyên màng của nó (WO 99/53940; WO 97/09994 - Briles và các đồng tác giả); PsaA và các biến thể khuyết đoạn xuyên màng của nó (Berry & Paton, Infect Immun 1996 Dec;64(12):5255-62 "Sequence heterogeneity of PsaA, a 37-kilodalton putative adhesin essential for virulence of *Streptococcus pneumoniae*"); cholin phé cầu khuẩn gắn kết protein và các biến thể khuyết đoạn xuyên màng của nó; CbpA và các biến thể khuyết đoạn xuyên màng của nó (WO 97/41151; WO 99/51266); Glyxeraldehyt-3-phosphat-dehydrogenaza (Infect. Immun. 1996 64:3544); HSP70 (WO 96/40928); PcpA (Sanchez-Beato et al. *FEMS Microbiol Lett* 1998, 164:207-14); M giống protein, đơn sáng chế SB số EP 0837130; và chất bám dính 18627 (Đơn sáng chế SB số EP 0834568). Kháng nguyên protein phé cầu khuẩn được ưu tiên khác đã được mô tả trong WO 98/18931, đặc biệt là các kháng nguyên được lựa chọn trong WO 98/18930 và PCT/US99/30390.

Kháng nguyên protein *Moraxella catarrhalis* ưu tiên có thể được bao gồm trong hỗn hợp vacxin (đặc biệt để ngăn ngừa bệnh viêm tai giữa) là: OMP106 [WO 97/41731 (Antex) & WO 96/34960 (PMC)]; OMP21; LbpA &/hoặc LbpB [WO 98/55606 (PMC)]; TbpA &/hoặc TbpB [WO 97/13785 & WO 97/32980 (PMC)]; CopB [Helminen ME, et al. (1993) Infect. Immun. 61:2003-2010]; UspA1 và/hoặc UspA2 [WO 93/03761 (University of Texas)]; OmpCD; HasR (PCT/EP99/03824); PilQ (PCT/EP99/03823); OMP85 (PCT/EP00/01468); lipo06 (GB 9917977.2); lipo10 (GB 9918208.1); lipo11 (GB 9918302.2); lipo18 (GB 9918038.2); P6 (PCT/EP99/03038); D15 (PCT/EP99/03822); Omp1A1 (PCT/EP99/06781); Hly3 (PCT/EP99/03257); và OmpE.

Kháng nguyên protein *Haemophilus influenzae* không điển hình khác được ưu tiên có thể được bao gồm trong hỗn hợp vaccin (đặc biệt để ngăn ngừa bệnh viêm tai giữa) bao gồm: Fimbrin protein [(US 5766608 - Ohio State Research Foundation)] và thể dung hợp chứa peptit từ đó [eg LB1(f) peptide fusions; US 5843464 (OSU) hoặc WO 99/64067]; OMP26 [WO 97/01638 (Cortecs)]; P6 [EP 281673 (State University of New York)]; protein D (EP 594610); TbpA và/hoặc TbpB; Hia; Hsf; Hin47; Hif; Hmw1; Hmw2; Hmw3; Hmw4; Hap; D15 (WO 94/12641); P2; P5 (WO 94/26304); NlpC2 (BASB205) [WO 02/30971]; Slp (BASB203) [WO 02/30960]; và iOMP1681 (BASB210) [WO 02/34772].

Kháng nguyên virus cúm ưu tiên bao gồm virus nguyên vẹn, sống hoặc bị bất hoạt, virus cúm phân chia, phát triển trong trứng hoặc tế bào MDCK, hoặc tế bào Vero hoặc toàn bộ thể virus cúm (như đã được mô tả bởi R. Gluck, Vaccine, 1992, 10, 915-920) hoặc các protein đã được tinh chế hoặc tái tổ hợp của chúng, như protein HA, NP, NA, hoặc M, hoặc hỗn hợp của chúng.

Kháng nguyên RSV (Respiratory Syncytial Virus – virus hợp bào hô hấp) được ưu tiên bao gồm glycoprotein F, glycoprotein G, protein HN, hoặc các dẫn xuất của chúng.

Chế phẩm, kit và sử dụng

Theo một khía cạnh nữa của sáng chế, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa polynucleotit protein E và/hoặc polypeptit protein E để dùng cho tế bào hoặc cho sinh vật đa bào.

Sáng chế còn đề cập đến các chế phẩm chứa polynucleotit và/hoặc polypeptit nêu trên hoặc các chất chủ vận hoặc chất đối kháng của chúng. Polypeptit và polynucleotit theo sáng chế có thể được dùng phối hợp với chất mang hoặc các chất mang không vô trùng hoặc vô trùng để sử dụng cho tế bào, mô hoặc sinh vật, như chất mang được dụng thích hợp để sử dụng cho cá thể.

Các chế phẩm này bao gồm, chẳng hạn, media additive hoặc lượng hữu hiệu điều trị polypeptit và/hoặc polynucleotit theo sáng chế và chất mang hoặc tá dược được dùng. Chất mang này có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, dung dịch nước muối, dung dịch nước muối đậm, dextroza, nước, glyxerol, etanol và hỗn hợp của chúng. Chế phẩm cần phải phù hợp với dạng dùng. Sáng chế còn đề cập đến gói và kit dược phẩm và chẩn đoán bao gồm một hoặc nhiều vật chứa được nạp một hoặc nhiều thành phần của chế phẩm theo sáng chế nêu trên.

Polypeptit, polynucleotit và các hợp chất khác theo sáng chế có thể được dùng riêng lẻ hoặc phối hợp với các hợp chất khác, như các hợp chất trị liệu.

Dược phẩm có thể được dùng theo cách thuận tiện, có hiệu quả bất kỳ bao gồm, chẳng hạn, dùng tại chỗ, qua đường miệng, hậu môn, âm đạo, trong tĩnh mạch, trong màng bụng, trong cơ, dưới da, trong mũi hoặc trong da ngoài các đường khác.

Trong trị liệu hoặc dự phòng, hoạt chất có thể được dùng cho cá thể dưới dạng chế phẩm có thể tiêm được, ví dụ, huyền phù nước vô trùng, tốt hơn là đẳng trương.

Theo một khía cạnh nữa, sáng chế đề xuất dược phẩm chứa lượng hữu hiệu điều trị của polypeptit và/hoặc polynucleotit, như dạng hòa tan của polypeptit và/hoặc polynucleotit theo sáng chế, peptit hoặc hợp chất phân tử nhỏ chủ vận hoặc đối kháng, phối hợp với chất mang hoặc tá dược được dùng. Các chất mang này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, dung dịch nước muối, dung dịch nước muối đậm, dextroza, nước, glyxerol, etanol, và hỗn hợp của chúng. Sáng chế còn đề cập đến gói và kit dược phẩm bao gồm một hoặc nhiều vật chứa được nạp một hoặc nhiều thành phần của chế phẩm theo sáng chế nêu trên. Polypeptit, polynucleotit và các hợp chất khác theo sáng chế có thể được dùng riêng lẻ hoặc phối hợp với các hợp chất khác, như hợp chất trị liệu.

Chế phẩm phải thích hợp với đường dùng, như đường toàn thân hoặc đường dùng qua miệng. Dạng ưu tiên của đường dùng toàn thân bao gồm dạng tiêm, thường là tiêm tĩnh mạch. Các đường tiêm khác, như dưới da, trong cơ, hoặc trong màng bụng, có thể được sử dụng. Các cách dùng toàn thân khác bao gồm đường dùng qua màng nhầy và qua da có sử dụng chất tăng thấm như muối mật hoặc axit fusidic hoặc các chất tẩy khác. Ngoài ra, nếu polypeptit hoặc các hợp chất khác theo sáng chế có thể được bào chế thành chế phẩm nang hoặc tan trong ruột, thì có thể dùng đường qua miệng. Việc dùng các hợp chất này cũng có thể dùng tại chỗ và/hoặc được khu trú, dưới dạng thuốc mỡ, bột nhào, gel, dung dịch, bột và các dạng tương tự.

Đối với việc dùng thuốc cho động vật có vú, và đặc biệt là người, mong muốn rằng mức liều hàng ngày của hoạt chất nằm trong khoảng từ 0,01 mg/kg đến 10 mg/kg, thường khoảng 1 mg/kg. Bác sỹ trong mỗi trường hợp sẽ xác định liều cụ thể thích hợp nhất đối với cá thể và sẽ thay đổi theo tuổi, thể trọng và đáp ứng của riêng mỗi cá thể. Các liều trên là tiêu biểu cho các trường hợp trung bình. Tất nhiên, có thể dùng liều cao hơn hoặc thấp hơn đối với những trường hợp cụ thể, và điều này là nằm trong phạm vi của sáng chế.

Khoảng liều cần thiết phụ thuộc vào sự lựa chọn peptit, đường dùng, bản chất của chế phẩm, bản chất tình trạng của đối tượng, và đánh giá của bác sỹ điều trị. Tuy nhiên, liều thích hợp nằm trong khoảng 0,1-100 $\mu\text{g/kg}$ thể trọng cá thể.

Chế phẩm vacxin thuận tiện là ở dạng có thể tiêm được. Các tá chất thông thường có thể được dùng để làm tăng đáp ứng miễn dịch. Đơn vị liều thích hợp để chủng ngừa là 0,5-5 microgram/kg kháng nguyên, và liều này tốt hơn là được dùng 1-3 lần và trong khoảng thời gian 1-3 tuần. Với khoảng liều đưa ra, không gây ra tác dụng độc bất lợi với các hợp chất theo sáng chế là yếu tố loại bỏ việc dùng này cho cá thể thích hợp.

Tuy nhiên, liều lượng cần thiết được biến đổi rộng theo nhiều hợp chất có sẵn và hiệu quả khác nhau của các đường dùng khác nhau. Ví dụ, dùng đường qua miệng đòi hỏi liều cao hơn so với dùng đường tiêm tĩnh mạch. Các biến đổi về mức liều này có thể được điều chỉnh bằng cách sử dụng các kinh nghiệm tối ưu hóa chuẩn, là đã biết trong lĩnh vực này.

Dữ liệu trình tự, trình tự ghi trên vật mang tin thực, và thuật toán

Trình tự polynucleotit và polypeptit là nguồn thông tin có giá trị để xác định cấu trúc không gian 2 chiều và 3 chiều của nó cũng như xác định các trình tự khác của thể tương đồng tương tự. Cách thức dễ áp dụng nhất là lưu trình tự trên vật mang tin đọc được bằng máy tính và sau đó sử dụng dữ liệu đã lưu này trong chương trình cấu trúc đại phân tử đã biết hoặc để tìm kiếm dữ liệu trình tự bằng cách sử dụng các công cụ tìm kiếm phổ biến, như gói chương trình GCG.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp phân tích trình tự hoặc chuỗi đặc trưng, đặc biệt là trình tự gen hoặc trình tự protein mã hóa. Phương pháp phân tích trình tự ưu tiên bao gồm, ví dụ, phương pháp phân tích độ tương đồng trình tự, như phân tích độ đồng nhất và tính tương tự, phân tích cấu trúc ADN, ARN và protein, sự giải trình tự, phân tích nhánh, phân tích motif trình tự, sự xác định khung đọc mở, gọi cặp bazơ của axit nucleic, phân tích việc sử dụng codon, cắt cặp bazơ của axit nucleic, và phân tích pic sắc ký giải trình tự.

Phương pháp dựa trên máy tính được đề xuất để xác định độ tương đồng. Phương pháp này bao gồm các bước: cung cấp trình tự polynucleotit thứ nhất bao gồm trình tự polynucleotit theo sáng chế trên vật mang tin đọc được bằng máy tính; và so sánh trình tự polynucleotit thứ nhất này với ít nhất một trình tự polynucleotit hoặc polypeptit thứ hai để xác định độ tương đồng.

Phương pháp dựa trên máy tính cũng được đề xuất để xác định độ tương đồng, phương pháp này bao gồm các bước: cung cấp trình tự polypeptit thứ nhất bao gồm trình tự của polypeptit theo sáng chế trên vật mang tin đọc được

bằng máy tính; và so sánh trình tự polypeptit thứ nhất này với ít nhất một trình tự polynucleotit hoặc polypeptit thứ hai để xác định độ tương đồng.

Tất cả các công bố đơn và tài liệu tham khảo, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở các bằng sáng chế và đơn sáng chế được trích dẫn trong phần mô tả này, được kết hợp toàn bộ vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn như thể mỗi công bố đơn hoặc tài liệu tham khảo cụ thể và riêng rẽ được kết hợp bằng cách viện dẫn vào bản mô tả này một cách đầy đủ như nêu trên. Mọi đơn sáng chế mà đơn này yêu cầu hưởng quyền ưu tiên cũng được kết hợp vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn toàn bộ theo cách nêu trên đối với các công bố đơn và tài liệu tham khảo.

Các định nghĩa

"Độ đồng nhất," như đã biết trong tình trạng kỹ thuật, là mối quan hệ giữa hai hoặc nhiều trình tự polypeptit hoặc hai hoặc nhiều trình tự polynucleotit, tùy trường hợp, được xác định bằng cách so sánh các trình tự này. Trong tình trạng kỹ thuật, "độ đồng nhất" còn có nghĩa là mức độ liên quan trình tự giữa các trình tự polypeptit hoặc polynucleotit, tùy trường hợp, được xác định bằng mức độ tương hợp giữa các chuỗi của các trình tự này. "Độ đồng nhất" có thể dễ dàng tính được bằng các phương pháp đã biết, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở các phương pháp đã mô tả trong (*Computational Molecular Biology*, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; *Computer Analysis of Sequence Data*, Part I, Griffin, A.M., và Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heine, G., Academic Press, 1987; và *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; và Carillo, H., and Lipman, D., *SIAM J. Applied Math.*, 48: 1073 (1988). Các phương pháp xác định độ đồng nhất được thiết kế để đưa ra mức độ tương hợp lớn nhất giữa các trình tự được đánh giá. Hơn nữa, các phương pháp để xác

định độ đồng nhất được mã hóa trong các chương trình máy tính được công bố rộng rãi. Phương pháp dùng chương trình máy tính để xác định độ đồng nhất giữa hai trình tự bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chương trình GAP trong gói chương trình GCG (Devereux, J., et al., *Nucleic Acids Research* 12(1): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN (Altschul, S.F. et al., *J. Molec. Biol.* 215: 403-410 (1990), và FASTA(Pearson và Lipman Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444-2448 (1988). Họ chương trình BLAST được phổ biến rộng từ NCBI và các nguồn khác (*BLAST Manual*, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, MD 20894; Altschul, S., et al., *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 (1990). Thuật toán Smith Waterman đã biết rộng rãi cũng có thể được sử dụng để xác định độ đồng nhất.

Các thông số để so sánh trình tự polypeptit bao gồm như sau:

Thuật toán: Needleman và Wunsch, *J. Mol Biol.* 48: 443-453 (1970)

Ma trận so sánh: BLOSSUM62 từ Henikoff và Henikoff,

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:10915-10919 (1992)

Điểm phạt khoảng trống (gap): 8

Điểm phạt chiều dài khoảng trống: 2

Chương trình hữu ích với các thông số này được phổ biến rộng như là chương trình "gap" từ Genetics Computer Group, Madison WI. Các thông số nêu trên là các thông số mặc định để so sánh peptit (cùng với việc không phạt điểm đối với các khoảng trống tận cùng).

Các thông số để so sánh polynucleotit bao gồm như sau:

Thuật toán: Needleman và Wunsch, *J. Mol Biol.* 48: 443-453 (1970)

Ma trận so sánh: tương hợp = +10, không tương hợp = 0

Điểm phạt khoảng trống (gap): 50

Điểm phạt chiều dài khoảng trống: 3

Sẵn có chương trình "gap" từ Genetics Computer Group, Madison WI. Đây là các thông số mặc định để so sánh axit nucleic.

Ý nghĩa được ưu tiên đối với "độ đồng nhất" của các polynucleotit và polypeptit, tùy trường hợp, được trình bày trong mục (1) và (2) dưới đây.

(1) Phương án polynucleotit còn bao gồm polynucleotit phân lập chứa trình tự polynucleotit có độ đồng nhất là ít nhất 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97 hoặc 100% so với trình tự so sánh SEQ ID NO: 11, trong đó trình tự polynucleotit này có thể giống với trình tự so sánh SEQ ID NO: 11 hoặc có thể bao gồm tới một số nguyên nhất định các biến đổi nucleotit so với trình tự so sánh, trong đó các biến đổi này được chọn từ nhóm bao gồm khuyết đoạn, thay thế ít nhất một nucleotit, kể cả đồng hoán và dị hoán, hoặc xen đoạn, và trong đó các biến đổi này có thể xảy ra ở vị trí đầu 5' hoặc 3' của trình tự nucleotit so sánh hoặc vị trí bất kỳ giữa các vị trí đầu đó, xảy ra rải rác trong các nucleotit trong trình tự so sánh hoặc trong một hoặc nhiều nhóm liên kề nằm trong trình tự so sánh, và trong đó số biến đổi nucleotit này được xác định bằng cách nhân tổng số nucleotit trong SEQ ID NO: 11 với số nguyên xác định phần trăm đồng nhất chia cho 100 và sau đó lấy tổng số nucleotit trong SEQ ID NO: 11 trừ đi tích này, hoặc:

$$n_n \leq x_n - (x_n \bullet y),$$

trong đó n_n là số biến đổi nucleotit, x_n là tổng số nucleotit trong SEQ ID NO: 11, y là 0,50 đối với 50%, 0,60 đối với 60%, 0,70 đối với 70%, 0,80 đối với 80%, 0,85 đối với 85%, 0,90 đối với 90%, 0,95 đối với 95%, 0,97 đối với 97% hoặc 1,00 đối với 100%, và $\bullet$ là ký hiệu của phép nhân, và trong đó giá trị bất kỳ không nguyên của x_n và y được làm tròn xuống đến số nguyên gần nhất trước khi trừ nó từ x_n . Việc biến đổi trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự nêu trong SEQ ID NO:1-10 có thể tạo ra sự không có nghĩa, nhằm

nghĩa hoặc đột biến xê dịch khung trong trình tự mã hóa này và từ đó thay đổi polypeptit mã hóa bằng polynucleotit sau việc biến đổi này.

Ví dụ, trình tự polynucleotit theo sáng chế có thể giống với trình tự so sánh SEQ ID NO: 11, có nghĩa là nó có thể giống 100%, hoặc có thể bao gồm tới một số nguyên nhất định các biến đổi axit nucleic so với trình tự so sánh sao cho tỷ lệ đồng nhất nhỏ hơn 100%. Các biến đổi này được chọn từ nhóm bao gồm khuyết đoạn, thay thế ít nhất một axit nucleic, bao gồm đồng hoán và dị hoán, hoặc xen đoạn, và trong đó các biến đổi này có thể xảy ra ở vị trí đầu 5' hoặc 3' của trình tự polynucleotit so sánh hoặc vị trí bất kỳ giữa các vị trí đầu đó, xảy ra rải rác trong các axit nucleic trong trình tự so sánh hoặc trong một hoặc nhiều nhóm liên kề nằm trong trình tự so sánh. Số biến đổi axit nucleic ở tỷ lệ phần trăm đồng nhất đã định được xác định bằng cách nhân tổng số axit nucleic trong SEQ ID NO: 11 với số nguyên xác định phần trăm đồng nhất chia cho 100 và sau đó lấy tổng số axit nucleic trong SEQ ID NO: 11 trừ đi tích này, hoặc:

$$n_n \leq x_n - (x_n \bullet y),$$

trong đó n_n là số biến đổi axit nucleic, x_n là tổng số axit nucleic trong SEQ ID NO: 11, y là, chẳng hạn 0,70 đối với 70%, 0,80 đối với 80%, 0,85 đối với 85% v.v., $\bullet$ là ký hiệu của phép nhân, và trong đó giá trị bất kỳ không nguyên của x_n và y được làm tròn xuống đến số nguyên gần nhất trước khi trừ nó từ x_n .

(2) Phương án polypeptit còn bao gồm polypeptit phân lập chứa polypeptit có độ đồng nhất là ít nhất 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97 hoặc 100% so với trình tự polypeptit so sánh SEQ ID NO:1-10, trong đó trình tự polypeptit này có thể giống với trình tự so sánh SEQ ID NO:1-10 hoặc có thể bao gồm tới một số nguyên nhất định các biến đổi axit amin so với trình tự so sánh, trong đó các biến đổi này được chọn từ nhóm bao gồm khuyết đoạn, thay thế ít nhất

một axit amin, bao gồm thay thế, hoặc xen đoạn bảo toàn và không bảo toàn, và trong đó các biến đổi này có thể xảy ra ở vị trí đầu amino hoặc carboxy của trình tự polypeptit so sánh hoặc vị trí bất kỳ giữa các vị trí đầu đó, xảy ra rải rác trong các axit amin trong trình tự so sánh hoặc trong một hoặc nhiều nhóm liên kề nằm trong trình tự so sánh, và trong đó số biến đổi axit amin này được xác định lần lượt bằng cách nhân tổng số axit amin trong SEQ ID NO:1-10 với số nguyên xác định phần trăm đồng nhất chia cho 100 và sau đó lấy tổng số axit amin trong SEQ ID NO:1-10 trừ đi tích này, hoặc:

$$n_a \leq x_a - (x_a \bullet y),$$

trong đó n_a là số các biến đổi axit amin, x_a là tổng số axit amin trong SEQ ID NO:1-10, y là 0,50 đối với 50%, 0,60 đối với 60%, 0,70 đối với 70%, 0,80 đối với 80%, 0,85 đối với 85%, 0,90 đối với 90%, 0,95 đối với 95%, 0,97 đối với 97% hoặc 1,00 đối với 100%, và $\bullet$ là ký hiệu của phép nhân, và trong đó giá trị bất kỳ không nguyên của x_a và y được làm tròn xuống đến số nguyên gần nhất trước khi trừ nó từ x_a .

Ví dụ, trình tự polypeptit theo sáng chế có thể giống với trình tự so sánh SEQ ID NO:1-10, có nghĩa là nó có thể giống 100%, hoặc có thể bao gồm tới một số nguyên nhất định các biến đổi axit amin so với trình tự so sánh sao cho tỷ lệ đồng nhất nhỏ hơn 100%. Các biến đổi này được chọn từ nhóm bao gồm khuyết đoạn, thay thế ít nhất một axit amin, bao gồm thay thế, hoặc xen đoạn bảo toàn và không bảo toàn, và trong đó các biến đổi này có thể xảy ra ở vị trí đầu amino hoặc carboxy của trình tự polypeptit so sánh hoặc vị trí bất kỳ giữa các vị trí đầu đó, xảy ra rải rác trong các axit amin trong trình tự so sánh hoặc trong một hoặc nhiều nhóm liên kề nằm trong trình tự so sánh. Số biến đổi axit amin ở tỷ lệ % đồng nhất đã định được xác định bằng cách nhân tổng số axit amin trong SEQ ID NO:1-10 với số nguyên xác định phần trăm đồng nhất chia

cho 100 và sau đó lấy tổng số axit amin trong SEQ ID NO:1-10 trừ đi tích này, hoặc:

$$n_a \leq x_a - (x_a \bullet y),$$

trong đó n_a là số biến đổi axit amin, x_a là tổng số axit amin trong SEQ ID NO:1-10, y là, chẳng hạn 0,70 đối với 70%, 0,80 đối với 80%, 0,85 đối với 85% v.v., và $\bullet$ là ký hiệu của phép nhân, và trong đó giá trị không nguyên bất kỳ của x_a và y được làm tròn xuống đến số nguyên gần nhất trước khi trừ nó từ x_a .

"Cá thể", khi được sử dụng liên quan tới sinh vật trong bản mô tả này có nghĩa là sinh vật đa bào có nhân điển hình, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở động vật đa bào, động vật có vú, chim, bò, khỉ, động vật linh trưởng, và người.

"Được phân lập" có nghĩa là được biến đổi "bằng tay của con người" từ trạng thái tự nhiên của nó, *chẳng hạn*, nếu nó có trong tự nhiên thì nó đã được thay đổi hoặc được lấy ra khỏi môi trường ban đầu của nó, hoặc cả hai. Ví dụ, polynucleotit hoặc polypeptit có trong tự nhiên trong sinh vật sống không "được phân lập", nhưng polynucleotit hoặc polypeptit giống như vậy được tách từ các nguyên liệu cùng tồn tại của trạng thái tự nhiên của nó "được phân lập", như thuật ngữ được dùng trong bản mô tả này. Ngoài ra, polynucleotit hoặc polypeptit được đưa vào trong sinh vật bằng biến nạp, thao tác di truyền hoặc bằng phương pháp tái tổ hợp bất kỳ khác được coi là "được phân lập" ngay cả khi nó vẫn có mặt trong sinh vật này, sinh vật này có thể là sống hoặc không sống.

"Polynucleotit" thường được dùng để chỉ polyribonucleotit hoặc polydeoxyribonucleotit bất kỳ, chúng có thể là ARN hoặc ADN không được cải biến hoặc ARN hoặc ADN được cải biến bao gồm vùng sợi đơn và kép.

“Biến thể” được dùng để chỉ polynucleotit hoặc polypeptit khác so với polynucleotit hoặc polypeptit so sánh, nhưng vẫn duy trì được các đặc tính cần thiết. Biến thể điển hình của polynucleotit khác về trình tự nucleotit so với polynucleoti khác, polynucleotit so sánh. Sự thay đổi về trình tự nucleotit của biến thể có thể hoặc không thể biến đổi trình tự axit amin của polypeptit mã hóa bởi polynucleotit so sánh. Sự thay đổi nucleotit có thể dẫn đến sự thay thế, bổ sung, khuyết đoạn, dung hợp và cắt ngắn axit amin trong polypeptit mã hóa bởi trình tự so sánh, như nêu dưới đây. Biến thể điển hình của polypeptit khác về trình tự axit amin so với polypeptit khác, polypeptit so sánh. Nói chung, sự khác nhau là hạn chế vì vậy trình tự của polypeptit so sánh và biến thể là gần tương tự toàn bộ và, trong nhiều vùng, là giống nhau. Biến thể và polypeptit so sánh có thể khác về trình tự axit amin bởi một hoặc nhiều sự thay thế, bổ sung, khuyết đoạn trong sự phối hợp bất kỳ. Gốc axit amin được thay thế hoặc xen vào có thể không hoặc là gốc được mã hóa bởi mã di truyền. Biến thể của polynucleotit hoặc polypeptit có thể có trong tự nhiên như biến thể alen, hoặc nó có thể là biến thể không được biết là có trong tự nhiên. Biến thể không có trong tự nhiên của polynucleotit và polypeptit có thể được tạo ra bằng kỹ thuật phát sinh đột biến hoặc bằng tổng hợp trực tiếp.

"Bệnh" có nghĩa là bệnh bất kỳ gây ra bởi hoặc có liên quan đến tình trạng nhiễm trùng vi khuẩn, bao gồm, ví dụ, bệnh viêm tai giữa ở trẻ sơ sinh và trẻ em, viêm phổi ở người cao tuổi, bệnh viêm xoang, bệnh nhiễm trùng bệnh viện và các bệnh xâm lấn, bệnh viêm tai giữa mạn tính có mất khả năng nghe, sự tích tụ dịch trong tai giữa, sự phá hủy thần kinh thính giác, chậm nói, bệnh nhiễm trùng đường hô hấp trên và bệnh viêm tai giữa.

Phần thử nghiệm

Các ví dụ dưới đây được thực hiện bằng cách sử dụng các kỹ thuật chuẩn, đã biết và là thông thường đối với người có hiểu biết trung bình trong

lĩnh vực này, trừ khi có chỉ dẫn chi tiết. Các ví dụ này là minh họa, nhưng không hạn chế phạm vi của sáng chế

Sự nghiên cứu này mô tả việc phân lập, tinh chế, mô tả đặc điểm, tách dòng và biểu hiện của protein màng ngoài mới có tên là protein E (pE) của *H. influenzae* và pE(A) tái tổ hợp được cắt ngắn mới, được nghiên cứu bằng cách sử dụng IgD(λ) huyết thanh u tủy của người.

Nguyên liệu và phương pháp

Các chất phản ứng

Các chủng *H. influenzae* typ b MinnA và NTHi3655 thu được dễ dàng từ Robert S. Munson Jr. (Washington University School of Medicine (St. Louis, Mo). Chủng *H. influenzae* không điển hình NTHi772 là thể phân lập lâm sàng từ môi trường dịch mũi hầu-họng. Một chuỗi các loài *Haemophilus* khác nhau cũng được phân tích và được mô tả trong Bảng 1. toàn bộ IgD(λ) huyết thanh u tủy IgD người được mua từ The Binding Site (Birmingham, England). Để sản xuất kháng huyết thanh kháng pE đặc hiệu, thỏ được chủng ngừa tiêm bắp 200 μ g pE22-160 tái tổ hợp [pE(A)] được nhũ hóa trong tá chất Freund's hoàn chỉnh (Difco, Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) hoặc peptit pE41-68 được tiếp hợp với keyhole limpet hemocyanin (KLH) và tăng cường vào các ngày 18 và 36 với cùng liều protein trong tá chất Freund's không hoàn chỉnh. Lấy máu vào 2 đến 3 tuần sau đó. Kháng thể đa dòng thu được được phân lập bằng sắc ký ái lực có sử dụng pE(A) hoặc peptit pE đặc hiệu (pE41-68) được tiếp hợp với CnBr-Sepharose (11). IgD dê kháng người được tiếp hợp với horseradish peroxidaza (horseradish peroxidaza - HRP) được mua từ Biosource (Camarillo, CA). pAb IgD thỏ kháng người được mua từ Dakopatts (Gentofte, Denmark).

IgD chuột kháng người được tiếp hợp với fluorescein isothiocyanat (FITC), chuỗi nhẹ thỏ kháng người (κ và λ) được tiếp hợp với HRP, và

globulin miễn dịch đa dòng lợn kháng thể được tiếp hợp với FITC được mua từ Dakopatts.

Chiết và tinh chế protein E

H. influenzae typ b (Minna) được phát triển qua đêm trong môi trường canh dịch truyền não tim (brain heart infusion - BHI) (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) có bổ sung NAD và hemin (Sigma, St. Louis, MO), mỗi loại 10µg/ml. Sau hai lần rửa vi khuẩn được chiết trong dung dịch đệm Tris-HCl 0,05 M (pH=8,8) chứa 0,5% Empigen® (Calbiochem Novabiochem, Bedford, MA). Huyền phù vi khuẩn được trộn bằng cách khuấy từ trong 2 giờ ở 37°C. Sau khi ly tâm ở 8000 x g trong 20 phút ở 4°C, dịch nổi được lọc bằng máy lọc vô trùng (0,45 µm; Sterivex-HV, Millipore). Chiết phẩm *H. influenzae* trong 0,5% Empigen® được cho vào cột Q-sepharose (Amersham Pharmacia Biotech) được cân bằng bằng dung dịch Tris-HCl 0,05 M (pH=8,8) chứa dung dịch ure 6 M. Cột này được tách rửa bằng cách sử dụng gradient tuyến tính của dung dịch NaCl nồng độ từ 0 đến 1 M trong cùng dung dịch đệm. Các phân đoạn được phát hiện bởi IgD(λ) huyết thanh u tủy được gộp lại, thẩm tách trong ống màng Spectraphor (ngưỡng khối lượng phân tử 6-8.000; Spectrum, Laguna hills, CA) kháng lại dung dịch Tris-HCl 0,05 M, pH=8,8, và được cô đặc trên màng đĩa YM100 (ngưỡng khối lượng phân tử 10.000; Amicon, Beverly, MA).

SDS-PAGE và phát hiện protein trên màng (thẩm tách Western)

SDS-PAGE được chạy ở điện áp không đổi 150 có sử dụng gel Bis-Tris 10% đang chạy (MES), mẫu (LDS), và dung dịch đệm chuyển cũng như dụng cụ thẩm từ Novex (San Diego, CA). Các mẫu được làm nóng đều đến 100°C trong 10 phút. Gel được nhuộm màu bằng Coomassie Brilliant Blue R-250 (13; Bio-Rad, Sundbyberg, Sweden). Sự chuyển điện di của dải protein từ gel đến màng immobilon-P (Millipore, Bedford, MA) được thực hiện ở 30 V trong thời

gian từ 2 đến 3 giờ. Sau khi chuyển, màng immobilon-P được cố định trong PBS bằng 0,05% Tween 20 (PBS-Tween) chứa 5% bột sữa. Sau vài lần rửa trong PBS-Tween, màng này được ủ bằng protein u tủy IgD tinh khiết (0,5 $\mu\text{g/ml}$, IgD(λ) u tủy của người; The Bindingsite) trong PBS-Tween bao gồm 2% bột sữa trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Bổ sung IgD dê kháng người được tiếp hợp với HRP đã được pha loãng 1/1000 sau vài lần rửa trong PBS-Tween. Sau khi ủ trong 40 phút ở nhiệt độ phòng và rửa thêm vài lần nữa trong PBS-Tween, việc nghiên cứu được thực hiện tiếp bằng các thuốc thử phát hiện trong phương pháp thấm tách Western ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden).

Sự điện di trên gel SDS-polyacrylamit hai chiều (2-D PAGE) và thấm tách Western

Sau khi sắc ký trao đổi ion, chiết phẩm Empigen® của *H. influenzae* (Minna) được đem tập trung đẳng điện (isoelectric focusing - IEF) bằng cách sử dụng IPGphor IEF System (Amersham Pharmacia Biotech) (5,12). Để chuẩn độ gel, một mẫu chuẩn được sử dụng (cat. no. 161-0320; Bio-Rad). Gel 2-D polyacrylamit được thấm điện vào màng lọc Immobilon-PVDF (0,45 mm; Millipore, Bedford, US) ở 120 mA qua đêm. Sau khi bão hòa, ủ, các bước cố định và rửa được tiến hành như được mô tả trên đây.

Phân tích trình tự axit amin

Phân tích trình tự axit amin tự động được thực hiện bằng máy phân tích trình tự pha rắn lỏng-khí 470A của Applied Biosystems (Foster City, CA).

Cấu trúc của thư viện gen *H. influenzae*

ADN nhiễm sắc thể được lấy từ chủng 772 bằng cách cải biến theo phương pháp của Berns và Thomas (2,13). Nói ngắn gọn, thư viện gen *H. influenzae* 772 được cấu tạo từ 40 μg ADN được tiêu hóa từng phần bằng *Sau3A* trong 1 giờ. ADN phân chia được tách phân đoạn trên gradient sucroza

(14). Các phân đoạn chứa mảnh ADN có kích thước thích hợp (2 đến 7 kbp) được gộp lại, và ADN được gắn với pUC18 tiêu hóa bởi *Bam*HI, tiếp đó là biến nạp vào *Escherichia coli* JM83 bằng xung điện có sử dụng bộ tạo xung Gene (Bio-Rad, Richmond CA). Vi khuẩn được đặt trên thạch agar LB có bổ sung ampicillin và X-Gal (5-bromo-4-clo-3-indolyl- β -D-galactopyranosit).

Thử nghiệm miễn dịch khuẩn lạc, phân lập và giải trình tự ADN

Thể biến nạp *E. coli*, được nuôi cấy qua đêm trên thạch agar LB, được chuyển sang màng lọc nitroxylenuloza (Sartorius, Göttingen, Germany) bằng cách đặt màng lọc khô trên bề mặt thạch agar. Đĩa được để trong 15 phút, và các tế bào bị ly giải bằng cách đưa vào hơi clorofom bão hòa trong 20 phút. Các vị trí gắn kết protein dư trên màng lọc được cố định bằng cách ủ màng lọc trong dung dịch nước muối được cân bằng bằng Tris chứa albumin trứng (Tris-hydroclorua 50 mM, NaCl 154 mM, albumin trứng 1,5% [pH=7,4]) trong 30 phút. Sau khi được cố định, màng lọc được ủ bằng IgD(λ) người trong 30 phút. Bổ sung kháng thể đa dòng IgD kháng người được tiếp hợp với HRP sau khi rửa và ủ màng lọc trong 30 phút. Tất cả các bước ủ được thực hiện ở nhiệt độ phòng. Cuối cùng, màng lọc được hiện hình bằng cách sử dụng 4-clo-1-naphthol và H₂O₂. Dòng vô tính dương tính được lựa chọn và AND plasmit pUC18 chứa ADN hệ gen NTHi772 được tinh chế. Đoạn xen ADN NTHi772 thu được được giải trình tự bằng cách sử dụng đoạn mồi nằm cạnh sườn M13+ và M13- và kit giải trình tự phản ứng BigDye Terminator Cycle Sequencing v. 2.0 Ready (Perkin-Elmer, Foster City, Ca). Trình tự đoạn xen thu được (3,55 kbp) tương ứng với đoạn chứa ADN mã hóa protein HI0175, HI0176, HI0177, và cuối cùng là HI0178 (15).

Tách dòng ADN và biểu hiện protein

Tất cả các cấu trúc tạo được bằng cách sử dụng mảnh được khuếch đại PCR. pUC18 chứa ADN hệ gen NTHi 772 (từ HI0175 đến HI0178) được sử

dụng làm mẫu. Taq ADN polymeraza từ Roche (Mannheim, Germany) và điều kiện PCR như khuyến cáo của nhà sản xuất. Khung đọc mở của bốn protein dự đoán trước từ HI0175 đến HI0178 được tách dòng, nhưng chỉ quy trình mô tả việc tách dòng của HID (HI0178) được bao gồm trong này. pE²²⁻¹⁶⁰ [pE(A) được chỉ định] không có peptit tín hiệu nội sinh chứa gốc axit amin glutamin²¹ và được khuếch đại bằng PCR có sử dụng các đoạn môi 5'-ctcaggatccaaaggctgaacaaaatgatgtg-3' và 5'-gggtgcagattaagcttttttatcaactg-3' đưa vào các vị trí enzym giới hạn *Bam*HI và *Hind*III. Để dung hợp 6 gốc histidin mã hóa bởi vector biểu hiện, codon kết thúc pE²²⁻¹⁶⁰ được gây đột biến. Khung đọc mở 417 bp thu được của gen *pe* được gắn vào pET26(+) (Novagen, Darmstadt, Germany). Để tránh độc tính có thể có, plasmit thu được đầu tiên được biến nạp vào trong vật chủ *E. coli* DH5 α . Sau đó, plasmit mã hóa pE và pE(A) được biến nạp vào vật chủ biểu hiện BL21(DE3). Ngoài pE và pE(A) có chiều dài đầy đủ, một loạt các biến thể pE được cắt ngắn được sản xuất. Nét chính được thể hiện ở Fig. 8. Các đoạn môi chứa *Bam*HI và *Hind*III được sử dụng đối với tất cả các cấu trúc. Các bước đối với các biến thể được cắt ngắn được mô tả như trên. Tất cả các cấu trúc được giải trình tự bằng cách sử dụng kit giải trình tự phản ứng BigDye Terminator Cycle Sequencing v. 2.0 Ready (Perkin-Elmer, Foster City, Ca).

Để tạo ra protein tái tổ hợp, vi khuẩn được phát triển đến pha mid-log (OD₆₀₀ từ 0,6 đến 0,8) tiếp đó gây cảm ứng bằng 1 mM isopropyl-1-thio- β -D-galactoside (IPTG) dẫn đến sự biểu hiện quá mức của pE(A). Khi OD₆₀₀ đạt đến 1,5 đến 1,7, thu lấy vi khuẩn và thể vùi được phân lập theo quy trình chuẩn. Protein tái tổ hợp còn có thể được tinh chế bằng sắc ký ái lực có sử dụng cột niken. Protein tái tổ hợp đã tinh chế sau đó được phân tích bằng SDS-PAGE.

Tinh chế AND của *H. influenzae*, điều kiện PCR và giải trình tự

ADN hệ gen từ *H. influenzae* thể phân lập lâm sàng được phân lập bằng cách sử dụng kit DNeasy Tissue (Qiagen, Hilden, Germany). Taq ADN polymeraza từ Roche (Mannheim, Germany) và điều kiện PCR như khuyến cáo của nhà sản xuất. Để phân lập gen *pe*, cặp đoạn mồi 5'-gcatttattaggtcagtttattg-3' và 5'-gaaggattatttctgatgcag-3', gắn với gen nằm cạnh sườn HI0177 tương ứng HI0179, được sử dụng. Sản phẩm PCR thu được (948 bp) được giải trình tự bằng gen-walking có sử dụng các đoạn mồi nêu trên ngoài đoạn mồi 5'-cttggttacttaccgcttg-3' và 5'-gtgttaaacttaacgtatg-3'. Điện di mao quản được chạy trên Beckman CEQ 2000 có sử dụng dye-terminator cycle sequencing kit (CEQ DTCS kit, Beckman Coulter, Stockholm, Sweden). Việc hiệu chỉnh và sắp hàng trình tự ADN thu được được thực hiện bằng cách sử dụng PHRED (CodonCode, Deadham, USA) và SEQUENCHER (MedProbe, Oslo, Norway).

Sản xuất *H. influenzae* không có pE (NTHi 3655 Δpe)

ADN hệ gen được phân lập từ NTHi 772 được sử dụng làm mẫu. Các đầu 5'- và 3'- của *pe* bao gồm các phần của các gen HI0177 và HI0179 được khuếch đại làm hai băng (lần lượt là 815 bp và 836 bp) có sử dụng DyNAzyme™ II ADN polymeraza (Finnzymes, Espoo, Finland) đưa vào vị trí enzym giới hạn *Xho*I và *Eco*RI tương ứng với *Eco*RI và *Spe*I ngoài trình tự đặc hiệu trong hai băng (18). Mảnh PCR thu được được tiêu hóa và tách dòng trong pBluescript SK (+/-). Băng gen kháng kanamycin (1282 bp) thu được từ pUC4K bằng cách sử dụng vị trí enzym giới hạn đối với *Eco*RI. Sau khi tiêu hóa, sản phẩm PCR được gắn vào mảnh gen *pe* được cắt ngắn chứa các phần của các gen HI0177 và HI0179. Chủng *H. influenzae* Egan và RM804 được biến nạp theo phương pháp M-IV của Heriott et al. (19). Đột biến thu được được kiểm tra bằng PCR và phân tích sự biểu hiện pE bằng phương pháp thẩm tách Western và miễn dịch dòng tế bào.

Các phần mềm sinh học phân tử

Trình tự thu được được so sánh với hệ gen KW20 *H. influenzae* có sẵn (<http://www.tigr.org>) (15). Peptit tín hiệu được suy ra bằng cách sử dụng SignalP V1.1 World Wide Web Prediction Server Center để phân tích trình tự sinh học (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (16). Profin kỵ nước pE được phân tích bằng phương pháp của Kyte và Doolittle (17).

Động vật, quy trình phẫu thuật và mẫu bệnh viêm tai giữa của chuột

Sử dụng chuột đực Sprague-Dawley khỏe mạnh, thể trọng từ 200-250 g. Tất cả động vật không bị bệnh nhiễm trùng tai giữa như xác định bằng cách soi kính hiển vi tai trước khi tiến hành. Ở giai đoạn can thiệp, chuột được gây tê bằng metohexital (Brietald, Elli Lilly và Company, Indianapolis, IN) tiêm tĩnh mạch hoặc cloral hydrat (apoteksbolaget, Lund, Sweden) tiêm màng bụng. Vi khuẩn để thử nghiệm với động vật được phát triển như được mô tả trên đây. Sau khi thu bằng ly tâm, vi khuẩn được tạo huyền phù lại trong môi trường nuôi cấy mới đến nồng độ 2×10^{10} đơn vị tạo khuẩn lạc (cfu) đối với cả NTHi 3655 và thể đột biến pE tương ứng. Sản phẩm được giữ lạnh cho đến khi sử dụng. Để gây bệnh viêm tai giữa cấp tính (acute otitis media - AOM), tai giữa được tiếp cận bằng vết rạch giữa bụng vào trong cổ, và khoảng 0,05 ml huyền phù vi khuẩn được nhỏ vào trong hốc tai giữa. Soi kính hiển vi tai được tiến hành vào ngày 3 và 5 sau phẫu thuật. Bệnh viêm tai giữa có chảy mủ, ví dụ, chảy dịch đục và thường giãn mạch rõ vào ngày 3, là chỉ AOM.

Kết quả

Chiết và tách protein (pE) của *H. influenzae* mà được phát hiện bằng IgD(λ) huyết thanh u tủy

Trước kia người ta đã nghĩ rằng *H. influenzae* không điển hình (NTHi) không gắn kết với IgD (19), trong khi đó *H. influenzae* có vỏ gắn kết mạnh với IgD. Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng IgD(λ) huyết thanh u tủy cũng

gắn kết đặc hiệu với NTHi. Profin miễn dịch dòng tế bào điển hình của NTHi772 được chỉ ra trên Fig. 1. Sự thay đổi mạnh và huỳnh quang tăng được phát hiện với sự có mặt của protein u tủy IgD(λ) khi so sánh với mẫu đối chứng không có IgD.

Để phân tích chi tiết protein màng ngoài *H. influenzae* được phát hiện bởi IgD(λ) u tủy, một phần màng ngoài được hòa tan trong chất tẩy Empigen[®]. Fig. 1B minh họa hoạt tính gắn kết với IgD rất mạnh thu được bằng phương pháp thấm tách Western đối với protein có khối lượng phân tử biểu kiến xấp xỉ 16 kDa. Tuy nhiên, không phát hiện được dải protein rõ rệt tương ứng với hoạt tính gắn kết với IgD trên SDS-PAGE được nhuộm màu Coomassie Brilliant blue. Sau khi tách trên cột Q-Sepharose, chiết phẩm màng ngoài thu được được đem điện di trên gel 2 chiều và nhuộm màu bạc (Fig. 1C). Song song, tiến hành thấm tách Western được dò bằng IgD(λ) người. Do đó, vùng trong đó pE được định vị có thể được bao quanh. Tuy nhiên, không thu được protein hiện màu (Fig. 1C).

Tách dòng protein E và sản xuất thể đột biến không có pE của *H. influenzae* không điển hình

Do không thể phát hiện được protein bất kỳ trong phân tích 2-D sau khi tách, thư viện ADN *H. influenzae* được xây dựng bằng cách sử dụng *H. influenzae* không điển hình (NTHi) chủng 772. ADN hệ gen chứa các mảnh nằm trong khoảng từ 2 đến 7 kbp được gắn vào pUC18 sau đó biến nạp vào *E. coli* JM83. Thể biến nạp được phân tích gắn kết với IgD bằng cách sử dụng thử nghiệm miễn dịch khuẩn lạc chứa IgD(λ) người và kháng thể đa dòng IgD kháng người được tiếp hợp với HRP. Ba khuẩn lạc dương tính được tìm thấy trong 20.000 khuẩn lạc thử nghiệm và được đem sàng lọc vòng hai bằng IgD(λ). Các tác giả giải trình tự một trong các dòng vô tính dương tính và thấy có đoạn xen 3,55 kb chứa ADN mã hóa cho bốn protein từ HI0175 đến HI0178

theo sơ đồ vật lý của *H. influenzae* KW20 (15). Để làm rõ hơn tương tác đặc hiệu với IgD(λ), thể biến nạp được chọn cũng được phân tích bằng miễn dịch dòng tế bào. Như có thể thấy trên Fig. 2B, *E. coli* JM83 chứa ADN hệ gen *H. influenzae* 772 tương ứng với trình tự mã hóa từ HI0175 đến HI0178 được phát hiện bằng IgD(λ) so với mẫu đối chứng âm *E. coli* được biến nạp chỉ bằng vector rỗng (Fig. 2A).

Ngoài phân tích dòng vô tính *E. coli* JM83, bốn protein *H. influenzae* (từ HI0175 đến HI0178) được tách dòng vào vector biểu hiện pET26(+) và được sản xuất trong *E. coli* BL21DE3. Protein tái tổ hợp thu được được phân tích bằng IgD(λ) trong phương pháp thấm tách Western và tìm thấy HI0178 là protein duy nhất phát hiện được bằng IgD(λ) (dữ liệu không được chỉ ra).

H. influenzae không điển hình (NTHi 3655) được gây đột biến bằng cách đưa băng gen kháng kanamycin vào gen mã hóa pE. Đột biến thu được được xác nhận bởi PCR và sự vắng mặt sự biểu hiện pE được chứng minh bằng cách phân tích protein màng ngoài trong phương pháp thấm tách Western có sử dụng kháng huyết thanh kháng pE đặc hiệu (dữ liệu không được chỉ ra). Đột biến NTHi 3655 Δ pe cũng được kiểm tra bằng miễn dịch dòng tế bào và thấy rằng huỳnh quang giảm rõ rệt bởi đột biến so với NTHi 3655 kiểu đại tương ứng khi phân tích bằng kháng huyết thanh thô đơn trị kháng pE và pAb thứ cấp dê kháng thể được tiếp hợp với FITC (Fig. 2C và D).

Protein E được thấy ở tất cả các *H. influenzae*, trong khi đó các phân loài khác là âm tính

Để phân tích sự biểu hiện pE của thể phân lập lâm sàng và chủng typ của NTHi, các tác giả đã phát triển thử nghiệm miễn dịch dòng tế bào gắn kết trực tiếp gồm IgD(λ) huyết thanh và kháng thể thứ cấp được tiếp hợp với FITC trực tiếp chống IgD người. Trong các thử nghiệm ban đầu, vi khuẩn được thu ở các thời điểm khác nhau được đem phân tích sự biểu hiện pE. Không thu được sự

khác nhau liên quan đến sự biểu hiện pE giữa vi khuẩn ở pha phát triển logarit hoặc vi khuẩn ở pha ổn định, cho thấy rằng pE bề mặt NTHi không phụ thuộc vào pha phát triển. Do đó, vi khuẩn ở pha ổn định được sử dụng trong tất cả các phân tích khác. Phân tích cường độ huỳnh quang trung bình (mfi) mỗi tế bào vi khuẩn và tổng số 22 chủng NTHi được gồm trong nghiên cứu này. Cường độ huỳnh quang biến đổi giữa các chủng NTHi khác nhau, mặc dù pE thấy ở phần lớn NTHi trong thử nghiệm cụ thể này bằng cách sử dụng IgD(λ) huyết thanh u tủy làm kháng thể phát hiện (Fig. 3).

Trong các thử nghiệm khác, kháng thể kháng pE đặc hiệu của thỏ được sử dụng để phát hiện pE bề mặt. Kháng huyết thanh kháng pE đặc hiệu nhận biết đặc hiệu pE cũng ở trong các chủng có vỏ của *H. influenzae*, *H. aegypticus*, và *H. haemolyticus*. (dữ liệu không được chỉ ra).

Để phân tích thêm mức biểu hiện pE, chiết phẩm màng ngoài được xử lý bằng Empigen® của các loài *haemophilus* khác nhau được kiểm tra trong phương pháp thẩm tách Western có sử dụng IgD(λ) làm kháng thể phát hiện (Bảng 1). Trong các thử nghiệm này, không thấy có sự khác nhau giữa các chủng *haemophilus* biểu hiện cao và thấp, chẳng hạn, trong phương pháp thẩm tách Western, tất cả các chủng hiển thị pE với cùng cường độ và cùng vị trí tương ứng với 16 kDa. *H. influenzae* có vỏ (typ từ a đến f) cũng biểu hiện pE như được thấy bằng phương pháp thẩm tách Western (Bảng 1). Ví dụ, sự biểu hiện pE trong bốn vỏ *H. influenzae* typ b (Hib) được so sánh với NTHi trên Fig. 4. *H. aegypticus*, và *H. haemolyticus* biểu hiện pE (Bảng 1), trong khi đó đối với các loài *haemophilus* liên quan khác, là âm tính trong thử nghiệm miễn dịch dòng tế bào (Fig. 3), không phát hiện thấy pE trong phân tích thẩm tách Western. Kháng huyết thanh kháng pE đặc hiệu nhận biết đặc hiệu pE cũng có trong các chủng có vỏ (dữ liệu không được chỉ ra).

Bảng 1

	Có vỏ hoặc không điển hình (NT)	Phân tích thẩm tách Western (dương tính/ âm tính; 0)		
556	<i>H. influenzae</i> CCUG EF 6881 I Caps.typ a	dương		
557	<i>H. influenzae</i> CCUG EF 7315 I Caps.typ a	dương		
94	H.i. typ a	dương		
479	<i>H. influenzae</i> Minn A typ b	dương		
547	<i>H. influenzae</i> Eagan typ b	dương		
485	<i>H. influenzae</i> 85 05 30 b	dương		
539	<i>H. influenzae</i> D-22 Caps.typ b	dương		
541	<i>H. influenzae</i> HK 695 Caps.typ b	dương		
542	<i>H. influenzae</i> HK 691 Caps.typ b	dương		
577	<i>H. influenzae</i> HK 713 Caps.typ b	dương		
578	<i>H. influenzae</i> HK 714 Caps.typ b	dương		
582	<i>H. influenzae</i> HK 83458 caps typ b	dương		
581	<i>H. influenzae</i> HK 163 caps typ b	dương		
580	<i>H. influenzae</i> HK 729 caps typ b	dương		
569	<i>H. influenzae</i> 17 B Dallas caps typ b	dương		
568	<i>H. influenzae</i> DL 42/2F4 caps typ b	dương		
579	<i>H. influenzae</i> HK 720 caps typ b	dương		
477	<i>H. influenzae</i> 6-460 caps typ b	dương		
570	<i>H. influenzae</i> DL 42 caps typ b	dương		
	<i>H. influenzae</i> RM 804 no caps typ b	dương		
583	<i>H. influenzae</i> HK 705 no caps typ b	dương		
551	<i>H. influenzae</i> CCUG EF 4851 II Caps.typ c	dương		
552	<i>H. influenzae</i> CCUG EF 4852 II Caps.typ c	dương		
95	H.i. typ c	dương		
555	<i>H. influenzae</i> CCUG EF 6878 IV Caps.typ d	dương		

560	<i>H. influenzae</i> CCUG EF NCTC 8470 Caps.typ d	duong		
96	H.i. typ d	duong		
554	<i>H. influenzae</i> CCUG EF 6877 IV Caps.typ e	duong		
88	H.i. typ e A11/01	duong		
89	H.i. typ e A76/01	duong		
90	H.i. typ e A77/99	duong		
559	<i>H. influenzae</i> CCUG EF 15519 II Caps.typ f	duong		
78	H.i. CCUG 15435 Caps.typ f	duong		
91	H.i. typ f A1/01	duong		
92	H.i. typ f A58/01	duong		
93	H.i. typ f A91/01	duong		
67	H.i. NT 6-9547 b.typ I	duong		
478	<i>H. influenzae</i> 6-601 NT	duong		
484	<i>H. influenzae</i> 6-6200 NT NT	duong		
507	<i>H. influenzae</i> 6-102 NT NT	duong		
65	H.i. NT 7-68/99 Claren. lavage	duong		
68	H.i. NT 7-758	duong		
546	<i>H. influenzae</i> 6-9547 NT	duong		
480	<i>H. influenzae</i> 772 NT	duong		
476	<i>H. influenzae</i> 6-115 NT	duong		
481	<i>H. influenzae</i> 6-504 NT	duong		
482	<i>H. influenzae</i> 6-7702 NT	duong		
483	<i>H. influenzae</i> 82 10 23 NT	duong		
486	<i>H. influenzae</i> 6-121 NT	duong		
506	<i>H. influenzae</i> 6-6267 NT	duong		
540	<i>H. influenzae</i> D-26 NT	duong		
543	<i>H. influenzae</i> Buffalo 1479 NT	duong		
544	<i>H. influenzae</i> Buffalo C 7961 NT	duong		
64	H.i. 56-2934 000428 NT	duong		

69	H.i. 7-120/99 bronch NT	duong		
70	H.i. 7-161/99 bronch NT	duong		
66	H.i. S6-2952 000428 NT	duong		
105	H.i. RM 3655 NT	duong		
531	H. aegypticus EF 628 NT,no b	duong		
73	H.aegypticus CCUG 25716	duong		
74	H.aegypticus CCUG 26840	duong		
76	H.aegypticus CCUG 39154	duong		
79	H.aegypticus HK 1247	duong		
80	H.aegypticus HK 1229	duong		
81	H.aegypticus HK 1242	duong		
82	H.i. biovar aegypticus HK 865	duong		
83	H.i. biovar aegypticus HK 871	duong		
84	H.i. biovar aegypticus HK 1222	duong		
85	H.i. biovar aegypticus HK 1239	duong		
86	BPF-like disease HK 1212	duong		
87	BPF-like disease HK 1213	duong		
72	H.haemolyticus CCUG 15642	duong		
101	H.haemolyticus 34669/83	duong		
102	H.haemolyticus 47802/88	duong		
103	H.haemolyticus 937016	duong		
104	H.haemolyticus 74108/81	duong		
520	H. parainfluenzae Biotype I HK 409	0		
521	H. parainfluenzae Biotype II HK 23	0		
58	59004 H.parainfl.biov.III	0		
59	75834 H.parainfl.biov.III	0		
60	78909 H.parainfl.biov.III	0		
97	H. parainfluenzae 947172	0		
98	H. parainfluenzae 59257/91	0		

99	H. parainfluenzae 59004/91	0		
100	H. parainfluenzae 977101	0		
545	H.parainfluenzae Buffalo 3198 NT	0		
75	H.somnus CCUG 37617	0		
512	H. parasuis 9918	0		
516	H. parasuis 99 19	0		
527	H. parasuis EF 3712	0		
524	H. paraphrophilus HK 319	0		
525	H. paraphrophilus HK 415	0		
517	H. paraphrophilus 12894	0		
71	H.segnis CCUG 14834	0		
526	H. aphrophilus HK 327	0		
529	H. aphrophilus 11832 A	0		
532	H. pleurapneumoniae EF 9917	0		
61	39612 Eikenella corrodens	0		
62	49064 Eikenella corrodens	0		
63	959074 Eikenella corrodens	0		
537	Actinobacillus actinomyc. HK 666	0		
	P.mult.78908/90	0		

pE22-160 [pE(A)] được tạo ra bằng cách tái tổ hợp được phát hiện bởi IgD(λ)

Trong các thử nghiệm ban đầu, các tác giả sáng chế đã nỗ lực tạo ra pE bằng cách tái tổ hợp, nhưng chỉ thu được các nồng độ nhỏ. Để tăng cực đại hiệu suất, mảnh pE cắt ngắn gồm các gốc axit amin từ lysin22 đến lysin160 được tạo ra. Peptit tín hiệu có đầu N bao gồm axit amin glutamin21 do đó được loại bỏ và thay thế bằng peptit dẫn ngoài chín gốc có nguồn gốc từ vector pET26(+) (Fig. 5A). pE22-160 cắt ngắn là pE(A) đã được dự định (Fig. 5B). Để khẳng định rằng sản phẩm protein tái tổ hợp tương ứng với pE 'kiểu đại',

pE(A) biểu hiện tái tổ hợp cùng với pE phân lập từ NTHi 772 được phân tích bằng SDS-PAGE và phương pháp thấm tách Western có sử dụng IgD(λ) làm mẫu dò. Như thể hiện trên Fig. 5D, pE tái tổ hợp(A) tương ứng đáng kể với pE kiểu đại trong SDS-PAGE. Ngoài ra, pE(A) được tạo ra trong *E. coli* có thể được phát hiện ở nồng độ thấp tới 0,01 microg bằng kháng huyết thanh IgD(λ) (Fig. 5E).

pE(A) được sử dụng để gây miễn dịch thử và sau khi hoàn thành việc phác đồ miễn dịch như được mô tả chi tiết trong phần Nguyên liệu và phương pháp, kháng huyết thanh kháng pE được tinh chế trên cột chứa peptit trội miễn dịch đo được (axit amin pE41-68). Kháng thể thu được phát hiện rõ pE ở cả bề mặt vi khuẩn (Fig. 2C) và trong phân tích thấm tách Western (dữ liệu không được chỉ ra).

Trình tự ADN của gen protein E và khung đọc mở

Trình tự axit amin và AND của pE1-160 từ chủng NTHi 772 được minh họa trên Fig. 6. Khung đọc mở (ORF) dài 160 axit amin và peptit tín hiệu dự đoán dài 20 axit amin. Phân tích máy tính cho thấy rằng peptidaza tín hiệu nhận biết các gốc axit amin từ alanin18 đến lysin22 và tách giữa gốc isoleuxin20 và glutamin21 (38). Đồng thời, profin hydropathy HID (39) chỉ ra rằng pE có một peptit tín hiệu kỵ nước, trong khi đó phần còn lại của phân tử phần lớn là ưa nước (Fig. 7).

Để xác định chi tiết vị trí tách peptidaza tín hiệu, pE tái tổ hợp có chiều dài đầy đủ được tiến hành phân hủy Edman. Tuy nhiên, đầu amino của chuỗi polypeptit pE có thể bị ngăn cản. Có thể giải thích cho sự thất bại này rằng axit amin đầu tiên là gốc pyroglutamyl như được mô tả từ trước đối với họ protein UspA *M. catarrhalis* (11). Tuy nhiên, các nỗ lực để loại bỏ gốc giả định này bằng pyroglutamat aminopeptidaza bị thất bại. Ngược với pE1-160 có chiều dài đầy đủ, trình tự đầu N đối với pE(A) (pE22-160) không có peptit tín hiệu

nội sinh của *H. influenzae* (Fig. 5), được mô tả đặc điểm thành công bởi phân hủy Edman và thấy chứa trình tự vector dự đoán, chẳng hạn, peptidaza tín hiệu trong *E. coli* bị phân cắt ở đúng vị trí (Fig. 5A).

Protein E được giải trình tự trong một loạt các loài *Haemophilus* khác nhau kể cả NTHi và *H. influenzae* có vỏ (Bảng 1). Thú vị là, pE được bảo toàn đặc biệt. Chỉ một số ít axit amin được gây đột biến điểm và chúng được gây đột biến trong hầu hết các chủng theo một kiểu đặc biệt (Fig. 6 và bảng 2).

Bảng 2. Đột biến điểm trong gen *pe* ở các loài *Haemophilus* khác nhau so với *H. influenzae*, Rd là chủng so sánh^{a)}.

Số chủng đột biến điểm với (%) đột biến		Số được phân tích
Ile20 > Thr20	18 (58 %)	31
Ala23 > Val23	5 (16 %)	31
Glu24 > Lys24	1 ^{b)} (3,2%)	31
Val28 > Met28	2 (6,5%)	31
Ala31 > Thr31	19 (61%)	31
Pro32 > Val32	3 (9,7%)	31
Pro32 > Ala32	5 (16%)	31
Ile41 > Val41	8 (26%)	31
Val47 > Ala47	3 (10%)	30
Arg76 > Lys76	2 (7,7%)	26
Ile107 > Val107	16 (62 %)	26
Lys153 > Glu153	1 ^{b)} (3,2%)	13
Ala154 > Val154	2 (15%)	13
Đầu C được kéo dài (3 aa thêm)		
SVDDKK kết thúc (=Rd) ^{c)}	11 (85%)	13
SVDDKKSAP kết thúc	2 (15%)	13

a) Gen *pe* được giải trình tự trong *H. influenzae* có vỏ typ a (n=2), b (n=2), c (n=2), d (n=1), e (n=2), và f (n=3), NTHi (n=8), *H. influenzae* biovar *aegypticus* (n=6) và *H. aegypticus* (n=5), có sử dụng đoạn môi nằm cạnh sườn.

b) NTHi 772 (SEQ ID No:1)

c) Rd chỉ *H. influenzae* chủng Rd.

Các mảnh pE khác nhau có thể được tạo ra dễ dàng trong *E. coli*

Tám trình tự ADN bổ trợ có nguồn gốc từ pE có chiều dài đầy đủ được tách dòng trong pET26b(+) và biểu hiện trong *E. coli*. Các protein thu được được tinh chế trên nhựa niken bằng ái lực đối với histidin đánh dấu (Fig. 8). Protein tái tổ hợp che giấu toàn bộ sản phẩm protein pE trưởng thành và chiều dài và vị trí riêng của chúng được minh họa trên Fig. 8A và sản phẩm tinh chế được phác họa trên Fig. 8B.

pE là yếu tố có độc lực quan trọng trong bệnh viêm tai giữa cấp tính ở chuột (AOM)

Để xem xét vai trò của pE như là một yếu tố có độc lực đối với NTHi, chuột được gây nhiễm ở tai giữa bằng từ 10^5 đến 10^9 NTHi 3655 Δpe hoặc kiểu dại NTHi 3655 tương ứng (Fig. 9). Thú vị là, cần có NTHi 3655 Δpe nhiều gấp từ 100 đến 1.000 lần để gây ra AOM tương tự so với vi khuẩn kiểu dại. Do đó, pE là một yếu tố có độc lực quan trọng đối với AOM gây ra bởi NTHi.

pE có tính miễn dịch cao trong một quần thể xác định

Để đo mức kháng thể ở trẻ em và người cho máu, pE tái tổ hợp(A) được tinh chế từ *E. coli* (Fig.5B) và được sử dụng trong thử nghiệm ELISA. Các kết quả phân tích ELISA của kháng thể chống pE(A) được chỉ ra trên Fig. 9. Trẻ em nhỏ hơn 6 tháng tuổi có IgG và IgA có thể phát hiện được chống pE(A). Kháng thể IgG thể hiện mức pic ở trẻ em từ 5 đến 10 tuổi. Ngược lại, kháng

thể IgA tăng dần cùng với sự tăng theo tuổi và giá trị cao nhất phát hiện được ở nhóm tuổi từ 70 đến 80.

Epitop hữu ích

Epitop tế bào B của protein nằm chủ yếu ở bề mặt của nó. Để dự đoán epitop tế bào B của polypeptit protein E, hai phương pháp được phối hợp lại: dự đoán cấu trúc 2 chiều và dự đoán sự sắp xếp kháng nguyên. Dự đoán cấu trúc 2 chiều được thực hiện bằng cách sử dụng chương trình PSIPRED (từ David Jones, Brunel Bioinformatics Group, Dept. Biological Sciences, Brunel University, Uxbridge UB8 3PH, UK). Sự sắp xếp kháng nguyên được tính toán trên cơ sở phương pháp được mô tả bởi Jameson và Wolf (CABIOS 4:181-186 [1988]). Các thông số được sử dụng trong chương trình này là sự sắp xếp kháng nguyên và chiều dài tối thiểu đối với peptit sinh miễn dịch. Sự sắp xếp kháng nguyên là 0,9 đối với tối thiểu 5 axit amin liên tục được sử dụng làm ngưỡng trong chương trình. Các peptit chứa các epitop tế bào B tốt, tiềm năng được liệt kê trong bảng 3. Chúng có thể là hữu ích (tốt hơn là được tiếp hợp hoặc liên kết tái tổ hợp với protein lớn hơn) trong chế phẩm vacxin để ngăn ngừa nhiễm ntHi, như các peptit tương tự chứa các đột biến bảo toàn (tốt hơn là 70, 80, 85, 95, 99 hoặc 100% giống với trình tự của bảng 3) hoặc thể cắt ngắn chứa 5 hoặc nhiều (chẳng hạn 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 20 hoặc 25) axit amin từ đó hoặc thể kéo dài chứa, chẳng hạn 1, 2, 3, 5, 10 axit amin khác ở đầu N- và/hoặc C-của peptit từ trạng thái tự nhiên của protein E (SEQ ID NO: 1 hoặc thể tương đồng tự nhiên của chúng như chỉ ra trong Bảng 2 ở trên) polypeptit bảo toàn epitop hiệu quả có thể gây ra đáp ứng miễn dịch trong vật chủ chống protein E polypeptit.

Bảng 3: Epitop tế bào B tiềm năng từ SEQ ID NO:1 (hoặc thể tương đồng tự nhiên của nó)

Vị trí	Trình tự
21	QKAKQND
21	QKVKQND
21	QKAQQND
21	QKVQQND
59	DNQEPQ
82	PEPKRYARSVRQ
106	QIRTDIFYDEFWGQG
106	QVRTDIFYDEFWGQG
123	APKKQKKH
136	PDTTL

Kết luận

Protein bề mặt màng ngoài pE của *Haemophilus* là một yếu tố có độc lực quan trọng đối với AOM cảm ứng bởi NTHi, được miễn dịch cao trong một quần thể xác định và do đó là vacxin rất thích hợp cho nhiều bệnh ở người.

Tài liệu tham khảo

1. Ruan, M., M. Akkoyunlu, A. Grubb, và A. Forsgren. 1990. Protein D of *Haemophilus influenzae*. A novel vi khuẩn surface protein with affinity for human IgD. *J. Immunol.* 145:3379.
2. Janson, H., L.-O. Hedöen, A. Grubb, M. Ruan, và A. Forsgren. 1991. Protein D, an immunoglobulin D-binding protein of *Haemophilus influenzae*: cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 59:119.
3. Janson, H., Å. Melhus, A. Hermansson, và A. Forsgren. 1994. Protein D, the glycerophosphodiester phosphodiesterase from *Haemophilus influenzae*

with affinity for human immunoglobulin D, influences virulence in a rat otitis model. *Infect. Immun.* 62:4848.

4. Janson, H., B. Carl  n, A. Cervin, A. Forsgren, A. Bj  rk-Magnusdottir, S. Lindberg, v   T. Runer. 1999. Effects on the ciliated epithelium of protein D-producing and -nonproducing nontypeable *Haemophilus influenzae* in nasopharyngeal tissue cultures. *J. Infect. Dis.* 180:737.

5. Ahren, I. L., H. Janson, A. Forsgren, K. Riesbeck. 2001. Protein D expression promotes the adherence and internalization of non-typeable *Haemophilus influenzae* into human monocytic cells. *Microb. Pathog.* 31:151.

6. Forsgren, A. v   Grubb, A. (1979) Many bacterial species bind human IgD. *J. Immunol.* 122, 1468-1472.

7. Banck, G. v   Forsgren, A. (1978) Many bacterial species are mitogenic for human blood lymphocytes. *Scand. J. Immunol.* 8, 347-354.

8. Calvert, J.E. v   Calogeres, A. (1986) Characteristics of human B cells responsive to the T-independent mitogen *Branhamella catarrhalis*. *Immunology* 58, 37-41.

9. Forsgren, A., Penta, A., Schlossman, S.F. v   Tedder, T.F. (1988) *Branhamella catarrhalis* activates human B lymphocytes following interactions with surface IgD and class I major histocompatibility complex antigens. *Cell. Immunol.* 112, 78-88.

10. Sasaki, K. v   Munson Jr., R.S. (1993) Protein D of *Haemophilus influenzae* is not a universal immunoglobulin D-binding protein. *Infect. Immun.* 61, 3026-3031.

11. Forsgren, A., M. Brant, A. Mùllenkvis, A. Muyombwe, H. Janson, N. Woin, và K. Riesbeck,. 2001. Isolation and characterization of a novel IgD-binding protein from *Moraxella catarrhalis*. *J. Immunol.* 167:2112.
12. Gorg, A., C. Obermaier, G. Boguth, W. Weiss. 1999. Recent developments in two-dimensional gel electrophoresis with immobilized pH gradients: wide pH gradients up to pH 12, longer separation distances and simplified procedures. *Electrophoresis* 20:712.
13. Berns, K. I. và C. A. Thomas, Jr. 1965. Isolation og high molecular weight DNA from *Haemophilus influenzae*. *J. Mol. Biol.* 11:476.
14. Clark-Curtiss, J. E. , W. R. Jacobs, M. A. Docherty, L. R. Ritchie, và R. Curtiss, 3rd. 1985. Molecular analysis of DNA and construction of genomic libraries of *Mycobacterium leprae*. *J Bacteriol.* 161:1093.
15. Fleischmann, R. D., M. D. Adams, O. White, R. A. Clayton, E. F. Kirkness, A. R. Kerlavage, C. J. Bult, J. F. Tomb, B. A. Dougherty, J. M. Merrick, *et al.* 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* 269:496.
16. Nielsen, H., J. Engelbrecht, S. Brunak, và G. von Heijne. 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering* 10: 1.
17. Kyte, J. và R. F. Doolittle. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157:105.
18. Poje, G., và J. R. Redfield. 2003. Transformation of *Haemophilus influenzae*. *Methods. Mol. Med.* 71:57-70.
19. Hussain, M., K. Becker, C. Von Eiff, J. Schrenzel, G. Peters, và M. Herrmann. 2001. *J. Bacteriol.* 183(23):6778-6786.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm sinh miễn dịch chứa protein bề mặt, được thấy ở *Haemophilus influenzae*, có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 1, hoặc mảnh của nó, trong đó mảnh này bao gồm các axit amin ở vị trí 22-160 (SEQ ID NO: 2), 22-95 (SEQ ID NO: 5), 22-125 (SEQ ID NO: 6), 56-125 (SEQ ID NO: 7), 56-160 (SEQ ID NO: 8) hoặc 86-160 (SEQ ID NO: 9) của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1, mảnh này (nếu cần thiết được phối cặp với chất mang) có khả năng làm xuất hiện đáp ứng miễn dịch nhận biết polypeptit có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1.
2. Chế phẩm sinh miễn dịch chứa mảnh sinh miễn dịch của protein bề mặt như được xác định ở điểm 1, trong đó mảnh này được thấy ở *Haemophilus influenzae*.
3. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm 1 hoặc 2, trong đó chế phẩm này còn chứa một hoặc nhiều tá chất, chất dẫn, tá dược, chất kết dính, chất mang, chất bảo quản, chất đệm, chất nhũ hóa, chất thấm ướt, hoặc hợp chất làm dễ chuyển nhiễm.
4. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó chế phẩm này chứa ít nhất một vacxin nữa.
5. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó chế phẩm này chứa phần sinh miễn dịch của một phân tử khác.
6. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm 5, trong đó phần sinh miễn dịch của một phân tử khác này được chọn từ nhóm bao gồm protein D của *H. influenzae*, MID của *Moraxella catarrhalis*, UspA1 hoặc UspA2 của *Moraxella catarrhalis*, và protein màng ngoài của mầm gây bệnh đường hô hấp bất kỳ.
7. Chế phẩm sinh miễn dịch chứa trình tự axit nucleic mã hóa protein, mảnh hoặc peptit như được xác định ở điểm 1 hoặc 2.

8. Chế phẩm sinh miễn dịch chứa trình tự axit nucleic tái tổ hợp chứa trình tự axit nucleic như được xác định ở điểm 7, trong đó trình tự này được dung hợp với ít nhất một gen khác.
9. Chế phẩm sinh miễn dịch chứa plasmit hoặc thể thực khuẩn chứa trình tự axit nucleic như được xác định ở điểm 7 hoặc 8.
10. Chế phẩm sinh miễn dịch chứa vật chủ không phải là người chứa ít nhất một plasmit như được xác định ở điểm 9 và có khả năng sản sinh protein, mảnh hoặc peptit như được xác định ở điểm 1 hoặc 2, trong đó vật chủ này được chọn trong số vi khuẩn, nấm men và thực vật.
11. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm 10, trong đó vật chủ này là *E. coli*.
12. Chế phẩm sinh miễn dịch chứa protein hoặc polypeptit dung hợp, trong đó protein, mảnh hoặc peptit như được xác định ở điểm 1 hoặc 2 được kết hợp với ít nhất một protein khác bằng cách sử dụng trình tự axit nucleic tái tổ hợp như được xác định ở điểm 8.
13. Chế phẩm sinh miễn dịch chứa polypeptit phân lập có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO. 1.
14. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm 13, trong đó polypeptit này không có peptit tín hiệu (các axit amin 1-20) của SEQ ID NO: 1.
15. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm 13 hoặc 14, trong đó polypeptit này có Thr thay cho Ile ở vị trí 20 của SEQ ID NO: 1.
16. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm 14 hoặc 15, trong đó polypeptit này có Val thay cho Ala ở vị trí 23 của SEQ ID NO: 1.
17. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 16, trong đó polypeptit này có Gln thay cho Lys ở vị trí 24 của SEQ ID NO: 1.
18. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 17, trong đó polypeptit này có Met thay cho Val ở vị trí 28 của SEQ ID NO: 1.

19. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 18, trong đó polypeptit này có Thr thay cho Ala ở vị trí 31 của SEQ ID NO: 1.
20. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 19, trong đó polypeptit này có Val thay cho Ile ở vị trí 41 của SEQ ID NO: 1.
21. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 20, trong đó polypeptit này có Ala thay cho Val ở vị trí 47 của SEQ ID NO: 1.
22. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 21, trong đó polypeptit này có Lys thay cho Arg ở vị trí 76 của SEQ ID NO: 1.
23. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 22, trong đó polypeptit này có Val thay cho Ile ở vị trí 107 của SEQ ID NO: 1.
24. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 23, trong đó polypeptit này có Lys thay cho Gly ở vị trí 152 của SEQ ID NO: 1.
25. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 24, trong đó polypeptit này có Val thay cho Ala ở vị trí 154 của SEQ ID NO: 1.
26. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 25, trong đó polypeptit này có trình tự axit amin bổ sung Ser Ala Pro ở đầu C của trình tự nêu trong SEQ ID NO:1.
27. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 26, trong đó polypeptit này có Val thay cho Pro ở vị trí 32 của SEQ ID NO: 1.
28. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 27, trong đó polypeptit này có Ala thay cho Pro ở vị trí 32 của SEQ ID NO: 1.
29. Chế phẩm sinh miễn dịch chứa polypeptit như được xác định ở điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 28, trong đó polypeptit nêu trên là một phần của protein dung hợp lớn hơn.
30. Chế phẩm sinh miễn dịch chứa polynucleotit phân lập mã hóa polypeptit như được xác định ở điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 29.

31. Chế phẩm sinh miễn dịch chứa polynucleotit phân lập chứa trình tự nucleotit mã hóa polypeptit nêu trong SEQ ID NO:1, có thể thu được bằng cách sàng lọc thư viện thích hợp ở điều kiện lai nghiêm ngặt với mẫu dò đánh dấu có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 11 hoặc mảnh của nó.
32. Chế phẩm sinh miễn dịch chứa vector biểu hiện hoặc vi sinh vật sống tái tổ hợp chứa polynucleotit phân lập như được xác định ở điểm 30.
33. Chế phẩm sinh miễn dịch chứa vi sinh vật sống tái tổ hợp chứa vector biểu hiện như được xác định ở điểm 32.
34. Chế phẩm sinh miễn dịch chứa tế bào vật chủ chứa vector biểu hiện như được xác định ở điểm 32.
35. Quy trình sản xuất polypeptit như được xác định ở điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 29 bao gồm bước nuôi cấy tế bào vật chủ như được xác định ở điểm 34 ở điều kiện đủ để sản sinh polypeptit nêu trên và thu hồi polypeptit này từ môi trường nuôi cấy.
36. Quy trình để biểu hiện polynucleotit như được xác định ở điểm 30, trong đó quy trình này bao gồm bước biến nạp tế bào vật chủ bằng vector biểu hiện chứa ít nhất một trong số các polynucleotit nêu trên và nuôi cấy tế bào vật chủ này ở điều kiện đủ để biểu hiện polynucleotit bất kỳ trong số các polynucleotit nêu trên.
37. Chế phẩm sinh miễn dịch chứa polypeptit như được xác định ở điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 29 với lượng hữu hiệu và tá dược được dụng.
38. Chế phẩm sinh miễn dịch chứa polynucleotit như được xác định ở điểm bất kỳ trong số các điểm từ 30 đến 31 với lượng hữu hiệu và tá dược được dụng.
39. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm 37 hoặc 38, trong đó chế phẩm này chứa ít nhất một kháng nguyên *Haemophilus influenzae* khác.

40. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 31, trong đó chế phẩm này được bào chế với pneumolysin từ *Streptococcus pneumoniae*.
41. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 31, trong đó chế phẩm này được bào chế với Omp106 từ *Moraxella catarrhalis*.
42. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 31, trong đó chế phẩm này được bào chế với UspA1 và/hoặc UspA2 từ *Moraxella catarrhalis*.
43. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 31, trong đó chế phẩm này được bào chế với Hly 3 từ *Moraxella catarrhalis*.
44. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 31, trong đó chế phẩm này được bào chế với OmpCD từ *Moraxella catarrhalis*.
45. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 31, trong đó chế phẩm này được bào chế với D15 từ *Moraxella catarrhalis*.
46. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 31, trong đó chế phẩm này được bào chế với Omp 26 từ *Haemophilus influenzae*.
47. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 31, trong đó chế phẩm này được bào chế với P6 từ *Haemophilus influenzae*.
48. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 31, trong đó chế phẩm này được bào chế với protein D từ *Haemophilus influenzae*.
49. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 31, trong đó chế phẩm này được bào chế với NlpC2 từ *Haemophilus influenzae*.
50. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 31, trong đó chế phẩm này được bào chế với Slp từ *Haemophilus influenzae*.
51. Thuốc chứa ít nhất một protein, mảnh hoặc peptit như được xác định ở điểm 1 hoặc 2 và một hoặc nhiều tá chất, chất dẫn, tá dược, chất kết dính, chất

mang, chất bảo quản, chất đệm, chất nhũ hóa, chất thấm ướt, hoặc hợp chất làm dễ chuyển nhiễm.

52. Phương pháp phân lập protein, mảnh hoặc peptit như được xác định ở điểm 1 hoặc 2, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

a) nuôi cấy *Haemophilus influenzae* hoặc *E. coli* chứa ADN mã hóa protein, mảnh hoặc peptit nêu trên, thu vi khuẩn và phân lập thể màng ngoài hoặc thể vùi;

b) hòa tan thể vùi bằng chất solvat hóa mạnh;

c) bổ sung chất hồi tính; và

d) thẩm tách huyền phù thu được bằng dung dịch đệm có độ pH nằm trong khoảng từ 8 đến 10.

53. Phương pháp theo điểm 52, trong đó chất solvat hóa là guanidín hydrochlorua.

54. Phương pháp theo điểm 52 hoặc 53, trong đó chất hồi tính là arginin.

55. Phương pháp sản xuất chế phẩm sinh miễn dịch bao gồm các bước như được xác định ở điểm bất kỳ trong số các điểm từ 52 đến 54, trong đó protein, mảnh hoặc peptit này được bào chế với tá dược.

56. Chế phẩm sinh miễn dịch chứa polypeptit, trong đó polypeptit này chứa trình tự axit amin thay đổi so với SEQ ID NO: 1 ở một hoặc nhiều vị trí, trong đó (các) thay đổi này được chọn từ nhóm bao gồm khuyết đoạn peptit tín hiệu (các axit amin 1-20) của SEQ ID NO: 1; thay thế Ile bằng Thr ở vị trí 20 của SEQ ID NO: 1, thay thế Ala bằng Val ở vị trí 23 của SEQ ID NO: 1, thay thế Lys bằng Glu ở vị trí 24 của SEQ ID NO: 1, thay thế Val bằng Met ở vị trí 28 của SEQ ID NO: 1, thay thế Ala bằng Thr ở vị trí 31 của SEQ ID NO: 1, thay thế Ile bằng Val ở vị trí 41 của SEQ ID NO: 1, thay thế Val bằng Ala ở vị trí 47 của SEQ ID NO: 1, thay thế Gly bằng Lys ở vị trí 152 của SEQ ID NO: 1,

thay thế Ala bằng Val ở vị trí 154 của SEQ ID NO: 1, bổ sung Ser-Ala-Pro ở đầu C của SEQ ID NO: 1, thay thế Pro bằng Val ở vị trí 32 của SEQ ID NO: 1, và thay thế Pro bằng Ala ở vị trí 32 của SEQ ID NO: 1.

57. Chế phẩm sinh miễn dịch chứa polypeptit, trong đó polypeptit này chứa trình tự axit amin thay đổi so với SEQ ID NO: 1 ở ít nhất ba vị trí, trong đó (các) thay đổi được chọn từ nhóm bao gồm khuyết đoạn peptit tín hiệu (các axit amin 1-20) của SEQ ID NO: 1; thay thế Ile bằng Thr ở vị trí 20 của SEQ ID NO: 1, thay thế Ala bằng Val ở vị trí 23 của SEQ ID NO: 1, thay thế Lys bằng Glu ở vị trí 24 của SEQ ID NO: 1, thay thế Val bằng Met ở vị trí 28 của SEQ ID NO: 1, thay thế Ala bằng Thr ở vị trí 31 của SEQ ID NO: 1, thay thế Ile bằng Val ở vị trí 41 của SEQ ID NO: 1, thay thế Val bằng Ala ở vị trí 47 của SEQ ID NO: 1, thay thế Arg bằng Lys ở vị trí 76 của SEQ ID NO: 1, thay thế Ile bằng Val ở vị trí 107 của SEQ ID NO: 1, thay thế Gly bằng Lys ở vị trí 152 của SEQ ID NO: 1, thay thế Ala bằng Val ở vị trí 154 của SEQ ID NO: 1, bổ sung Ser-Ala-Pro ở đầu C của SEQ ID NO: 1, thay thế Pro bằng Val ở vị trí 32 của SEQ ID NO: 1, và thay thế Pro bằng Ala ở vị trí 32 của SEQ ID NO: 1.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Arne Forsgren

<120> CHẾ PHẨM SINH MIỄN DỊCH VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT CHẾ PHẨM NÀY

<130> 21030217

<160> 11

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 160

<212> PRT

<213> Haemophilus influenzae (pE)

<400> 1

Met Lys Lys Ile Ile Leu Thr Leu Ser Leu Gly Leu Leu Thr Ala Cys
 1 5 10 15

Ser Ala Gln Ile Gln Lys Ala Lys Gln Asn Asp Val Lys Leu Ala Pro
 20 25 30

Pro Thr Asp Val Arg Ser Gly Tyr Ile Arg Leu Val Lys Asn Val Asn
 35 40 45

Tyr Tyr Ile Asp Ser Glu Ser Ile Trp Val Asp Asn Gln Glu Pro Gln
 50 55 60

Ile Val His Phe Asp Ala Val Val Asn Leu Asp Arg Gly Leu Tyr Val
 65 70 75 80

Tyr Pro Glu Pro Lys Arg Tyr Ala Arg Ser Val Arg Gln Tyr Lys Ile
 85 90 95

Leu Asn Cys Ala Asn Tyr His Leu Thr Gln Ile Arg Thr Asp Phe Tyr
 100 105 110

Asp Glu Phe Trp Gly Gln Gly Leu Arg Ala Ala Pro Lys Lys Gln Lys
 115 120 125

Lys His Thr Leu Ser Leu Thr Pro Asp Thr Thr Leu Tyr Asn Ala Ala
 130 135 140

Gln Ile Ile Cys Ala Asn Tyr Gly Glu Ala Phe Ser Val Asp Lys Lys
 145 150 155 160

<210> 2

<211> 139

<212> PRT

<213> Mảnh protein từ Haemophilus influenzae hoặc protein tổng hợp (pE(A))

<400> 2

Lys Ala Lys Gln Asn Asp Val Lys Leu Ala Pro Pro Thr Asp Val Arg
1 5 10 15

Ser Gly Tyr Ile Arg Leu Val Lys Asn Val Asn Tyr Tyr Ile Asp Ser
20 25 30

Glu Ser Ile Trp Val Asp Asn Gln Glu Pro Gln Ile Val His Phe Asp
35 40 45

Ala Val Val Asn Leu Asp Arg Gly Leu Tyr Val Tyr Pro Glu Pro Lys
50 55 60

Arg Tyr Ala Arg Ser Val Arg Gln Tyr Lys Ile Leu Asn Cys Ala Asn
65 70 75 80

Tyr His Leu Thr Gln Ile Arg Thr Asp Phe Tyr Asp Glu Phe Trp Gly
85 90 95

Gln Gly Leu Arg Ala Ala Pro Lys Lys Gln Lys Lys His Thr Leu Ser
100 105 110

Leu Thr Pro Asp Thr Thr Leu Tyr Asn Ala Ala Gln Ile Ile Cys Ala
115 120 125

Asn Tyr Gly Glu Ala Phe Ser Val Asp Lys Lys
130 135

<210> 3

<211> 28

<212> PRT

<213> Mảnh protein từ Haemophilus influenzae hoặc peptit tổng hợp (pE41-68)

<400> 3

Ile Arg Leu Val Lys Asn Val Asn Tyr Tyr Ile Asp Ser Glu Ser Ile
1 5 10 15

Trp Val Asp Asn Gln Glu Pro Gln Ile Val His Phe
20 25

<210> 4

<211> 39

<212> PRT

<213> Mảnh protein từ Haemophilus influenzae hoặc peptit tổng hợp (pE22-60)

<400> 4

Lys Ala Lys Gln Asn Asp Val Lys Leu Ala Pro Pro Thr Asp Val Arg
1 5 10 15

Ser Gly Tyr Ile Arg Leu Val Lys Asn Val Asn Tyr Tyr Ile Asp Ser
20 25 30

Glu Ser Ile Trp Val Asp Asn
35

<210> 5

<211> 74

<212> PRT

<213> Mảnh protein từ Haemophilus influenzae hoặc peptit tổng hợp (pE22-95)

<400> 5

Lys Ala Lys Gln Asn Asp Val Lys Leu Ala Pro Pro Thr Asp Val Arg
1 5 10 15

Ser Gly Tyr Ile Arg Leu Val Lys Asn Val Asn Tyr Tyr Ile Asp Ser
20 25 30

Glu Ser Ile Trp Val Asp Asn Gln Glu Pro Gln Ile Val His Phe Asp
35 40 45

Ala Val Val Asn Leu Asp Arg Gly Leu Tyr Val Tyr Pro Glu Pro Lys
50 55 60

Arg Tyr Ala Arg Ser Val Arg Gln Tyr Lys
65 70

<210> 6

<211> 104

<212> PRT

<213> Mảnh protein từ Haemophilus influenzae hoặc peptit tổng hợp (pE22-125)

<400> 6

Lys Ala Lys Gln Asn Asp Val Lys Leu Ala Pro Pro Thr Asp Val Arg
1 5 10 15

Ser Gly Tyr Ile Arg Leu Val Lys Asn Val Asn Tyr Tyr Ile Asp Ser
20 25 30

Glu Ser Ile Trp Val Asp Asn Gln Glu Pro Gln Ile Val His Phe Asp
35 40 45

Ala Val Val Asn Leu Asp Arg Gly Leu Tyr Val Tyr Pro Glu Pro Lys
50 55 60

Arg Tyr Ala Arg Ser Val Arg Gln Tyr Lys Ile Leu Asn Cys Ala Asn
65 70 75 80

Tyr His Leu Thr Gln Ile Arg Thr Asp Phe Tyr Asp Glu Phe Trp Gly
85 90 95

Gln Gly Leu Arg Ala Ala Pro Lys
100

<210> 7

<211> 70

<212> PRT

<213> Mảnh protein từ Haemophilus influenzae hoặc peptit tổng hợp (pE56-125)

<400> 7

Ile Trp Val Asp Asn Gln Glu Pro Gln Ile Val His Phe Asp Ala Val
1 5 10 15

Val Asn Leu Asp Arg Gly Leu Tyr Val Tyr Pro Glu Pro Lys Arg Tyr
20 25 30

Ala Arg Ser Val Arg Gln Tyr Lys Ile Leu Asn Cys Ala Asn Tyr His
35 40 45

Leu Thr Gln Ile Arg Thr Asp Phe Tyr Asp Glu Phe Trp Gly Gln Gly
50 55 60

Leu Arg Ala Ala Pro Lys
65 70

<210> 8

<211> 105

<212> PRT

<213> Mảnh protein từ Haemophilus influenzae hoặc peptit tổng hợp (pE56-160)

<400> 8

Ile Trp Val Asp Asn Gln Glu Pro Gln Ile Val His Phe Asp Ala Val
1 5 10 15

Val Asn Leu Asp Arg Gly Leu Tyr Val Tyr Pro Glu Pro Lys Arg Tyr
20 25 30

Ala Arg Ser Val Arg Gln Tyr Lys Ile Leu Asn Cys Ala Asn Tyr His
35 40 45

Leu Thr Gln Ile Arg Thr Asp Phe Tyr Asp Glu Phe Trp Gly Gln Gly
50 55 60

Leu Arg Ala Ala Pro Lys Lys Gln Lys Lys His Thr Leu Ser Leu Thr
65 70 75 80

Pro Asp Thr Thr Leu Tyr Asn Ala Ala Gln Ile Ile Cys Ala Asn Tyr
85 90 95

Gly Glu Ala Phe Ser Val Asp Lys Lys
100 105

<210> 9
<211> 75
<212> PRT
<213> Mảnh protein từ Haemophilus influenzae hoặc peptit tổng hợp (pE86-160)

<400> 9

Arg Tyr Ala Arg Ser Val Arg Gln Tyr Lys Ile Leu Asn Cys Ala Asn
1 5 10 15

Tyr His Leu Thr Gln Ile Arg Thr Asp Phe Tyr Asp Glu Phe Trp Gly
20 25 30

Gln Gly Leu Arg Ala Ala Pro Lys Lys Gln Lys Lys His Thr Leu Ser
35 40 45

Leu Thr Pro Asp Thr Thr Leu Tyr Asn Ala Ala Gln Ile Ile Cys Ala
50 55 60

Asn Tyr Gly Glu Ala Phe Ser Val Asp Lys Lys
65 70 75

<210> 10
<211> 46
<212> PRT
<213> Mảnh protein từ Haemophilus influenzae hoặc peptit tổng hợp (pE115-160)

<400> 10

Phe Trp Gly Gln Gly Leu Arg Ala Ala Pro Lys Lys Gln Lys Lys His
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Pro Asp Thr Thr Leu Tyr Asn Ala Ala Gln Ile
20 25 30

Ile Cys Ala Asn Tyr Gly Glu Ala Phe Ser Val Asp Lys Lys
35 40 45

<210> 11

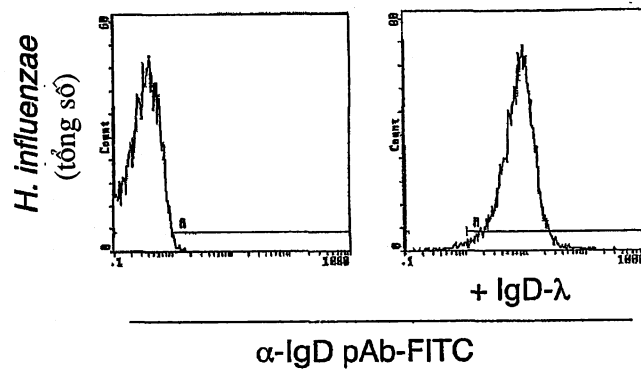
<211> 483
 <212> ADN
 <213> Haemophilus influenzae

<400> 11
 atgaaaaaaaa ttattttaac attatcactt gggttactta ctgcctgttc tgctcaaatc 60
 caaaaggcta aacaaaatga tgtgaagctg gcaccgccga ctgatgtacg aagcggatat 120
 atacgtttgg taaagaatgt gaattattac atcgatagtg aatcgatctg ggtggataac 180
 caagagccac aaattgtaca ttttgatgca gtggtgaatt tagatagggg attgtatgtt 240
 taccctgagc ctaaacgtta tgcacgttct gttcgtcagt ataagatctt gaattgtgca 300
 aattatcatt taactcaaat acgaactgat ttctatgatg aattttgggg acagggtttg 360
 cgggcagcac ctaaaaagca aaagaaacat acgttaagtt taacacctga tacaacgctt 420
 tataatgctg ctcagattat ttgtgcgaac tatggtgaag cattttcagt tgataaaaaa 480
 taa 483

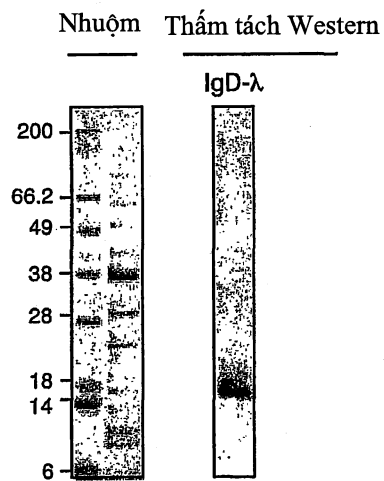
1/11

Fig. 1

A



B



C

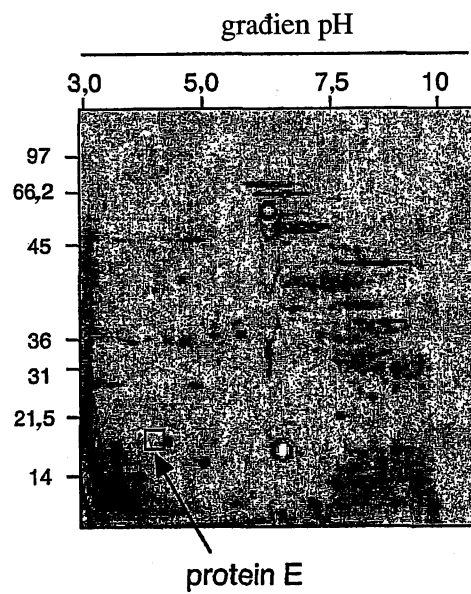
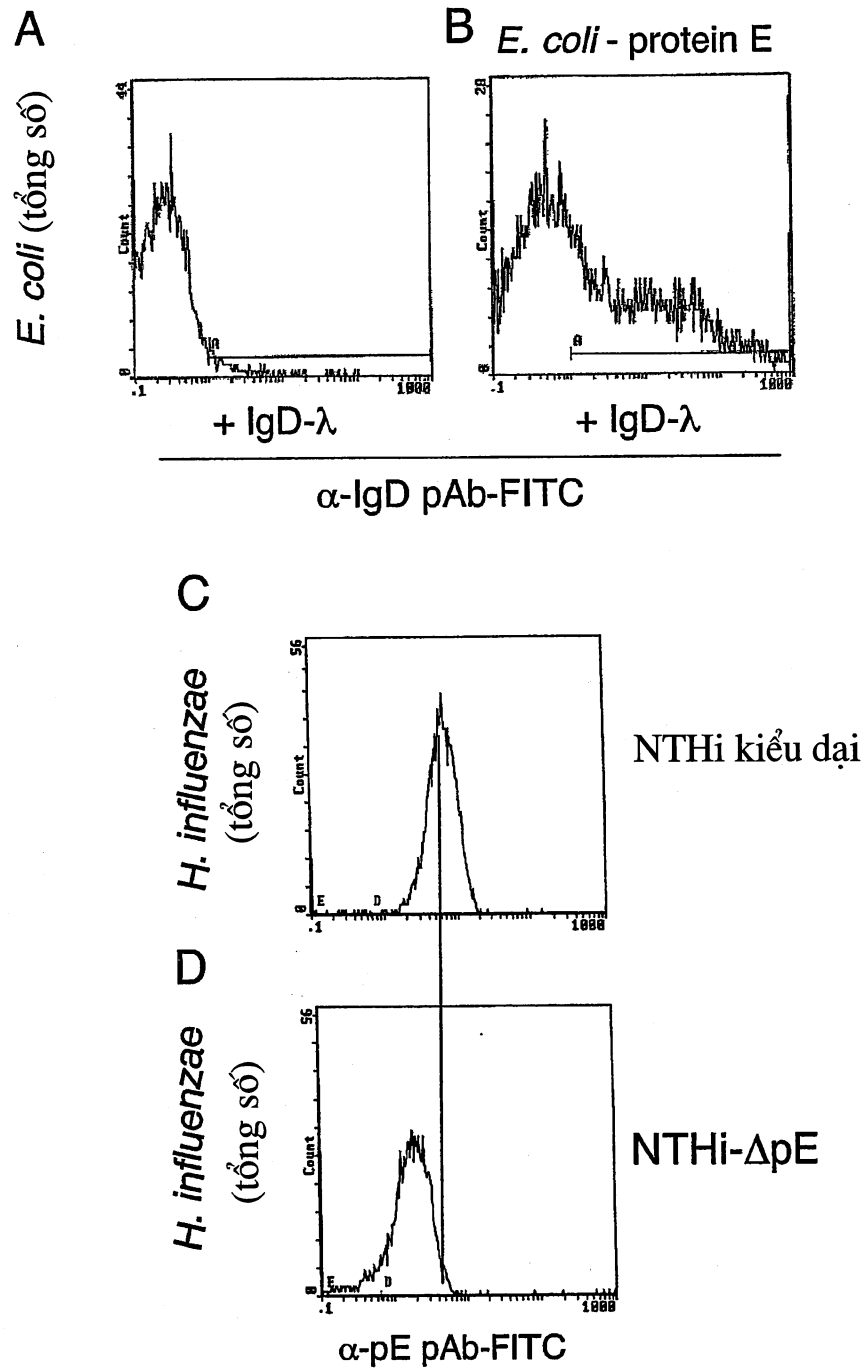
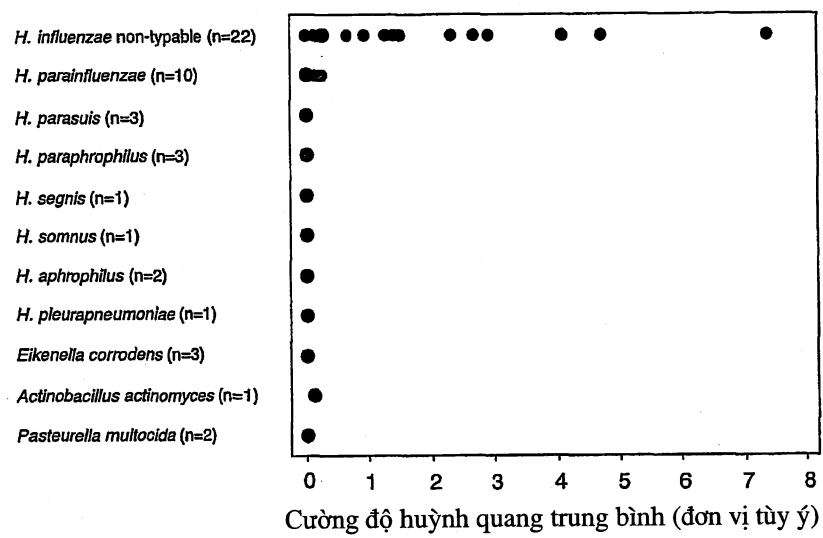


Fig. 2



3/11

Fig. 3



4/11

Fig. 4

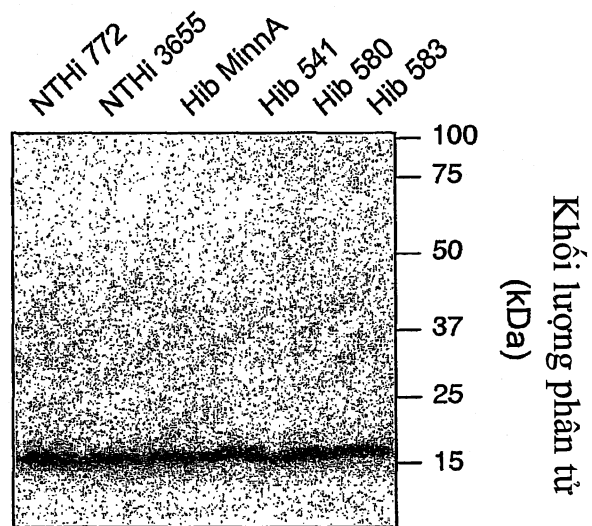
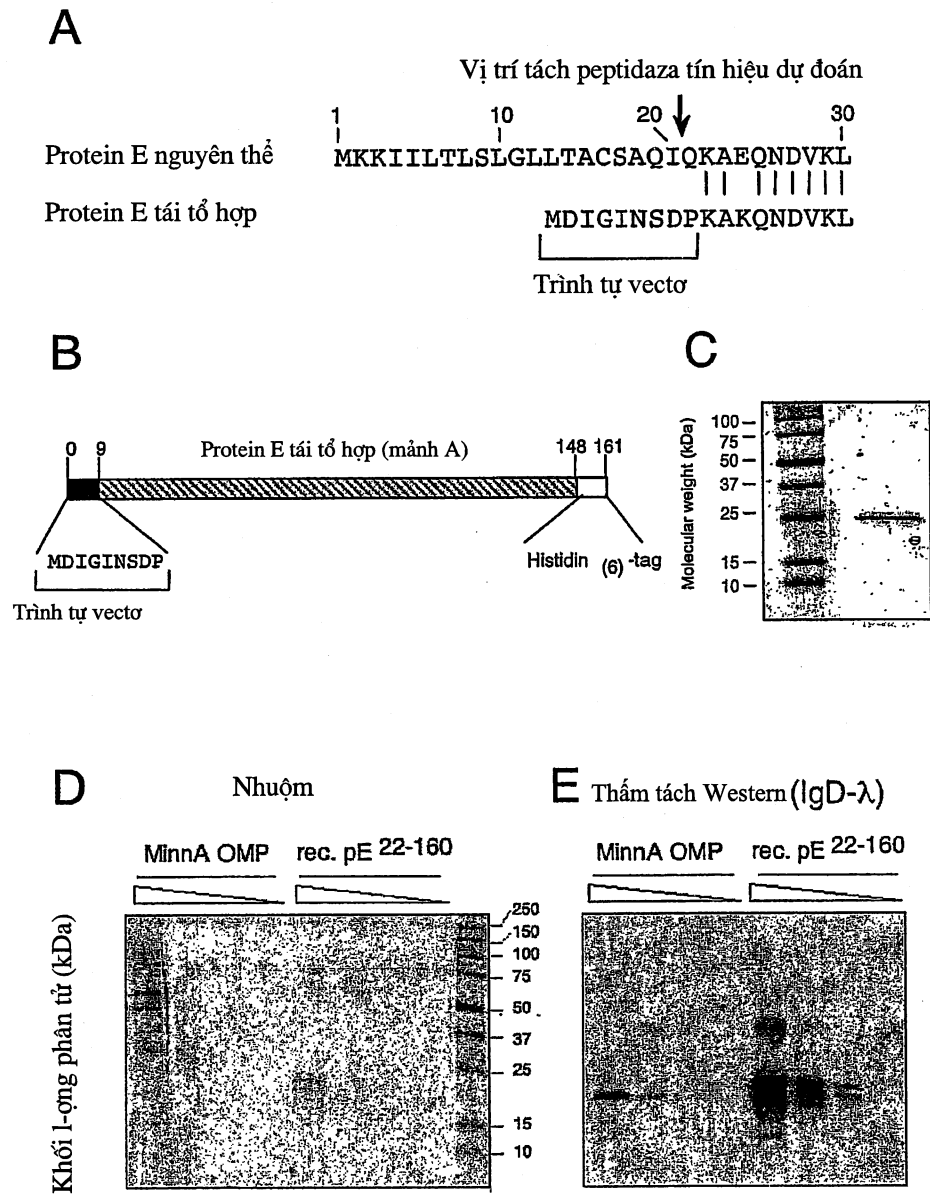


Fig. 5



Vị trí tách peptidaza tín hiệu

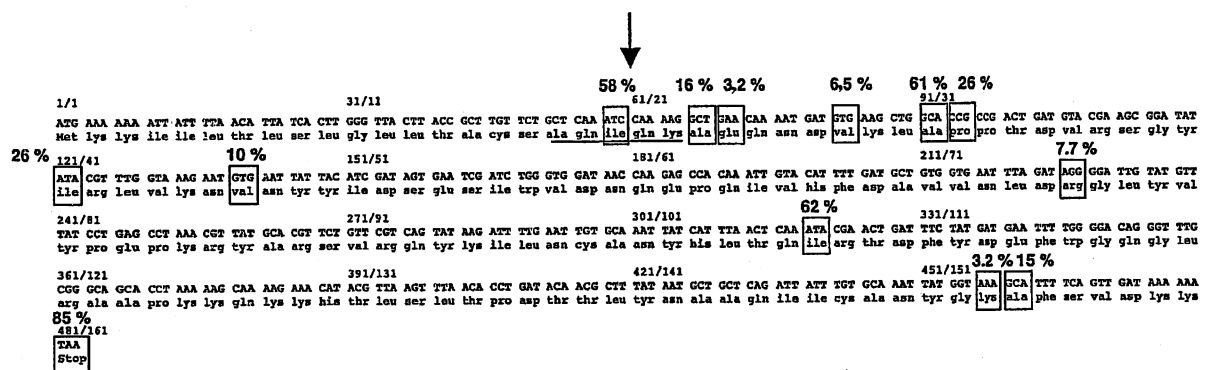


Fig. 7

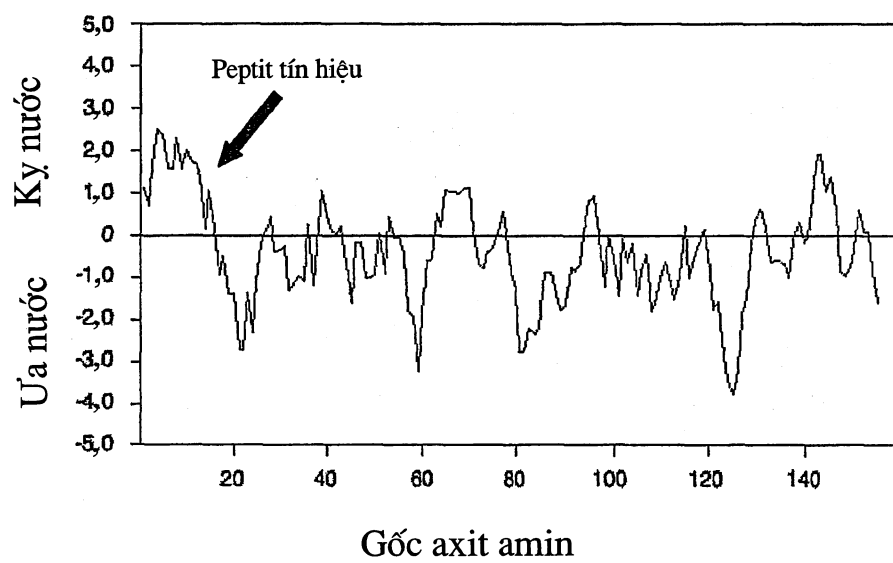
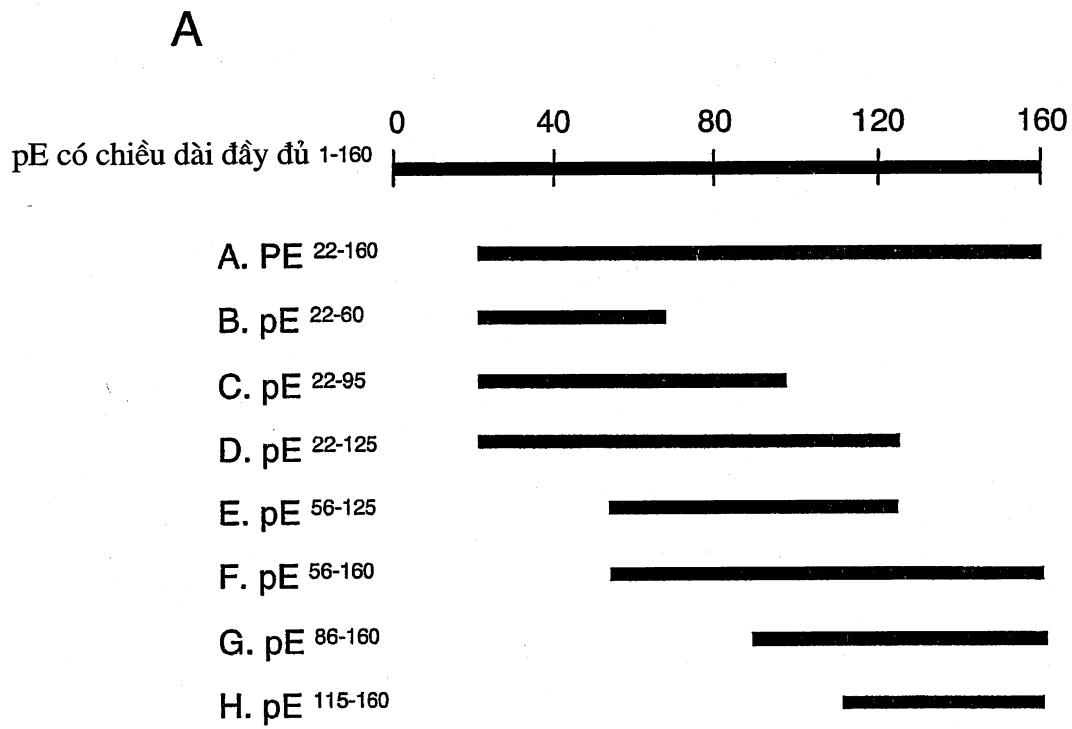
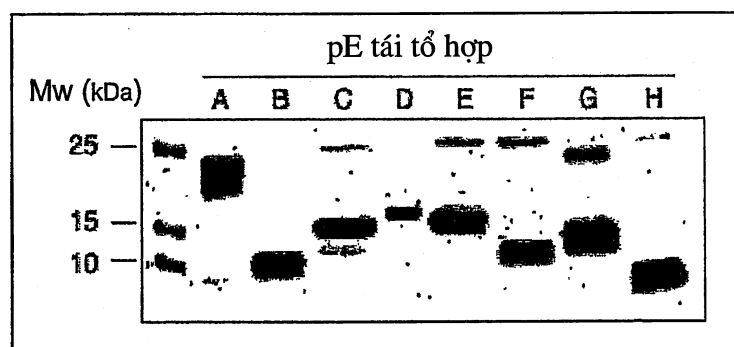


Fig. 8

**B**

9/11

Fig. 9

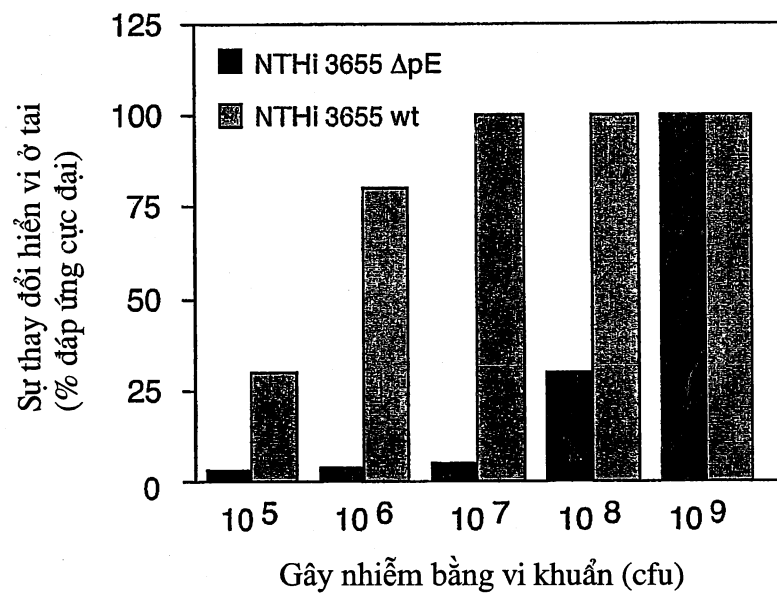


Fig. 10

