



(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) 
1-0021238

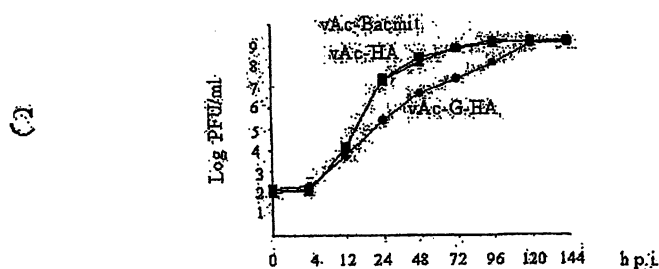
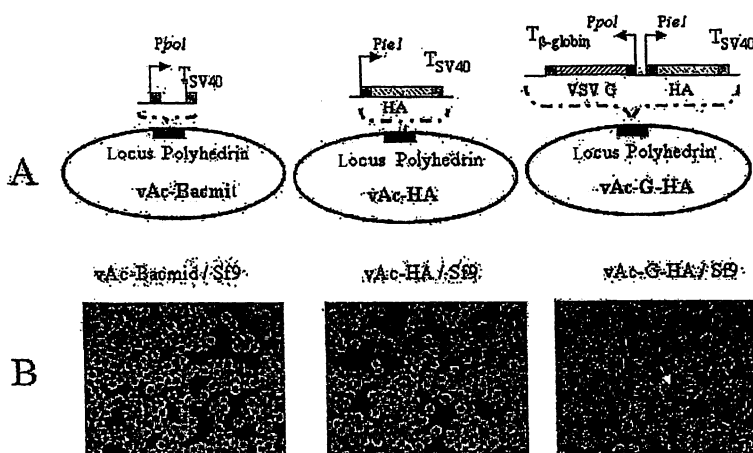
(51)⁷ **C12N 15/866, A61K 39/145, 48/00, C12N 5/10, A61P 31/12, 31/16, 37/02, C12N 15/85**

(13) **B**

- (21) 1-2011-01154 (22) 05.05.2006
(62) 1-2008-02897
(86) PCT/SG2006/000117 05.05.2006 (87) WO2007/129984 15.11.2007
(45) 25.07.2019 376 (43) 25.09.2011 282
(73) Temasek Life Sciences Laboratory Limited (SG)
1 Research Link, National University of Singapore, Singapore 117604, Singapore
(72) KWANG, Jimmy (SG), LU, Li Qun (CN)
(74) Công ty TNHH Tâm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) **VACXIN DÙNG ĐỂ ĐIỀU TRỊ HOẶC PHÒNG BỆNH LIÊN QUAN ĐẾN VIRUT CÚM GIA CẦM, CHẾ PHẨM VÀ KIT CHỨA VACXIN NÀY**

(57) Sáng chế đề cập đến vaccin để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh ở đối tượng, trong đó bệnh này có liên quan đến virut cúm gia cầm, và trong đó vaccin này có chứa vật truyền biểu hiện chứa axit nucleic mã hoá cho peptit ngưng kết tổ hồng cầu, sao cho khi sử dụng, peptit ngưng kết tổ hồng cầu này được biểu hiện bởi vật truyền biểu hiện nêu trên ở đối tượng. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến chế phẩm và kit chứa vaccin này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập tới hệ biểu hiện trên bề mặt phân tử sinh học, có ứng dụng cụ thể để biểu thị glycoprotein màng làm vaccin. Cụ thể, sáng chế đề cập đến phương pháp, vaccin, chế phẩm miễn dịch và kit dùng để điều trị và/hoặc phòng bệnh cúm gia cầm, và đề cập tới các phương pháp liên quan đến việc điều biến đáp ứng miễn dịch đối với virus cúm gia cầm. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến phương pháp, vaccin, chế phẩm miễn dịch và kit dùng để điều trị và/hoặc ngăn ngừa virus cúm gia cầm chủng H5N1, và đề cập tới phương pháp có liên quan đến việc điều biến đáp ứng miễn dịch đối với virus cúm gia cầm chủng H5N1.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh nhiễm virus cúm gia cầm là bệnh lây nhiễm quan trọng trên phạm vi toàn thế giới của các loài chim do chủng typ A của virus cúm gây ra. Tất cả các loài chim được cho là nhạy với bệnh này, có thể có các triệu chứng thay đổi từ ốm nhẹ đến mức độ lây nhiễm cao và sinh bệnh gây chết nhanh chóng, dẫn đến dịch bệnh nghiêm trọng.

Đã biết mười lăm kiểu phụ của virus cúm gây bệnh cho các loài chim, từ đó tạo ra số lượng lớn virus cúm trong các quần thể chim. Cụ thể, do chim di trú có tính kháng tự nhiên dễ bị lây nhiễm, chúng tạo ra vật truyền hiệu nghiệm để lây nhiễm cho quần thể chim khác như gia cầm, là nhóm động vật đặc biệt nhạy với dịch bệnh cúm gây chết nhanh. Tất cả sự bùng phát của dạng gây bệnh cao là do virus cúm A thuộc kiểu phụ H5 và H7 gây ra.

Việc cách ly khu vực lây nhiễm và tiêu diệt nhóm tiếp xúc với virus hoặc bị lây nhiễm virus là các phương pháp chuẩn nhằm ngăn ngừa sự lây lan của virus cúm gia cầm. Tuy nhiên, các biện pháp này không chỉ bị cản trở bởi sự lây lan cao, dễ lan truyền và sự ổn định trong thời gian dài của virus bên ngoài vật chủ tự nhiên của chúng, mà còn gây thiệt hại nặng nề về mặt kinh tế cả trong việc thực thi các biện pháp này lẫn trong việc tiêu diệt các loài chim.

Vào năm 1997 ở Hồng Kông, chủng H5N1 của virus cúm gia cầm truyền trực tiếp từ chim sang người, gây ra bệnh hô hấp trầm trọng ở 18 người, trong số đó 6 người đã chết. Sự lây nhiễm xảy ra cùng lúc với dịch bệnh ở quần thể gia cầm ở Hồng Kông của virus cúm gia cầm do cùng một chủng gây ra. Sự bùng phát tiếp theo vào năm 2003 gây ra 2 ca bệnh và 1 người chết. Các ca lây nhiễm virus cúm gia cầm khác ở người đã được ghi nhận ở một số nước bao gồm Hà Lan, Việt Nam và Trung Quốc. Ngoài ra, sự bùng phát gần đây hơn ở chim bị nhiễm chủng H5N1 đã được chỉ báo ở Đông Âu và cụ thể là Thổ Nhĩ Kỳ.

H5N1 được đặc biệt quan tâm vì nó đột biến nhanh và rất giỏi trong việc lấy các gen từ virus lây nhiễm chuyển vào các loài động vật khác. Ngoài ra, các thể phân lập được từ H5N1 có khả năng gây bệnh cao và có thể gây ra bệnh trầm trọng ở người. Chim bị lây nhiễm mà vẫn sống sót được sẽ thải virus trong ít nhất 10 ngày, cả qua đường miệng và trong phân, do đó dễ dàng phân tán virus rộng hơn trong các loài gia cầm sống và chim di trú.

Dữ liệu về sự tiến triển lâm sàng của sự lây nhiễm virus cúm gia cầm H5N1 ở người rất hạn chế và chỉ một vài loại thuốc trong số các thuốc kháng virus mà có thể được sử dụng trong cả việc điều trị và phòng bệnh cũng có hạn.

Sáng chế dựa trên sự phát triển của hệ biểu hiện bề mặt phân tử sinh học, có ứng dụng cụ thể của hệ này để biểu hiện glycoprotein màng làm vaccin. Cụ thể, sáng chế đề cập đến phương pháp, vaccin, chế phẩm miễn dịch và kit dùng để điều trị và/hoặc phòng bệnh cúm gia cầm, và đề cập đến phương pháp có liên quan đến việc điều biến đáp ứng miễn dịch đối với virus cúm gia cầm.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất phương pháp để trình diện hoặc biểu hiện polypeptit, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

(a) xen axit nucleic mã hoá cho polypeptit vào vật truyền biểu hiện baculovirut, trong đó vật truyền biểu hiện baculovirut này chứa gen khởi đầu *ie1* từ virut gây hội chứng đốm trắng;

(b) chuyển nhiễm vật truyền biểu hiện nêu trên vào ít nhất một tế bào chủ; và

(c) biểu hiện polypeptit từ vật truyền biểu hiện nêu trên

trong đó polypeptit được trình diện hoặc được biểu hiện trên màng bề mặt của baculovirut.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề xuất hệ để trình diện hoặc biểu hiện polypeptit, trong đó hệ này chứa:

(a) axit nucleic mã hoá cho polypeptit được xen vào vật truyền biểu hiện baculovirut, trong đó vật truyền biểu hiện baculovirut này chứa gen khởi đầu *ie1* từ virut gây hội chứng đốm trắng;

(b) phương tiện để chuyển nhiễm vật truyền biểu hiện nêu trên vào ít nhất một tế bào chủ; và

(c) phương tiện để biểu hiện polypeptit từ vật truyền biểu hiện nêu trên

trong đó polypeptit được trình diện hoặc được biểu hiện trên màng bề mặt của baculovirut.

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề xuất vaccin để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh ở đối tượng, trong đó bệnh này liên quan đến virut cúm gia cầm, và trong đó vaccin này chứa vật truyền biểu hiện chứa axit nucleic mã hoá peptit ngưng kết tổ

hồng cầu, sao cho khi sử dụng, peptit ngưng kết tố hồng cầu này được biểu hiện bởi vật truyền biểu hiện nêu trên ở đối tượng.

Đối tượng có thể là người, chim hoặc lợn.

Virut cúm gia cầm có thể là kiểu phụ H5N1 của virut cúm gia cầm.

Vật truyền biểu hiện có thể bao gồm vật truyền biểu hiện baculovirut. Vật truyền biểu hiện baculovirut có thể được tạo kiểu giả với glycoprotein của virut gây viêm miệng phỏng rộp.

Vật truyền biểu hiện có thể còn có chứa gen khởi đầu. Gen khởi đầu này có thể bao gồm gen khởi đầu *ie1* từ virut gây hội chứng đốm trắng. Gen khởi đầu có thể được liên kết có điều khiển với axit nucleic mã hoá cho peptit kháng nguyên.

Peptit ngưng kết tố hồng cầu có thể bao gồm trình tự axit amin có nguồn gốc từ kiểu phụ H5N1 của virut cúm gia cầm.

Theo khía cạnh thứ tư, sáng chế đề xuất vacxin để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh ở đối tượng, trong đó bệnh này liên quan đến virut cúm gia cầm, và trong đó vacxin này chứa vật truyền biểu hiện chứa:

(a) axit nucleic mã hoá peptit ngưng kết tố hồng cầu; và

(b) gen khởi đầu *ie1* từ virut gây hội chứng đốm trắng được liên kết có điều khiển với axit nucleic mã hoá cho peptit ngưng kết tố hồng cầu

sao cho khi sử dụng, peptit ngưng kết tố hồng cầu này được biểu hiện bởi vật truyền biểu hiện nêu trên ở đối tượng.

Theo khía cạnh thứ năm, sáng chế đề xuất vật truyền biểu hiện, trong đó vật truyền biểu hiện này chứa:

(a) axit nucleic mã hoá peptit kháng nguyên; và

(b) gen khởi đầu *iel* từ virus gây hội chứng đốm trắng được liên kết có điều khiển với axit nucleic mã hoá cho peptit kháng nguyên

trong đó peptit kháng nguyên này bao gồm peptit ngưng kết tổ hồng cầu chứa trình tự axit amin có nguồn gốc từ kiểu phụ H5N1 của virus cúm gia cầm.

Theo khía cạnh thứ sáu, sáng chế đề xuất vật truyền biểu hiện theo khía cạnh thứ năm để sử dụng trong việc điều trị hoặc phòng ngừa bệnh ở đối tượng, trong đó bệnh này liên quan đến virus cúm gia cầm, sao cho khi sử dụng, peptit kháng nguyên này được biểu hiện bởi vật truyền biểu hiện nêu trên ở đối tượng.

Theo khía cạnh thứ bảy, sáng chế đề xuất tế bào chủ chứa vật truyền biểu hiện theo khía cạnh thứ năm hoặc thứ sáu.

Theo khía cạnh thứ tám, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa chất có tiềm năng gây miễn dịch được chọn từ nhóm gồm vacxin theo khía cạnh thứ ba hoặc thứ tư, vật truyền biểu hiện theo khía cạnh thứ năm hoặc thứ sáu hoặc tế bào chủ theo khía cạnh thứ bảy, cùng với chất mang được dùng, chất pha loãng hoặc tá dược.

Chế phẩm này có thể tùy ý chứa chất phụ trợ.

Theo khía cạnh thứ chín, sáng chế đề xuất vacxin chứa vật truyền biểu hiện theo khía cạnh thứ năm hoặc thứ sáu, tế bào chủ theo khía cạnh thứ bảy hoặc chế phẩm theo khía cạnh thứ tám để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh ở đối tượng, trong đó bệnh này có liên quan đến virus cúm gia cầm.

Theo khía cạnh thứ mười, sáng chế đề xuất phương pháp để điều biến đáp ứng miễn dịch, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho đối tượng sử dụng lượng hữu hiệu của chất có tiềm năng gây miễn dịch được chọn từ nhóm bao gồm vacxin theo khía cạnh thứ ba, thứ tư hoặc thứ chín, vật truyền biểu hiện theo khía cạnh thứ năm hoặc thứ sáu, tế bào chủ theo khía cạnh thứ bảy hoặc chế phẩm theo khía cạnh thứ tám.

Theo khía cạnh thứ mười một, sáng chế đề xuất phương pháp để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh liên quan đến virus cúm gia cầm, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho đối tượng sử dụng lượng hữu hiệu của chất có tiềm năng gây miễn dịch được chọn từ nhóm bao gồm vacxin theo khía cạnh thứ ba, thứ tư hoặc thứ chín, vật truyền biểu hiện theo khía cạnh thứ năm hoặc thứ sáu, tế bào chủ theo khía cạnh thứ bảy hoặc chế phẩm theo khía cạnh thứ tám.

Theo khía cạnh thứ mười hai, sáng chế đề xuất việc sử dụng vacxin theo khía cạnh thứ ba, thứ tư hoặc thứ chín, vật truyền biểu hiện theo khía cạnh thứ năm hoặc thứ sáu, tế bào chủ theo khía cạnh thứ bảy hoặc chế phẩm theo khía cạnh thứ tám để điều biến đáp ứng miễn dịch.

Theo khía cạnh thứ mười ba, sáng chế đề xuất việc sử dụng vacxin theo khía cạnh thứ ba, thứ tư hoặc thứ chín, vật truyền biểu hiện theo khía cạnh thứ năm hoặc thứ sáu, tế bào chủ theo khía cạnh thứ bảy hoặc chế phẩm theo khía cạnh thứ tám để sản xuất thuốc để điều trị bệnh liên quan đến virus cúm gia cầm.

Theo khía cạnh thứ mười bốn, sáng chế đề xuất kit để sử dụng trong việc điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh ở đối tượng, trong đó bệnh này liên quan đến virus cúm gia cầm, và trong đó kit này chứa vacxin theo khía cạnh thứ ba, thứ tư hoặc thứ chín, vật truyền biểu hiện theo khía cạnh thứ năm hoặc thứ sáu, tế bào chủ theo khía cạnh thứ bảy hoặc chế phẩm theo khía cạnh thứ tám.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Sáng chế sẽ được mô tả, chỉ để làm ví dụ, có dựa vào các hình vẽ sau.

Fig.1. thể hiện sự tạo cấu trúc và sản xuất baculovirus tái tổ hợp. (A) Hình vẽ dạng sơ đồ thể hiện hệ gen của vAc-Bacmit, vAc-HA, và vAc-G-HA. Catxet biểu hiện VSV G hoặc HA mong muốn được xen vào locus polyhedrin thông qua sự chuyển đặc hiệu vị trí bằng cách sử dụng hệ Bac-sang-Bac. (B) Hình vẽ thể hiện sự hình thành thể hợp bào trong các tế bào Sf9 được lây nhiễm bằng vAc-G-HA được biểu thị bằng mũi tên màu trắng. Hình ảnh được chụp vào 72 giờ sau khi

truyền. (C) Hình vẽ đường cong sinh trưởng một bước. Mỗi điểm số liệu thể hiện trị số trung bình ở ba cá thể lây nhiễm. Các tế bào Sf9 được lây nhiễm bằng virut riêng lẻ có MOI bằng 0,5.

Fig.2. Hình vẽ thể hiện đặc điểm của HA được biểu hiện trên bề mặt của vật truyền baculovirut. (A) Hình vẽ thể hiện sự liên kết màng của HA trong các hạt vAc-HA và vAc-G-HA đã được tinh sạch. Các virion H5N1 đã được tinh sạch đóng vai trò làm mẫu đối chứng dương tính. Dải 1, các virion vAc-Bacmit đã được tinh sạch làm mẫu đối chứng âm tính; dải 2, nucleocapsit đã được tinh sạch từ các virion vAc-G-HA được xử lý bằng Triton X-100; dải 3, các virion vAc-G-HA hoàn thiện; dải 4, tổng các chiết phẩm tế bào thu được từ các tế bào Sf9 được lây nhiễm bằng vAc-G-HA; dải 5, tổng các chiết phẩm tế bào thu được từ các tế bào Sf9 được lây nhiễm bằng vAc-G-HA; dải 6, các virion vAc-HA hoàn chỉnh; dải 7, nucleocapsit đã được tinh sạch từ các virion vAc-HA được xử lý bằng Triton X-100. (B) Hình vẽ thể hiện sự liên kết màng của VSV G ở các hạt vAc-G-HA đã được tinh sạch. Các dải từ 1 đến 4 là các mẫu giống như trong phần (A). (C) Hình vẽ thể hiện hoạt tính ngưng kết hồng cầu của baculovirut biểu hiện HA. Độ chuẩn ngưng kết hồng cầu được xác định bằng cách sử dụng dung dịch pha loãng hai bậc chứa các hạt vAc-G-HA đã được tinh sạch và huyền phù chứa 0,5% hồng cầu gà trong giếng thử nghiệm với độ pha loãng bắt đầu là 1:2.

Fig.3(A) và Fig.3(B) thể hiện sự tải nạp gen HA bằng vAc-G-HA. Các tế bào MDCK hoặc Df-1 được tải nạp bằng vAc-G-HA có MOI bằng 100. 16 giờ sau, các tế bào được cố định để thử nghiệm IFA hoặc được thu để phân tích thẩm tách Western. (A) Hình vẽ ảnh hiển vi huỳnh quang của các tế bào động vật có vú đã được tải nạp trong thử nghiệm IFA với kháng thể đơn dòng đặc hiệu HA1. Các mũi tên biểu thị các tế bào huỳnh quang dương tính. Tín hiệu huỳnh quang được phát hiện bằng cách sử dụng kính hiển vi huỳnh quang ngược và hình ảnh bắt được bằng hệ hiện ảnh số. (B) Hình vẽ thể hiện sự phát hiện HA trong cả hai tế bào đã được tải nạp thông qua thử nghiệm thẩm tách Western với huyết thanh kháng HA1. Dải 1, các chiết phẩm tế bào MDCK; dải 2, các chiết phẩm tế bào Df-1; dải 3, các

virion H5N1 đã được tinh sạch làm mẫu đối chứng dương tính. (C) Định lượng phân tử HA được biểu thị trên các virion vAc-G-HA thông qua ELISA bắt giữ kháng nguyên. IgG đã được tinh sạch thu được từ chuột lang và kháng thể đơn dòng lần lượt được dùng làm chất dò và kháng thể bắt giữ trong thử nghiệm. Protein HA1 được pha loãng theo dung dịch 10 bậc được sử dụng để xây dựng đường cong định lượng chuẩn như được thể hiện.

Fig.4.(A) thể hiện phân tích tính chất kháng nguyên của vAc-G-HA. Nhóm gồm 5 chuột nhắt (M1- M5) được tiêm vào trong cơ các hạt vAc-G-HA. Hai chuột nhắt đối chứng (C1 và C2) được tiêm lượng như nhau virion vAc-Bacmit đã được tinh sạch. Kháng thể đã được tạo ra được kiểm tra bằng ELISA với protein HA1 được phủ làm kháng nguyên bắt giữ. Kết quả được biểu thị dưới dạng hệ số hấp phụ trung bình của huyết thanh được pha loãng 1:10. (B) Độ chuẩn HI huyết thanh đối với chuột nhắt được gây miễn dịch bằng vAc-G-HA. Độ chuẩn HI được biểu thị làm điểm kết thúc trong dung dịch pha loãng hai bậc của huyết thanh.

Fig.5.(A) hình vẽ thể hiện sự phân tích tính chất kháng nguyên của baculovirut biểu hiện HA. Ba nhóm chuột nhắt, mỗi nhóm gồm 5 con, được tiêm vào trong cơ vAc-G-HA, vAc-HA, H5N1/PR8 đã được làm bất hoạt, và vAc-Bacmit một cách độc lập. Mẫu huyết thanh thu được từ mỗi nhóm được thử nghiệm bằng ELISA với protein HA1 đã được tinh sạch được phủ làm kháng nguyên bắt giữ. Kết quả được biểu thị dưới dạng hệ số hấp phụ trung bình của huyết thanh được pha loãng 1:10. (B) Thử nghiệm HI và thử nghiệm trung hoà đối với mẫu huyết thanh thu được từ chuột nhắt đã được gây miễn dịch. Độ chuẩn HI được biểu thị làm điểm kết thúc trong dãy pha loãng hai bậc của huyết thanh. Trong thử nghiệm trung hoà, dãy pha loãng hai bậc từ 10 đến 640 được trộn với lượng như nhau của dịch pha loãng virut chứa virut cúm với số lượng 2×10^3 TCID₅₀/ml. Kiểm tra sự có mặt của protein virut bằng thử nghiệm IFA với kháng thể đa dòng kháng HA1. Độ chuẩn trung hoà được biểu thị làm điểm kết thúc trong dung dịch pha loãng theo bậc.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các định nghĩa

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "chứa" nghĩa là "về nguyên tắc bao gồm, nhưng không nhất thiết". Hơn thế nữa, các dạng thay đổi của từ "chứa", như "gồm" và "bao gồm", có ý nghĩa thay đổi tương ứng.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "điều trị" và "việc điều trị" được dùng để chỉ việc sử dụng bất kỳ và tất cả các sử dụng để điều trị các tình trạng bệnh lý hoặc các triệu chứng, ngăn chặn sự hình thành tình trạng bệnh lý hoặc bệnh, hoặc mặt khác ngăn chặn, cản trở, làm chậm, làm giảm hoặc làm thuyên giảm tình trạng bệnh lý hoặc bệnh hoặc các triệu chứng không mong muốn khác theo cách bất kỳ.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "lượng hữu hiệu" có nghĩa là lượng không gây độc nhưng đủ của chất hoặc hợp chất để mang lại hiệu quả mong muốn. Lượng chính xác hầu như sẽ thay đổi tùy theo đối tượng phụ thuộc vào các yếu tố như loài được điều trị, tuổi và tình trạng bệnh lý chung của đối tượng, mức độ nghiêm trọng của tình trạng bệnh lý được điều trị, chất cụ thể được sử dụng và phương cách sử dụng v.v.. Do đó, không thể xác định chính xác "lượng hữu hiệu". Tuy nhiên, trong trường hợp cụ thể, "lượng hữu hiệu" thích hợp có thể được xác định bởi chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này chỉ bằng cách sử dụng thử nghiệm thông thường.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "polypeptit", "peptit" và "protein" được sử dụng thay đổi lẫn nhau để chỉ polyme của các gốc axit amin và chỉ các mảnh, các biến thể, thể tương tự, thể tương đương hoặc thể tương đồng của chúng. Do đó, các thuật ngữ này được dùng cho cả polyme của axit amin, trong đó một hoặc nhiều gốc axit amin là axit amin tổng hợp không có trong tự nhiên, như dạng tương tự hoá học của axit amin tương ứng có trong tự nhiên, cũng như polyme của axit amin có trong tự nhiên.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "polynucleotit" hoặc "axit nucleic" được sử dụng thay đổi lẫn nhau và chỉ phân tử chứa một hoặc nhiều nucleotit, hoặc

oligonucleotit, hoặc mảnh của chúng, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, nucleotit ARN hoặc ADN hoặc dạng kết hợp của chúng.

Trong bản mô tả này, cũng nằm trong phạm vi ý nghĩa của các thuật ngữ "protein", "polypeptit", "peptit", "polynucleotit" và "axit nucleic" là các mảnh và các biến thể của chúng, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, các dạng ngược và đối nghĩa của polynucleotit và axit nucleic.

Thuật ngữ "mảnh" được dùng để chỉ trình tự polynucleotit hoặc polypeptit mã hoá cho thành phần hoặc là thành phần của protein có chiều dài đầy đủ hoặc gen. Đối với polypeptit, mảnh này có thể có hoạt tính sinh học định tính chung với protein có chiều dài đầy đủ.

Thuật ngữ "biến thể" trong bản mô tả này được dùng để chỉ trình tự hầu như tương tự. Nhìn chung, các biến thể trình tự axit nucleic có thể mã hóa các polypeptit mà có hoạt tính sinh học định tính chung. Nhìn chung, các biến thể trình tự polypeptit có thể còn có hoạt tính sinh học định tính chung. Hơn nữa, các biến thể trình tự polypeptit này có thể có độ tương đồng về trình tự ít nhất bằng 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99%.

Hơn nữa, biến thể polypeptit có thể bao gồm thể tương tự, trong đó thuật ngữ "thể tương tự" được dùng để chỉ polypeptit là dẫn xuất của các polypeptit đã được biểu thị, mà việc tạo dẫn xuất bao gồm việc thêm, làm mất hoặc thay thế một hoặc nhiều axit amin, sao cho polypeptit vẫn có chức năng hầu như giống như polypeptit nguyên thể mà từ đó nó được tạo ra.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "vật truyền biểu hiện" được dùng để chỉ axit nucleic có khả năng mang lại sự biểu hiện của mảnh axit nucleic mà nó được liên kết linh hoạt, trong hệ biểu hiện tế bào hoặc không phải tế bào. Trong phạm vi của sáng chế, cần phải hiểu rằng vật truyền biểu hiện chứa gen khởi đầu như được xác định ở đây có thể là plasmit, thể thực khuẩn, phagomit, cosmit, hệ gen phụ virus

hoặc mảnh hệ gen, hoặc axit nucleic khác có khả năng duy trì và hoặc sao chép ADN khác loài ở dạng có thể biểu hiện cần được đưa vào trong tế bào.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "được liên kết linh hoạt" được dùng để chỉ polynucleotit điều hoà phiên mã và dịch mã được định vị so với polynucleotit mã hoá polypeptit theo cách sao cho polynucleotit được phiên mã và polypeptit được dịch mã.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "gen khởi đầu" bao gồm trình tự điều hoà phiên mã của gen của hệ gen, bao gồm hộp TATA hoặc yếu tố khởi đầu, có thể là cần thiết để khởi đầu sự phiên mã chính xác, cùng với hoặc không cùng với yếu tố điều hoà bổ sung làm thay đổi sự biểu hiện gen để đáp lại sự kích thích phát triển và/hoặc sự kích thích bên ngoài, hoặc theo cách đặc hiệu mô. Trong bản mô tả này, thuật ngữ "gen khởi đầu" còn được dùng để chỉ phân tử tái tổ hợp, tổng hợp hoặc dung hợp, hoặc dẫn xuất mà mang lại, hoạt hóa hoặc tăng cường sự biểu hiện của phân tử axit nucleic mà được liên kết linh hoạt, và mã hoá peptit.

Trong bản mô tả này, cụm từ "virut cúm gia cầm" bao gồm virut bất kỳ gây hoặc bị nghi là gây bệnh ở đối tượng bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, chim, lợn hoặc người, cụ thể, "virut cúm gia cầm" bao gồm tất cả các typ virut cúm gia cầm, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, typ A, và tất cả các kiểu phụ của virut cúm gia cầm, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, các kiểu phụ H5 (cụ thể là H5N1 và H5N2) và H7 (cụ thể là H7N1).

Trong bản mô tả này, cụm từ "bệnh liên quan đến virut cúm gia cầm" được dùng để chỉ bệnh, tình trạng bệnh lý hoặc rối loạn bất kỳ gây ra bởi hoặc liên quan đến virut cúm gia cầm.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "điều biến" khi liên quan đến đáp ứng miễn dịch được dùng để chỉ sự tăng hoặc giảm, trực tiếp hoặc gián tiếp, đáp ứng miễn dịch chống lại kháng nguyên.

Các tác giả sáng chế đã phát triển hệ biểu hiện trên bề mặt phân tử sinh học, có ứng dụng cụ thể để biểu hiện glycoprotein màng làm vaccin. Cụ thể, các tác giả sáng chế đã chứng minh ứng dụng của hệ biểu hiện baculovirus làm tác nhân gây miễn dịch chống lại virus cúm thông qua sự biểu thị bề mặt đồng vận và việc tải nạp gen protein ngưng kết tổ hồng cầu (HA) của virus. Sự biểu thị có hiệu quả của protein HA màng virus ưu thế miễn dịch trên bề mặt của baculovirus tái tổ hợp, cùng với protein VSV G, mang lại ưu điểm chính trong kế hoạch dùng vaccin kháng virus cúm. Ngoài việc sử dụng hệ biểu hiện baculovirus làm vật truyền vaccin, hệ biểu hiện màng virus có thể còn được dùng để xác định đặc điểm cấu trúc và chức năng của nhiều glycoprotein màng virus.

Dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu *ie1* từ virus gây hội chứng đốm trắng, gen HA của virus cúm H5N1 được biểu hiện một cách hiệu quả ở cả tế bào côn trùng và tế bào động vật có vú bằng cách sử dụng vật truyền baculovirus. Sự biểu hiện đồng thời HA với glycoprotein của virus gây viêm miệng phồng rộp không làm giảm hiệu quả của sự biểu hiện HA trên bề mặt baculovirus. Protein HA bị phân cắt một phần được biểu hiện trên bề mặt của aculovirus, bằng cách đó mang lại hoạt tính ngưng kết hồng cầu của hạt virus. Việc tiêm vào trong cơ của baculovirus đã được tinh sạch biểu hiện HA vào trong chuột nhắt kích thích sự sản xuất kháng thể có hoạt tính ức chế ngưng kết hồng cầu. Do đó, hệ biểu hiện baculovirus này chứa peptit HA có tính kháng nguyên làm protein cấu trúc và duy trì khả năng biểu hiện peptit thông qua việc truyền *in vivo*.

Các phương pháp, kit và hệ để trình diện hoặc biểu hiện phân tử sinh học

Sáng chế đề cập đến hệ biểu hiện trên bề mặt phân tử sinh học, có ứng dụng cụ thể trong việc biểu hiện glycoprotein màng làm vaccin. Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này hiểu rõ sự biểu hiện trên bề mặt phân tử sinh học không bị giới hạn trong các ứng dụng cụ thể được đề cập đến trong bản mô tả này, mà có ứng dụng rộng rãi trong trường hợp bất kỳ mong muốn để trình diện phân tử sinh học, và cụ thể là glycoprotein màng.

Theo một phương án, sáng chế bộc lộ phương pháp, kit và hệ để sản xuất vaccin bao gồm việc biểu hiện trên bề mặt của glycoprotein màng. Các phương pháp, kit và hệ này có thể sử dụng hệ biểu hiện trên bề mặt dựa trên baculovirus được minh họa bằng ví dụ trong bản mô tả này liên quan đến việc sản xuất vaccin kháng virus cúm gia cầm chủng H5N1. Tuy nhiên, chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ nhận ra và hiểu rằng các phương pháp, kit và hệ để sản xuất vaccin bao gồm việc biểu hiện trên bề mặt của glycoprotein màng không bị giới hạn trong việc sản xuất vaccin được bộc lộ ở đây.

Như vậy, sáng chế đề xuất các phương pháp để trình diện hoặc bộc lộ polypeptit, trong đó phương pháp này gồm:

(a) xen axit nucleic mã hoá polypeptit vào vật truyền biểu hiện baculovirus, trong đó vật truyền biểu hiện baculovirus này có chứa gen khởi đầu *ie1* từ virus gây hội chứng đốm trắng;

(b) chuyển nhiễm vật truyền biểu hiện nêu trên vào ít nhất một tế bào chủ; và

(c) biểu hiện polypeptit từ vật truyền biểu hiện nêu trên trong đó polypeptit được trình diện hoặc được biểu hiện trên màng bề mặt của baculovirus.

Sáng chế còn đề xuất hệ để trình diện hoặc bộc lộ polypeptit, trong đó hệ này gồm:

(a) axit nucleic mã hoá cho polypeptit được cài xen vào vật truyền biểu hiện baculovirus, trong đó vật truyền biểu hiện baculovirus này có chứa gen khởi đầu *ie1* từ virus gây hội chứng đốm trắng;

(b) phương tiện để chuyển nhiễm vật truyền biểu hiện nêu trên vào ít nhất một tế bào chủ; và

(c) phương tiện để biểu hiện polypeptit từ vật truyền biểu hiện nêu trên trong đó polypeptit được trình diện hoặc được bộc lộ trên màng bề mặt của baculovirut.

Vacxin

Sáng chế còn đề xuất vacxin để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh ở đối tượng, trong đó bệnh này có liên quan đến virus cúm gia cầm, và trong đó vacxin này chứa vật truyền biểu hiện chứa axit nucleic mã hoá peptit ngưng kết tổ hồng cầu, sao cho khi sử dụng, peptit ngưng kết tổ hồng cầu này được biểu hiện bởi vật truyền biểu hiện nêu trên ở đối tượng.

Đối tượng có thể là người, chim hoặc lợn. Virus cúm gia cầm có thể là kiểu phụ H5N1 của virus cúm gia cầm.

Vật truyền biểu hiện có thể bao gồm vật truyền biểu hiện baculovirut. Vật truyền biểu hiện baculovirut có thể được tạo kiểu giả với glycoprotein của virus gây viêm miệng phỏng rộp.

Vật truyền biểu hiện có thể chứa gen khởi đầu. Gen khởi đầu có thể bao gồm gen khởi đầu *ie1* từ virus gây hội chứng đốm trắng. Gen khởi đầu có thể được liên kết có điều khiển với axit nucleic mã hoá peptit kháng nguyên.

Peptit ngưng kết tổ hồng cầu có thể bao gồm trình tự axit amin có nguồn gốc từ kiểu phụ H5N1 của virus cúm gia cầm.

Sáng chế còn đề xuất vacxin chứa các vật truyền biểu hiện, các tế bào chủ hoặc chế phẩm như được nêu ở đây, để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh ở đối tượng, trong đó bệnh này có liên quan đến virus cúm gia cầm.

Vật truyền biểu hiện và tế bào chủ

Sáng chế còn đề xuất vật truyền biểu hiện chứa axit nucleic mã hoá peptit kháng nguyên, trong đó peptit kháng nguyên này bao gồm peptit ngưng kết tổ hồng cầu chứa trình tự axit amin có nguồn gốc từ kiểu phụ H5N1 của virus cúm gia cầm.

Sáng chế còn đề xuất vật truyền biểu hiện chứa axit nucleic mã hoá cho peptit kháng nguyên, để sử dụng trong việc điều trị hoặc phòng ngừa bệnh ở đối tượng, trong đó bệnh này có liên quan đến virus cúm gia cầm, sao cho khi sử dụng, peptit kháng nguyên này được biểu hiện bởi vật truyền biểu hiện nêu trên ở đối tượng.

Sáng chế còn đề xuất tế bào chủ chứa vật truyền biểu hiện như mô tả ở đây.

Chế phẩm và chất có tiềm năng gây miễn dịch

Sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa chất có tiềm năng gây miễn dịch được chọn từ nhóm bao gồm vaccin, vật truyền biểu hiện hoặc tế bào chủ như được mô tả ở đây, cùng với chất mang được dụng, chất pha loãng hoặc tá dược.

Chất có tiềm năng gây miễn dịch có thể được bào chế thành chế phẩm ở dạng trung tính hoặc dạng muối. Các muối được dụng bao gồm muối cộng axit (được tạo ra với các nhóm amin tự do của peptit) và được tạo ra với axit vô cơ như, ví dụ, axit clohydric hoặc axit phosphoric, hoặc axit hữu cơ như axetic, oxalic, tartaric, maleic, và dạng tương tự. Muối được tạo ra với các nhóm carboxyl tự do có thể còn có nguồn gốc từ bazơ vô cơ như, ví dụ, natri hydroxit, kali hydroxit, amoni hydroxit, canxi hydroxit, hoặc sắt hydroxit, và bazơ hữu cơ như isopropylamin, trimetylamin, 2-ethylamino etanol, histidin, procain, và dạng tương tự.

Thông thường, chế phẩm thích hợp có thể được bào chế theo các phương pháp đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể bao gồm chất pha loãng được dụng, chất phụ trợ và/hoặc tá dược. Chất pha loãng, chất phụ trợ và tá dược phải “chấp nhận được” với nghĩa là tương thích với các thành phần khác của chế phẩm, và không có hại đối với người nhận chúng.

Ví dụ về chất pha loãng được dụng là nước được khử khoáng hoặc được chưng cất; dung dịch nước muối; dầu thực vật như dầu đậu, dầu rum khô, dầu oliu, dầu hạt bông, dầu ngô, dầu vừng, dầu lạc hoặc dầu dừa; các chất dầu silicon, bao gồm polysiloxan, như metyl polysiloxan, phenyl polysiloxan và metylphenyl

polysolpoxan; các silicon dễ bay hơi; dầu khoáng như parafin lỏng, parafin nhẹ hoặc squalan; dẫn xuất xenluloza như metyl xenluloza, etyl xenluloza, carboxymetylxenluloza, natri carboxymetylxenluloza hoặc hydroxypropylmetylxenluloza; alkanol bậc thấp, ví dụ etanol hoặc iso-propanol; aralkanol bậc thấp; polyalkylen glycol bậc thấp hoặc alkylen glycol bậc thấp, ví dụ polyetylen glycol, polypropylen glycol, etylen glycol, propylen glycol, 1,3- butylen glycol hoặc glycerin; este axit béo như isopropyl palmitat, isopropyl myristat hoặc etyl oleat; polyvinylpyrrolidon; aga; carrageenan; gôm tragacan hoặc gôm acacia, và thạch dầu mỏ. Thông thường, chất mang hoặc các chất mang sẽ tạo thành từ 1% đến 99,9% khối lượng của chế phẩm. Tốt nhất là, chất pha loãng là nước muối.

Để dùng làm dung dịch hoặc huyền phù tiêm được, chất pha loãng hoặc các chất mang chấp nhận được ngoài đường tiêu hoá không độc có thể bao gồm, dung dịch Ringer, triglycerit mạch trung bình (MCT), nước muối đẳng trương, nước muối đệm phosphat, etanol và 1,2 propylen glycol.

Một số ví dụ về các chất mang, chất pha loãng, tá dược và chất phụ trợ thích hợp để sử dụng qua đường miệng bao gồm dầu lạc, parafin lỏng, natri carboxymetylxenluloza, metyloxenluloza, natri alginat, gôm acacia, gôm tragacan, dextroza, sucroza, sorbitol, mannitol, gelatin và lexitin. Ngoài ra, các chế phẩm dùng qua đường miệng này có thể chứa các chất tạo mùi và tạo màu thích hợp. Khi sử dụng ở dạng viên nang, viên nang có thể được phủ bằng các hợp chất như glyxeryl monostearat hoặc glyxeryl distearat làm chậm sự phân huỷ.

Chất phụ trợ thông thường bao gồm chất làm mềm, chất nhũ tương, chất làm đặc, chất bảo quản, chất diệt khuẩn và chất đệm.

Các dạng rắn để sử dụng qua đường miệng có thể có chứa chất kết dính chấp nhận được trong thực tiễn dược học ở người và thú y, chất làm ngọt, chất phân rã, chất pha loãng, hương liệu, chất bao phủ, chất bảo quản, chất bôi trơn và/hoặc chất làm chậm thời gian. Các chất kết dính thích hợp bao gồm gôm acacia, gelatin, tinh bột ngô, gôm tragacan, natri alginat, carboxymetylxenluloza hoặc polyetylen

glycol. Các chất làm ngọt thích hợp bao gồm sucroza, lactoza, glucoza, aspartam hoặc saccarin. Các chất phân rã thích hợp bao gồm tinh bột ngô, metylxenluloza, polyvinylpyrrolidon, gồm guar, gồm xanthan, bentonit, axit alginic hoặc aga. Các chất pha loãng thích hợp bao gồm lactoza, sorbitol, mannitol, đextroza, cao lạnh, xenluloza, canxi cacbonat, canxi silicat hoặc đicacxi phosphat. Các hương liệu thích hợp bao gồm dầu bạc hà, dầu metyl salixylat, dầu của cây anh đào, cam hoặc hương liệu của cây mâm xôi. Các chất bao phủ thích hợp bao gồm polyme hoặc các copolyme của axit acrylic và/hoặc axit metacrylic và/hoặc este của chúng, sáp, rượu béo, zein, senlac hoặc gluten. Các chất bảo quản thích hợp bao gồm natri benzoat, vitamin E₅ alpha-tocopherol, axit ascorbic, metyl paraben, propyl paraben hoặc natri bisulphit. Các chất bôi trơn thích hợp bao gồm magie stearat, axit stearic, natri oleat, natri clorua hoặc đá talc.

Các dạng lỏng để sử dụng qua đường miệng có thể có chứa, ngoài các chất nêu trên, chất mang lỏng. Các chất mang lỏng thích hợp bao gồm nước, các chất dầu như dầu oliu, dầu đậu, dầu vừng, dầu hướng dương, dầu rum khô, dầu lạc, dầu dừa, parafin lỏng, etylen glycol, propylen glycol, polyetylen glycol, etanol, propanol, isopropanol, glyxerol, rượu béo, triglyxerit hoặc hỗn hợp của chúng.

Huyền phù để sử dụng qua đường miệng có thể còn bao gồm chất phân tán và/hoặc chất tạo huyền phù. Các chất tạo huyền phù thích hợp bao gồm natri carboxymetylxenluloza, metylxenluloza, hydroxypropylmetyl-xenluloza, polyvinyl-pyrrolidon, natri alginat hoặc rượu axetylic. Các chất phân tán thích hợp bao gồm lexitin, polyoxyetylen este của axit béo như axit stearic, polyoxyetylen sorbitol mono- hoặc di-oleat, -stearat hoặc -laurat, polyoxyetylen sorbitan mono- hoặc di-oleat, -stearat hoặc -laurat và dạng tương tự. Các nhũ tương để sử dụng qua đường miệng có thể còn gồm một hoặc nhiều chất tạo nhũ tương. Các chất tạo nhũ tương thích hợp bao gồm chất phân tán như đã lấy ví dụ ở trên hoặc các gồm tự nhiên như gồm guar gồm acacia hoặc gồm tragacan.

Các phương pháp điều chế chế phẩm dùng ngoài đường tiêu hoá là đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này, và được mô tả chi tiết hơn trong các tài liệu, ví dụ, Remington's Pharmaceutical Science, 15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa..

Chế phẩm có thể kết hợp với chất hoạt động bề mặt thích hợp bất kỳ như chất hoạt động bề mặt anion, cation hoặc không tích điện như este sorbitan hoặc các dẫn xuất polyoxyetylen của chúng. Chế phẩm cũng có thể bao gồm các chất tạo huyền phù như gôm tự nhiên, các dẫn xuất xenluloza hoặc vật liệu vô cơ như silic oxit silic, và các thành phần khác như lanolin.

Một hoặc nhiều chất có tiềm năng gây miễn dịch có thể được sử dụng làm hoạt chất trong việc điều chế chế phẩm có tiềm năng miễn dịch. Việc điều chế này sử dụng các phương pháp thông thường đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này. Thông thường, chế phẩm này được điều chế làm dung dịch hoặc huyền phù lỏng có thể tiêm được; các dạng rắn phù hợp với dung dịch, hoặc huyền phù, ở dạng lỏng trước khi tiêm cũng có thể được điều chế. Chế phẩm có thể còn được tạo nhũ tương. Các thành phần gây miễn dịch có hoạt tính thường được trộn với tá dược được dùng và tương thích với thành phần hoạt tính.

Các đường dùng

Theo phương pháp theo sáng chế, vaccin và chế phẩm có thể được cung cấp qua đường thích hợp bất kỳ, toàn thân, theo vùng hoặc tại chỗ. Đường dùng cụ thể được sử dụng trong trường hợp nhất định bất kỳ sẽ phụ thuộc vào một số yếu tố, bao gồm bản chất của bệnh cần được điều trị, độ nghiêm trọng và phạm vi của bệnh, liều lượng cần thiết của các hợp chất cụ thể cần được phân phối và các tác dụng phụ tiềm ẩn của vaccin hoặc chế phẩm mong muốn.

Ví dụ, trong trường hợp cần chuyển nồng độ thích hợp của vaccin hoặc chế phẩm mong muốn trực tiếp đến vị trí cần được điều trị, việc sử dụng có thể là theo vùng chứ không phải là toàn thân. Việc sử dụng theo vùng mang lại khả năng

chuyển tập trung tại chỗ rất cao của vaccin hoặc chế phẩm mong muốn đến vị trí yêu cầu và do đó thích hợp để đạt được hiệu quả trị liệu hoặc ngăn ngừa mong muốn trong khi tránh được việc các cơ quan khác của cơ thể tiếp xúc với vaccin hoặc chế phẩm và bằng cách đó có khả năng làm giảm tác dụng phụ. Bằng cách lấy ví dụ, việc dùng theo các phương án theo sáng chế có thể đạt được bằng các đường tiêu chuẩn, bao gồm trong khoang, trong bàng quang, trong cơ, trong động mạch, trong tĩnh mạch, dưới da, tại chỗ hoặc qua đường miệng. Việc dùng trong khoang có thể là trong màng bụng hoặc trong màng phổi.

Nếu muốn, dụng cụ hoặc chế phẩm có chứa chất có tiềm năng gây miễn dịch thích hợp để giải phóng liên tục hoặc không liên tục có thể, trong thực tế, được cấy trong cơ thể hoặc được dùng tại chỗ vào đó để làm chậm tương đối sự giải phóng vật liệu vào trong cơ thể.

Việc sử dụng vật truyền biểu hiện hoặc tế bào chủ có thể bao gồm việc phân phối qua đường miệng, tiêm toàn thân, hoặc phân phối vào (các) mô hoặc các tế bào chọn lọc, hoặc gián tiếp thông qua việc phân phối vào các tế bào được phân lập từ đối tượng hoặc thể cho tương thích.

Đối với chế phẩm trên cơ sở axit nucleic, tất cả các phương thức phân phối chế phẩm được bao gồm trong sáng chế. Việc phân phối các chế phẩm này vào các tế bào hoặc các mô động vật có thể được làm dễ dàng bằng cách bắn vi đạn, chuyển nhiễm qua liposom (ví dụ, lipofectin hoặc lipofectamin), đục lỗ điện, chuyển nhiễm qua canxi phosphat hoặc DEAE-dextran, ví dụ. Theo phương án thay thế, cấu trúc tổng hợp có thể được dùng làm chế phẩm trị liệu hoặc phòng bệnh dưới dạng chế phẩm "ADN trần" đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Thảo luận về các phương pháp chuyển thích hợp có thể tìm thấy ở chương 9 của tài liệu CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (Eds. Ausubel et al; John Wiley & Sons Inc., 1997 Edition) hoặc trên địa chỉ Internet DNa vaccine.com. Chế phẩm có thể được cung cấp bằng đường qua da (ví dụ, sử dụng cách chuyển panjetTM) hoặc trong cơ.

Bước đưa polynucleotit tổng hợp vào trong tế bào đích sẽ thay đổi tùy thuộc vào ứng dụng dự định và loài, và có thể bao gồm một hoặc nhiều vật truyền virus và không phải virus, liposom cation, retrovirus, và baculovirus như, ví dụ, được mô tả trong tài liệu Mulligan, R.C., (1993 Science 260 926-932). Các phương pháp này có thể bao gồm, ví dụ:

A. Sử dụng tại chỗ polynucleotit tổng hợp bằng cách tiêm (Wolff et al, 1990, Science 247 1465-1468), cấy phẫu thuật, nhỏ giọt hoặc phương tiện khác bất kỳ. Phương pháp này có thể còn được sử dụng kết hợp với việc sử dụng tại chỗ bằng cách tiêm, cấy phẫu thuật, nhỏ giọt hoặc phương tiện khác bất kỳ, của các tế bào đáp ứng với protein được mã hóa bởi polynucleotit tổng hợp sao cho làm tăng hiệu quả điều trị. Phương pháp này có thể còn được sử dụng kết hợp với việc sử dụng tại chỗ bằng cách tiêm, cấy phẫu thuật, nhỏ giọt hoặc phương tiện khác bất kỳ, của một yếu tố khác hoặc yếu tố cần thiết đối với hoạt tính của protein nêu trên.

B. Việc phân phối toàn thân thông thường bằng cách tiêm ADN, (Calabretta et al, 1993, Cancer Treat. Rev. 19 169-179), hoặc ARN, riêng lẻ hoặc kết hợp với liposom (Zhu et al, 1993, Science 261 209-212), capsid virus hoặc hạt nano (Bertling et al, 1991, Biotech. Appl. Biochem. 13 390-405,) hoặc chất trung gian khác bất kỳ cho việc phân phối. Có thể cải thiện việc nhắm đích bằng cách liên kết polynucleotit tổng hợp với phân tử nhắm đích (gọi là phương pháp "đạn ma lực" sử dụng, ví dụ, kháng thể), hoặc bằng cách sử dụng tại chỗ bằng cách tiêm, cấy phẫu thuật hoặc phương tiện khác bất kỳ, yếu tố khác hoặc yếu tố cần thiết đối với hoạt tính của protein mã hóa cho polynucleotit tổng hợp, hoặc các tế bào đáp ứng với protein nêu trên.

C. Tiêm hoặc cấy hoặc phân phối bằng phương tiện bất kỳ, các tế bào đã được cải biến *ex vivo* bằng cách chuyển nhiễm (ví dụ, với sự có mặt của canxi phosphat: Chen et al, 1987, Mole. Cell Biochem. 7 2745-2752, hoặc lipid cation và polyamin: Rose et al, 1991, BioTech. 10 520-525), lây nhiễm, tiêm, đục lỗ điện (Shigekawa et al, 1988, BioTech. 6 742-751,) hoặc cách khác bất kỳ sao cho làm

tăng sự biểu hiện của polynucleotit tổng hợp trong các tế bào. Việc cải biến có thể bằng plasmid, thể thực khuẩn, cosmit, virus (như adenovirus hoặc retrovirus; Mulligan, 1993, Science 260 926-932; Miller, 1992, Nature 357 455-460; Salmons et al, 1993, Hum. Gen. Ther. 4 129-141) hoặc các vật truyền khác, hoặc các chất khác để cải biến như liposome (Zhu et al, 1993, Science 261 209-212,), capsid của virus hoặc hạt nano (Bertling et al, 1991, Biotech. Appl. Biochem. 13 390-405,), hoặc chất trung gian khác bất kỳ để cải biến. Việc sử dụng tế bào làm phương tiện chuyển gen hoặc sản phẩm gen đã được mô tả trong tài liệu Barr et al, 1991, Science 254 1507-1512 và Dhawan et al, 1991, Science 254 1509-1512. Các tế bào đã được xử lý có thể được phân phối bằng cách kết hợp với chất dinh dưỡng bất kỳ, yếu tố phát triển, cơ chất hoặc chất khác sẽ làm tăng sức sống của chúng trong đối tượng được điều trị.

Chế phẩm có thể còn được sử dụng dưới dạng liposome. Liposome thường có nguồn gốc từ phospholipid hoặc các chất lipid khác, và được tạo thành bằng các tinh thể lỏng được hydrat hoá một lớp hoặc nhiều lớp được phân tán trong môi trường nước. Lipid có thể chuyển hoá, chấp nhận được về mặt sinh lý, không độc bất kỳ có khả năng tạo thành liposome có thể được sử dụng. Chế phẩm ở dạng liposome có thể có chứa chất làm ổn định, chất bảo quản, tá dược và dạng tương tự. Lipid được ưu tiên là phospholipid và phosphatidyl cholin (lecithin), cả ở dạng tự nhiên và tổng hợp. Các phương pháp để tạo thành liposome là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, và liên quan đến tham khảo tài liệu: Prescott, Ed., Methods in Cell Biology, Volume XIV, Academic Press, New York, N.Y. (1976), p. 33 *et seq.*.

Liều lượng

Hàm lượng liều lượng hữu hiệu của hợp chất được sử dụng cho đối tượng cụ thể bất kỳ sẽ phụ thuộc vào nhiều yếu tố bao gồm: loại bệnh được điều trị và giai đoạn của bệnh; hoạt tính của hợp chất được sử dụng; chế phẩm được sử dụng; tuổi, thể trọng, tình trạng sức khỏe, giới tính và chế độ ăn uống của đối tượng; thời gian dùng; đường dùng; tỷ lệ cang hoá của các hợp chất; khoảng thời gian điều trị;

thuốc được dùng kết hợp hoặc đồng thời với việc điều trị, cùng với các yếu tố liên quan khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ có thể, bằng thử nghiệm thông thường, xác định hiệu quả, liều lượng không độc cần thiết để điều trị cho các điều kiện thích hợp. Chúng thường được xác định theo từng trường hợp.

Đối với khối lượng, liều lượng hữu hiệu để trị liệu của chế phẩm để dùng cho bệnh nhân được dự tính nằm trong khoảng từ 0,01 mg đến 150mg cho một kg thể trọng trong 24 giờ; thông thường, khoảng từ 0,1 mg đến 150 mg cho một kg thể trọng trong 24 giờ; khoảng từ 0,1mg đến 100 mg cho một kg thể trọng trong 24 giờ; khoảng từ 0,5mg đến 100mg cho một kg thể trọng trong 24 giờ; hoặc khoảng từ 1,0mg đến 100mg cho một kg thể trọng trong 24 giờ. Thông thường hơn, giới hạn liều lượng hữu hiệu được dự tính nằm trong khoảng từ 5mg đến 50mg cho một kg thể trọng trong 24 giờ.

Theo cách khác, liều lượng hữu hiệu có thể lên đến khoảng 5000mg/m². Nhìn chung, liều lượng hữu hiệu được dự tính nằm trong khoảng từ 10 đến 5000 mg/m², thông thường nằm trong khoảng từ 10 đến 2500 mg/m², nằm trong khoảng từ 25 đến 2000 mg/m², nằm trong khoảng từ 50 đến 1500 mg/m², nằm trong khoảng từ 50 đến 1000 mg/m², hoặc nằm trong khoảng từ 75 đến 600 mg/m².

Hơn nữa, chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này hiểu rõ rằng lượng tối ưu và khoảng cách giữa các liều lượng dùng cho cá thể sẽ được xác định tùy theo bản chất và mức độ của tình trạng bệnh lý cần được điều trị, dạng, đường dùng, và vị trí dùng, và bản chất của cá thể cụ thể được điều trị. Ngoài ra, các điều kiện tối ưu có thể được xác định bằng các phương pháp thông thường.

Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này hiểu rõ rằng tiến trình tối ưu của việc điều trị, như, số lượng liều dùng của chế phẩm được cung cấp trong một đơn vị thời gian, có thể được xác định chắc chắn bởi chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này bằng cách sử dụng tiến trình thông thường của thử nghiệm xác định điều trị.

Các phương pháp điều trị

Sáng chế còn bao hàm các phương pháp để điều biến đáp ứng miễn dịch, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho đối tượng sử dụng lượng hữu hiệu của chất có tiềm năng gây miễn dịch được chọn từ nhóm bao gồm vacxin, vật truyền biểu hiện và tế bào chủ như mô tả trong bản mô tả này.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất các phương pháp để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh liên quan đến virus cúm gia cầm, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho đối tượng sử dụng lượng hữu hiệu của chất có tiềm năng gây miễn dịch được chọn từ nhóm gồm vacxin, các vật truyền biểu hiện và các tế bào chủ như được mô tả ở đây.

Đánh giá hiệu quả gây miễn dịch

Hiệu quả gây miễn dịch theo các phương pháp của sáng chế có thể được đánh giá bằng cách sử dụng kỹ thuật thích hợp bất kỳ. Ví dụ, có thể dùng thử nghiệm phân giải CTL bằng cách sử dụng tế bào lách được kích thích hoặc tế bào đơn nhân máu ngoại vi (Peripheral Blood Mononuclear Cells-PBMC) trên các tế bào được lây nhiễm virus tái tổ hợp hoặc được phủ peptit bằng cách sử dụng các tế bào đích được đánh dấu ^{51}Cr . Thử nghiệm có thể được thực hiện bằng cách sử dụng, ví dụ, các tế bào động vật linh trưởng, chuột nhắt hoặc người (Allen et al, 2000, J. Immunol. 164(9): 4968-4978 also Woodberry et al, infra). Theo cách khác, hiệu quả của việc gây miễn dịch có thể được theo dõi bằng cách sử dụng một hoặc nhiều phương pháp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nhuộm màu HLA lớp I Tetrame của cả các PBMC mới và được kích thích (ví dụ tài liệu Allen et al., nêu trên), thử nghiệm tăng sinh (Allen et al, nêu trên), thử nghiệm ElispotTM và nhuộm màu INF-gama nội bào (Allen et al, nêu trên), thử nghiệm ELISA đối với đáp ứng tế bào B tuyến tính, và thử nghiệm thẩm tách Western đối với các mẫu tế bào biểu hiện peptit kháng nguyên như được mô tả trong bản mô tả này.

Kì

Sáng chế đề xuất kit để sử dụng trong việc điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh ở đối tượng, trong đó bệnh này liên quan đến virus cúm gia cầm, và trong đó kit này chứa vaccin, vật truyền biểu hiện, tế bào chủ hoặc chế phẩm như được mô tả trong bản mô tả này.

Thông thường, kit để thực hiện phương pháp theo sáng chế chứa tất cả các chất phản ứng cần thiết để thực hiện phương pháp. Thông thường, kit theo sáng chế sẽ bao gồm một hoặc nhiều vật chứa, có chứa, ví dụ, chất rửa, và/hoặc các chất phản ứng khác có khả năng giải phóng thành phần liên kết từ polypeptit hoặc mảnh của chúng.

Trong phạm vi của sáng chế, kit chia ngăn bao gồm kit bất kỳ trong đó các chất phản ứng được chứa trong các đồ chứa riêng rẽ, và có thể bao gồm các đồ chứa bằng thủy tinh nhỏ, đồ chứa bằng nhựa hoặc mảnh nhựa hoặc giấy. Các đồ chứa này có thể cho phép chuyển một cách hiệu quả các chất phản ứng từ ngăn này sang ngăn khác trong khi tránh được sự nhiễm chéo của mẫu và các chất phản ứng, và bổ sung các chất hoặc dung dịch của mỗi đồ chứa từ ngăn này sang ngăn khác theo cách định lượng. Kit này có thể còn bao gồm đồ chứa để tiếp nhận mẫu thử nghiệm, đồ chứa có chứa polyme được dùng trong thử nghiệm và chứa có chứa các chất rửa (như nước muối đệm phosphat, đệm Tris, và dạng tương tự).

Thông thường, kit theo sáng chế sẽ còn bao gồm hướng dẫn sử dụng các thành phần của kit để thực hiện phương pháp thích hợp.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả bằng các ví dụ minh họa sau đây, và không được hiểu theo cách bất kỳ nào nhằm làm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1: Cấu trúc của catxet biểu hiện HA trên baculovirus tái tổ hợp

Ngưng kết tổ hồng cầu (HA) của virus cúm H5N1 là một trong hai glycoprotein virus màng chính chịu trách nhiệm đối với việc sản xuất kháng thể

trung hoà (Bosch, et al., 1979, Kawaoka and Webster 1988). Để xác định khả năng tạo ra vaccin dựa trên baculovirut kháng virus H5N1 (A/Goose/Guangdong/3/97/H5N1), các tác giả sáng chế đã tạo cấu trúc hai vật truyền biểu hiện baculovirut tái tổ hợp, mỗi vật truyền đều có chứa catxet biểu hiện HA. Vật truyền biểu hiện baculovirut thứ nhất được tạo ra có catxet biểu hiện HA dưới sự kiểm soát của virus gây hội chứng đốm trắng (WSSV) gen khởi đầu *iel*, gọi là vAc-HA (Fig.1A). Vật truyền biểu hiện baculovirut thứ hai được tạo ra chứa catxet biểu hiện HA và catxet biểu hiện (VSV G) glycoprotein của virus gây viêm miệng phỏng rộp dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu polyhedrin của baculovirut, gọi là vAc-G-HA (Fig.1A).

Để tạo ra vật truyền baculovirut tái tổ hợp, catxet biểu hiện VSV G được kiểm soát bởi gen khởi đầu polyhedrin AcMNPV hoặc catxet biểu hiện HA được kiểm soát bởi gen khởi đầu *iel* WSSV được xen vào vật truyền con thoi pFastBac1 và được kết hợp vào hệ gen baculovirut trong DH 10B AC™ theo quy trình của hệ Bac-sang-Bac (Invitrogen). Virus đối chứng, vAc-Bacmit, còn được tạo cấu trúc bằng cách kết hợp vật truyền pFastBac1 trống vào trong hệ gen Bacmit (Fig.1A).

Các catxet biểu hiện VSV G hoặc HA mong muốn được xen vào locus polyhedrin thông qua sự chuyển đặc hiệu vị trí bằng cách sử dụng hệ Bac-sang-Bac. ADN bổ trợ (cADN) của VSV G có đoạn kết thúc β -globin sau đó được khuếch đại bằng PCR từ pVSV-G với các đoạn môi 5'-CGCGGATCCATGAAGTGCCTTTTGTACTTAG-3' (SEQ ID NO: 1) và 5'-CCCAAGCTTCCAACACACTATTGCAATGAA-3' (SEQ ID NO: 2). ADN bổ trợ (cADN) của VSV G được đặt phía sau gen khởi đầu polyhedrin, được khuếch đại PCR từ hệ gen Bacmit với các đoạn môi 5'-TCCCCCGGGGGATGGTTGGCTACGTATACTCCG-3' (SEQ ID NO: 3) và 5'-CGCGGATCCGGTTTCGGACCGAGATCCGC-3' (SEQ ID NO: 4). cADN của HA được khuếch đại từ hệ gen của virus H5N1 bằng RT-PCR với bộ đoạn môi 5'-ATAAGAATGCGGCCGCTATGGAGAAAACAGTGCTTCTTCTTG-3' (SEQ ID NO: 5) và 5'-CCGCTCGAGCGGTAAATGCAAATTCTGCATTGTAACGATC-3'

(SEQ ID NO: 6). Sau đó, cADN của HA được đặt phía trước gen kết thúc của SV40 trong vật truyền pFastBac1 và phía sau gen khởi đầu *ie1*, được khuếch đại từ hệ gen WSSV (Lu et al, 2005) với bộ đoạn mỗi 5'-

TCCCTACGTATCAATTTTATGTGGCTAATGGAGA-3' (SEQ ID NO: 7) và 5'-

ACGCGTCGACCTTGAGTGGAGAGAGAGCTAGTTATAA-3' (SEQ ID NO: 8).

Việc lây nhiễm các tế bào côn trùng Sf9 với vAc-G-HA dẫn đến sự dung hợp tế bào - tế bào mở rộng (Fig.1B). Do đó, kiểu hình có mức độ biểu hiện protein VSV G cao có hoạt tính dung hợp màng bằng gen khởi đầu polyhedrin.

Động học của việc sản xuất virion ở các tế bào Sf9 còn được đánh giá bằng cách xây dựng đường cong phát triển một bước của sự sản xuất virus lây nhiễm (Fig.1C). Động học tạm thời của đường cong phát triển (Lu et al, 2003) của các virus này là tương tự nhau, mặc dù đỉnh sản xuất virion vAc-G-HA chậm hơn đỉnh sản xuất vAc-HA và vAc-Bacmit đối chứng. Độ chuẩn của vAc-G-HA tăng lên đến 10^9 PFU (đơn vị tạo mảng)/ml vào 120 giờ p.i., trong khi vAc-HA và vAc-Bacmit tạo thành độ chuẩn giống như vậy vào 96 giờ p.i. (Fig.1C). Sự hình thành hợp bào với số lượng lớn của các tế bào Sf9 được lây nhiễm bằng vAc-G-HA có thể làm chậm sự giải phóng virion trong lây nhiễm muộn.

Ví dụ 2: Sự biểu hiện trên màng của ngưng kết tổ hồng cầu

Các tác giả sàng chế tinh sạch vAc-HA, vAc-G-HA và vAc-Bacmit từ phân dịch nổi trên bề mặt của các tế bào côn trùng được lây nhiễm bằng cách siêu ly tâm. Để xác định xem HA có được biểu hiện trên màng của vAc-HA và vAc-G-HA hay không, các virion đã được làm sạch được xử lý bằng Triton X-100 1% trong 15 phút để phá vỡ cấu trúc màng virus, và sau đó nucleocapsit của virus được thu lại bằng cách siêu ly tâm. Để tạo ra kháng thể kháng HA protein, HA1 được gắn đuôi His₆ được biểu hiện và tinh sạch từ các tế bào SF9 được lây nhiễm baculovirus, với kháng thể đa dòng kháng protein HA thu được ở chuột lang bằng cách sử dụng HA1 được gắn đuôi His₆ làm kháng nguyên. Phân tích thẩm tách Western chỉ ra rằng HA được phát hiện ở các virion tinh sạch trước khi xử lý bằng Triton X-100,

và không phát hiện được trong viên thu được chỉ chứa nucleocapsit của virus (Fig.2A).

Đã phát hiện ra rằng HA bị phân cắt một phần thành HA1 và HA2 trong cả tế bào SF9 được lây nhiễm và hạt vAc-G-HA đã tinh sạch, tương tự như ở virion H5N1 đã tinh sạch (Fig.2A). Dữ liệu này cho thấy vật truyền baculovirus có thể biểu hiện glycoprotein của virus giống HA, với cải biến sau dịch mã tương tự đối với sản phẩm tự nhiên của nó. Thử nghiệm thẩm tách Westerns sử dụng kháng thể đơn dòng kháng VSV G còn cho thấy VSV G là thành phần cấu trúc có liên quan đến màng ở các virion vAc-G-HA đã tinh sạch (Fig.2B).

Để xác định xem protein HA được biểu hiện trên bề mặt baculovirus có duy trì tính chất sinh học đáng tin cậy hay không, tiến hành thử nghiệm hoạt tính ngưng kết hồng cầu của các virion đã tinh sạch vAc-HA và vAc-G-HA (Fig.2C). 25 μ l vAc-HA hoặc vAc-G-HA ở độ chuẩn 10^{10} PFU/ml mang lại độ chuẩn ngưng kết hồng cầu khoảng 2^8 bằng cách sử dụng thử nghiệm ngưng kết hồng cầu tiêu chuẩn (Wood et al, 1985). Kết quả cho thấy sự đồng biểu hiện của VSV G với HA sẽ không làm giảm đáng kể hiệu quả biểu hiện của HA trên màng baculovirus.

Ví dụ 3: Khả năng tải nạp của vAc-G-HA

Vì VSV G mang lại ưu điểm tải nạp của vAc-G-HA so với vAc-HA, tiến hành thử nghiệm dùng vaccine *in vivo* để đánh giá khả năng tải nạp của vAc-G-HA. Thực hiện thử nghiệm tải nạp (Hsu et al., 2004) ở các dòng tế bào (1) MDCK của chó và (2) tế bào Df-1 của gà. Fig.3A cho thấy vAc-G-HA đã được tải nạp một cách hiệu quả các dòng tế bào này như được biểu thị bằng các tế bào huỳnh quang dương tính. Sự biểu hiện được xác nhận hơn nữa bằng phân tích thẩm tách Western của tổng phần chiết tế bào với huyết thanh kháng HA1 thu được từ chuột lang, như được thể hiện trên Fig.3B.

Để kiểm tra tiếp số lượng phân tử HA được biểu hiện trên bề mặt của vAc-G-HA, ELISA bắt giữ kháng nguyên phát triển dựa trên kháng huyết thanh đa dòng

kháng HA1 ở chuột lang và kháng thể đơn dòng HA1, như đã được thông báo trước đây (He et al., 2005).

HA1 được gắn đuôi His₆ được biểu hiện và đã được làm sạch từ các tế bào SF9 được lây nhiễm baculovirut. Để tạo cấu trúc baculovirut biểu hiện HA1 bằng vật truyền pFast HTa của hệ Bac-sang-Bac, trình tự mã hóa HA1 được khuếch đại từ cADN của HA nêu trên với cặp đoạn mỗi 5'-CGCGGATCCGATGGAGAAAACAGTGCTTCTTCTTTG-3' (SEQ ID NO: 9) và 5'-CGGGGTACCCTCTCTTTGAGGGGTATTTCT-3' (SEQ ID NO: 10). Để biểu hiện protein, các tế bào Sf9 được lây nhiễm bằng virut tái tổ hợp ở MOI bằng 5 và thu hoạch vào 72 giờ sau khi gây nhiễm (p.i.). Việc tinh chế protein HA1 được gắn đuôi His₆ từ tổng phân chiết tế bào được thực hiện với chất pha trộn loãng nhựa mang Ni²⁺.

ELISA bắt giữ kháng nguyên được thiết kế bằng cách bao phủ các đĩa vi độ chuẩn có IgG tinh sạch từ chuột lang. Sau đó, phát hiện kháng nguyên gắn kết bằng phần dịch nổi trên bề mặt tế bào lai chứa các kháng thể đơn dòng đặc hiệu HA1. Protein HA1 được pha loãng theo dãy 10 lần bằng cách được sử dụng để tạo cấu trúc đường cong xác định số lượng chuẩn. Lượng HA1 trong mẫu vAc-G- Ha được xác định làm trị số điểm trên đường cong tiêu chuẩn thể hiện hệ số hấp phụ ở bước sóng 490 nm giống như vậy (Fig.3C). Từ đường cong này, 25 µl vAc-G-HA ở độ chuẩn 10¹⁰ PFU/ml được phát hiện là có chứa khoảng 50 ng HA1. Phát hiện này cho thấy protein HA duy trì hoạt tính ngưng kết hồng cầu chắc chắn và được biểu hiện một cách hiệu quả trên bề mặt của baculovirut.

Ví dụ 4: Khả năng sinh miễn dịch của vAc-G-HA

Sau đó, xác định khả năng sinh miễn dịch của vAc-G-HA bằng cách gây miễn dịch trong cơ đối với chuột nhắt BALB/c từ 6 đến 8 tuần tuổi bằng virion vAc-G-HA tinh sạch. 4 tuần sau khi dùng vacxin bằng 5 x 10⁹ PFU hạt vAc-G-HA, chuột nhắt được tiêm liều cao với lượng virion tương tự. Một tuần sau đó, chuột nhắt được làm chảy máu thông qua mạch máu sau mắt và huyết thanh từ mỗi con

được thử nghiệm riêng lẻ đối với các kháng thể kháng HA bằng ELISA và thử nghiệm ngưng kết hồng cầu ức chế (HI) (Wood et al, 1985).

Thử nghiệm ELISA được thiết kế để đánh giá hàm lượng kháng thể đặc hiệu HA bằng cách phủ lên các vi đĩa 96 giếng bằng 60 ng protein HA1 được gắn đuôi His₆ đã tinh sạch cho mỗi lỗ. Như được thể hiện trên Fig.4A, tất cả 5 con chuột nhất đã được gây miễn dịch phát triển đáp ứng kháng thể đáng kể, khi phát hiện bằng ELISA trong đó protein HA1 tinh sạch được phủ làm kháng nguyên. Hai con chuột nhất đối chứng được gây miễn dịch bằng vAc-Bacmit chỉ biểu hiện độ chuẩn huyết thanh.

vAc-G-HA gây ra đáp ứng kháng thể HI huyết thanh trong tất cả 5 con chuột nhất đã được gây miễn dịch, có độ chuẩn nằm trong khoảng từ 2^3 đến 2^5 (Fig.4B). Đáp ứng kháng thể HI có thể so sánh được với chuột nhất được tiêm vaccin trong mũi với virus cúm H5 sống đã chứng tỏ độ chuẩn nằm trong khoảng từ 2^4 đến 2^7 , như được thông báo bởi Takada et al. (1999). Đáp ứng kháng thể đặc hiệu và đáng kể từ chuột nhất đã được cấy nhiễm vAc-G-HA cho thấy rằng phân tử HA được biểu hiện trên bề mặt virus hoặc được biểu hiện thông qua việc tải nạp virus duy trì tính kháng nguyên của nó.

Để nhận định thêm về khả năng sinh miễn dịch của vAc-G-HA và vAc-HA, chuột nhất BALB/c 7 tuần tuổi (năm con chuột nhất ở mỗi nhóm) được gây miễn dịch trong cơ bằng các virion tinh sạch. Chủng vaccin H5N1/PR8 đã bất hoạt khuếch đại các tế bào từ MDCK được sử dụng làm mẫu đối chứng dương tính, với chuột nhất được tiêm vaccin vAc-Bacmit được dùng làm mẫu đối chứng âm tính. 4 tuần sau khi dùng vaccin trong cơ với các đơn vị 256 HA của hạt baculovirus đã tinh sạch hoặc virus H5N1/PR8 đã bất hoạt, chuột nhất được tiêm liều cao với lượng virion tương tự. Một tuần sau đó, chuột nhất được lấy máu qua mạch máu sau mắt, và huyết thanh thu được từ mỗi nhóm có 5 con chuột nhất được thử nghiệm riêng lẻ đối với các kháng thể kháng HA bằng ELISA như được mô tả bởi He et al., 2005 và thử nghiệm ngưng kết hồng cầu ức chế (HI) như được mô tả bởi

Wood et al., 1985. ELISA được thiết kế để đánh giá hàm lượng kháng thể đặc hiệu HA bằng cách phủ lên các vi đĩa 96 giếng với 60 ng protein HA1 được gắn đuôi His6 đã tinh sạch cho mỗi giếng.

Như được thể hiện trên Fig.5A, chuột nhắt được gây miễn dịch bằng vAc-HA hoặc vAc-G-HA phát triển đáp ứng kháng thể đáng kể khi phát hiện bằng ELISA, trong đó protein HA1 đã tinh sạch được phủ làm kháng nguyên. Chuột nhắt được gây miễn dịch bằng vAc-Bacmit chỉ biểu hiện độ chuẩn huyết thanh nền. Cả vAc-G-HA và vAc-HA gây đáp ứng kháng thể HI huyết thanh ở 6 con chuột nhắt đã được gây miễn dịch, có độ chuẩn bằng 2 (Fig.5B). Độ chuẩn HI của vật truyền baculovirut có thể so sánh được với chuột nhắt được tiêm vaccin chủng H5N1/PR8 mà có độ chuẩn trung bình bằng 2^8 (Fig.5B).

Trong thử nghiệm ELISA, đáp ứng kháng thể do vAc-G-HA gây ra cao hơn khoảng 18% so với đáp ứng kháng thể do vAc-HA gây ra. Điều đáng ngạc nhiên là, chủng vaccin H5N1/PR8 gây ra mức đáp ứng kháng thể cao hơn như được thể hiện bởi ELISA. Như vậy, kháng huyết thanh gây ra chứng minh rằng hoạt tính HI cao hơn bốn lần so với baculovirut biểu hiện HA (Fig.5A và Fig.5B). Đáp ứng kháng thể đặc hiệu và đáng kể từ chuột nhắt được tiêm vaccin baculovirut cho thấy phân tử HA được biểu hiện trên bề mặt của virut hoặc được biểu hiện thông qua việc tải nạp virut duy trì tính kháng nguyên chắc chắn của nó.

Sau đó, thử nghiệm khả năng trung hoà *in vitro* của kháng thể cảm ứng bằng baculovirut biểu hiện HA. Thử nghiệm vi trung hoà tiêu chuẩn dựa trên hệ tế bào H5N1/PR8 và MDCK được thực hiện như đã được thông báo trước đó bởi Rowe et al., 1999. Huyết thanh do baculovirut biểu hiện HA thể hiện độ chuẩn trung hoà đáng kể bằng 80, trong khi huyết thanh do H5N1/PR8 gây ra mang lại độ chuẩn cao hơn bằng 160 (Fig.5B).

Tài liệu tham khảo

Bosch, F.X., M. Orlinich, H.D. Klenk, and R. Rott. 1979. The structure of the hemagglutinin, a determinant for the pathogenicity of influenza viruses. *Virology*. 95:197- 207.

He, Q., Q. Du, S. Lau, I. Manopo, L. Lu, S.W. Chan, BJ. Fenner, and J. kwang. 2005. Characterization of monoclonal antibody against SARS coronavirus nucleocapsid antigen and development of an antigen capture ELISA. *J. Virol. Methods*. 127:46-53.

Hsu, C, Y. Ho, K. Wang, and Y. Hu. 2004. Investigation of optimal transduction conditions for baculo virus-mediated gene delivery into mammalian cells. *Biotechnol. Bioeng*. 88:42-51.

Kawaoka, Y. and R. G. Webster. 1988. Sequence requirements for cleavage activation of influenza virus hemagglutinin expressed in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 85:324-328. Lu, L., Q. Du, and N. Chejanovsky. 2003. Reduced expression of the immediate- early protein IEO enables efficient replication of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus in poorly permissive *Spodoptera littoralis* cells. *J. Virol*. 77:535- 545.

Lu, L., H. Wang, I. Manopo, L. Yu, and J. Kwang. 2005. Baculovirus-mediated promoter assay and transcriptional analysis of white spot syndrome virus orf427 gene. *Virol. J*. 2:71.

Takada, A., N. Kuboki, K. Okazaki, A. Ninomiya, H. Tanaka, H. Ozaki, S. Itamura, H. Nishimura, M. Enami, M. Tashiro, K.F. Shortridge, and H. Kida. 1999. Avirulent Avian influenza virus as a vaccine strain against a potential human pandemic. *J. Virol* 73:8303-8307.

Wood, J.M., Y. Kawaoka, L.A. Newberry, E. Bordwell, and R.G. Webster. 1985. Standardization of inactivated H5N2 influenza vaccine and efficacy against lethal A/chicken/Pennsylvania/1370/83 infection. *Avian Dis.* 29:867-872.

Rowe T, Abernathy RA, Hu-Primmer J, Thompson WW, Lu X, Lim W, Fukuda K, Cox NJ, Katz JM. 1999 Detection of antibody to avian influenza A (H5N1) virus in human serum by using a combination of serologic assays. *J Clin Microbiol.* 1999 Apr;37(4):937-43.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Vacxin dùng để điều trị hoặc phòng bệnh liên quan đến virus cúm gia cầm ở đối tượng, trong đó vacxin này chứa vật truyền biểu hiện chứa:

(a) axit nucleic mã hóa peptit kháng nguyên; và

(b) gen khởi đầu *ie1* thu được từ virus gây hội chứng đốm trắng được liên kết linh hoạt với axit nucleic mã hóa peptit kháng nguyên

sao cho khi sử dụng, peptit kháng nguyên này được biểu hiện bởi vật truyền biểu hiện nêu trên ở đối tượng.

2. Vacxin theo điểm 1, trong đó vật truyền biểu hiện nêu trên bao gồm vật truyền biểu hiện baculovirus.

3. Vacxin theo điểm 1 hoặc 2, trong đó đối tượng được chọn từ nhóm bao gồm người, chim hoặc lợn.

4. Vacxin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó peptit kháng nguyên là glycoprotein màng.

5. Vật truyền biểu hiện dùng để điều trị hoặc phòng bệnh ở đối tượng, trong đó bệnh này liên quan đến virus cúm gia cầm, trong đó vật truyền biểu hiện này chứa:

(a) axit nucleic mã hóa cho peptit kháng nguyên; và

(b) gen khởi đầu *ie1* thu được từ virus gây hội chứng đốm trắng được liên kết linh hoạt với axit nucleic mã hóa peptit kháng nguyên, sao cho khi sử dụng, peptit kháng nguyên này được biểu hiện bởi vật truyền biểu hiện nêu trên ở đối tượng.

6. Vật truyền biểu hiện theo điểm 5, trong đó peptit kháng nguyên là glycoprotein màng.
7. Tế bào chủ chứa vật truyền biểu hiện theo điểm 5 hoặc 6.
8. Chế phẩm dùng để điều trị hoặc phòng bệnh liên quan đến virus cúm gia cầm chứa chất có tiềm năng gây miễn dịch được chọn từ nhóm bao gồm vaccin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, vật truyền biểu hiện theo điểm 5 hoặc 6 hoặc tế bào chủ theo điểm 7, cùng với chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược được dùng.
9. Chế phẩm theo điểm 8, trong đó chế phẩm này còn chứa chất phụ trợ.
10. Vaccin chứa vật truyền biểu hiện theo điểm 5 hoặc 6 để điều trị hoặc phòng bệnh ở đối tượng, trong đó bệnh này có liên quan đến virus cúm gia cầm.
11. Kit để sử dụng trong việc điều trị hoặc phòng bệnh ở đối tượng, trong đó bệnh này có liên quan đến virus cúm gia cầm, và trong đó kit này chứa vaccin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4 hoặc 10.
12. Kit để sử dụng trong việc điều trị hoặc phòng bệnh ở đối tượng, trong đó bệnh này có liên quan đến virus cúm gia cầm, và trong đó kit này chứa vật truyền biểu hiện theo điểm 5 hoặc 6.
13. Kit để sử dụng trong việc điều trị hoặc phòng bệnh ở đối tượng, trong đó bệnh này có liên quan đến virus cúm gia cầm, và trong đó kit này chứa tế bào chủ theo điểm 7.
14. Kit để sử dụng trong việc điều trị hoặc phòng bệnh ở đối tượng, trong đó bệnh này có liên quan đến virus cúm gia cầm, và trong đó kit này chứa chế phẩm theo điểm 8 hoặc 9.

15. Phương pháp trình diện hoặc biểu hiện polypeptit kháng nguyên, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

- (a) xen axit nucleic mã hóa polypeptit vào vật truyền biểu hiện baculovirut, trong đó vật truyền biểu hiện baculovirut này chứa gen khởi đầu *iel* thu được từ virut gây hội chứng đốm trắng như được xác định trong điểm 1;
- (b) chuyển nhiễm ít nhất một tế bào chủ với vật truyền biểu hiện này; và
- (c) biểu hiện polypeptit thu được từ vật truyền biểu hiện nêu trên

trong đó polypeptit được trình diện hoặc được biểu hiện trên màng bề mặt của baculovirut.

16. Hệ trình diện hoặc biểu hiện polypeptit kháng nguyên, trong đó hệ này chứa:

- (a) axit nucleic mã hóa polypeptit được xen vào vật truyền biểu hiện baculovirut, trong đó vật truyền biểu hiện baculovirut này chứa gen khởi đầu *iel* thu được từ virut gây hội chứng đốm trắng như được xác định trong điểm 1;
- (b) phương tiện để chuyển nhiễm ít nhất một tế bào chủ với vật truyền biểu hiện nêu trên; và
- (c) phương tiện để biểu hiện polypeptit từ vật truyền biểu hiện nêu trên

trong đó polypeptit được trình diện hoặc được biểu hiện trên màng bề mặt của baculovirut.

17. Phương pháp theo điểm 15, trong đó gen khởi đầu được liên kết linh hoạt với axit nucleic mã hóa cho polypeptit kháng nguyên.

18. Hệ theo điểm 16, trong đó gen khởi đầu được liên kết linh hoạt với axit nucleic mã hóa cho polypeptit kháng nguyên.

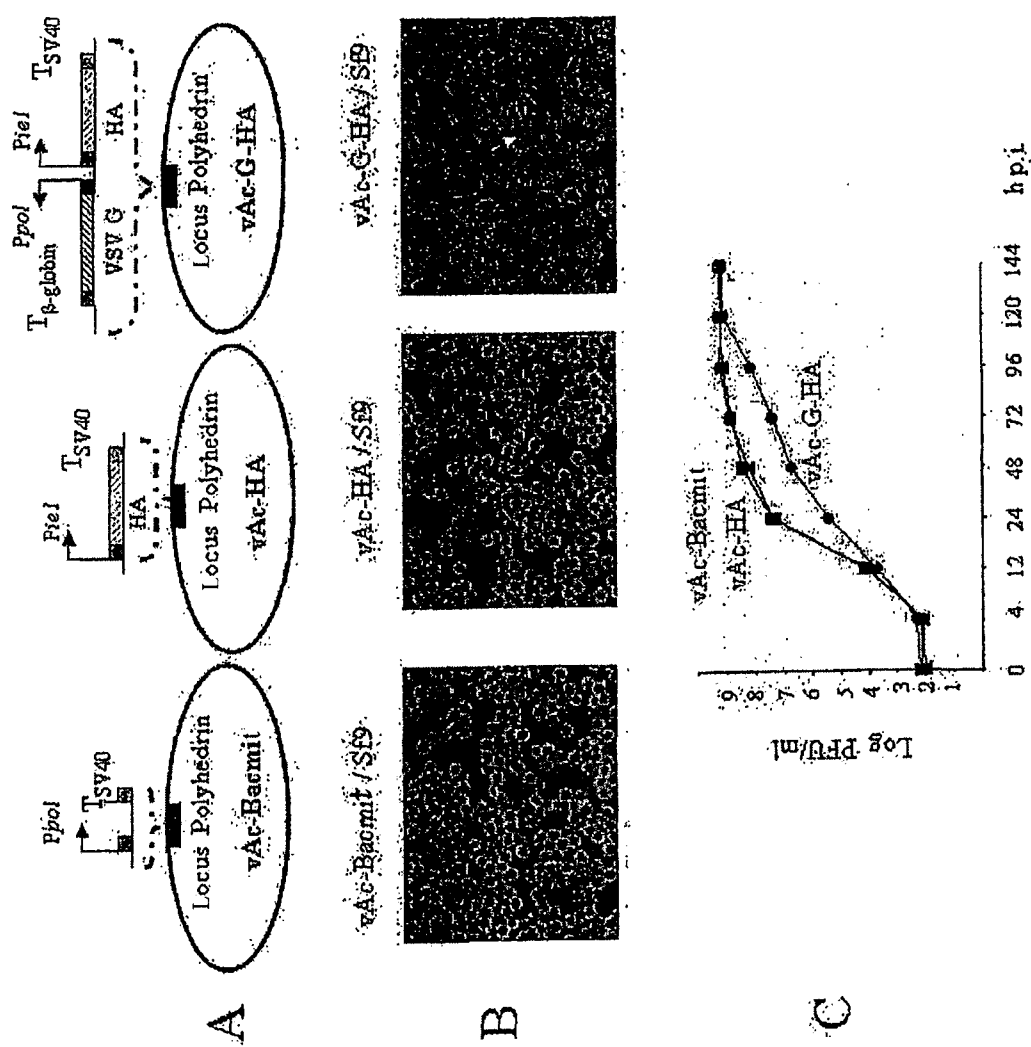


Fig. 1

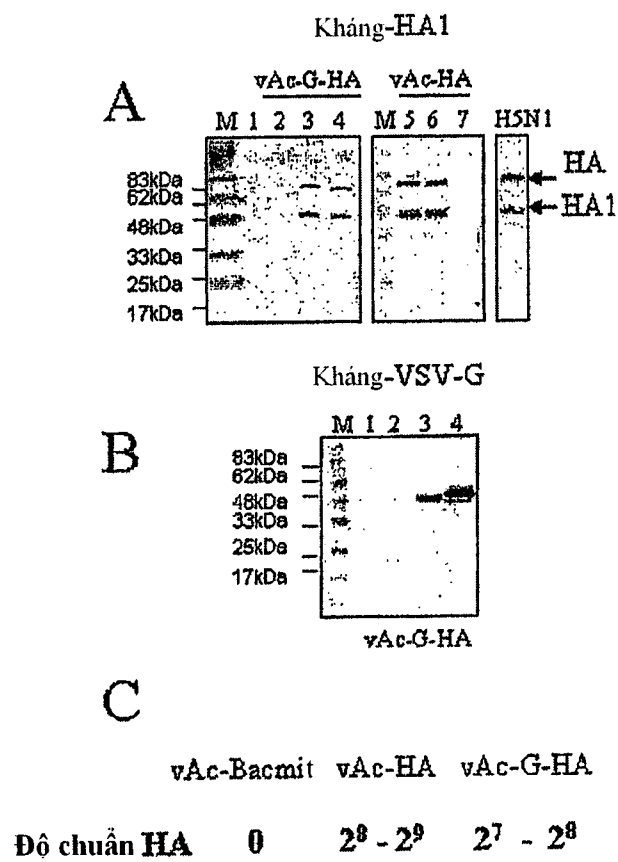


Fig. 2

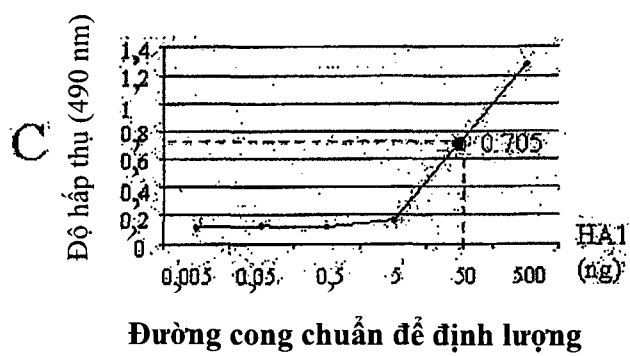
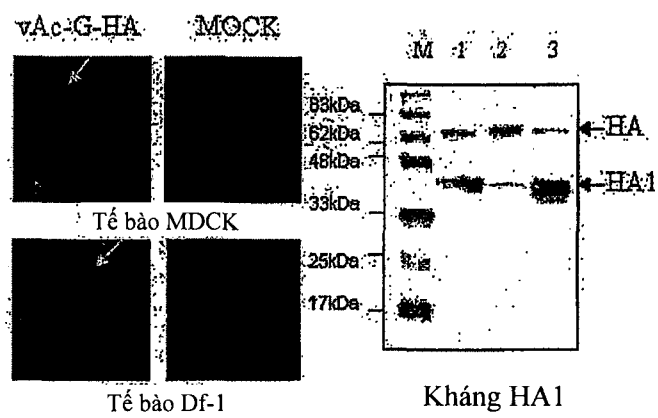


Fig. 3

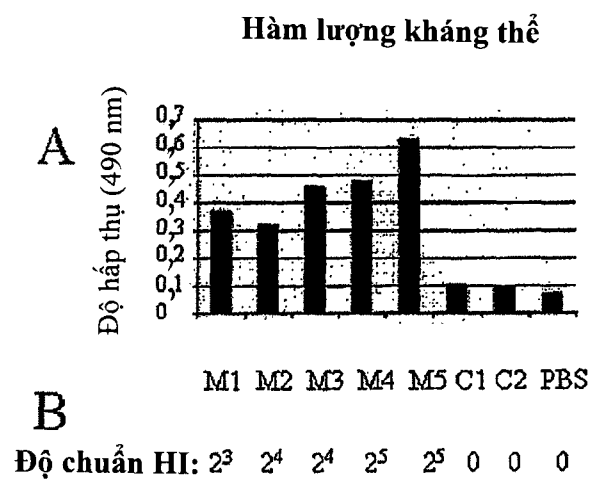


Fig. 4

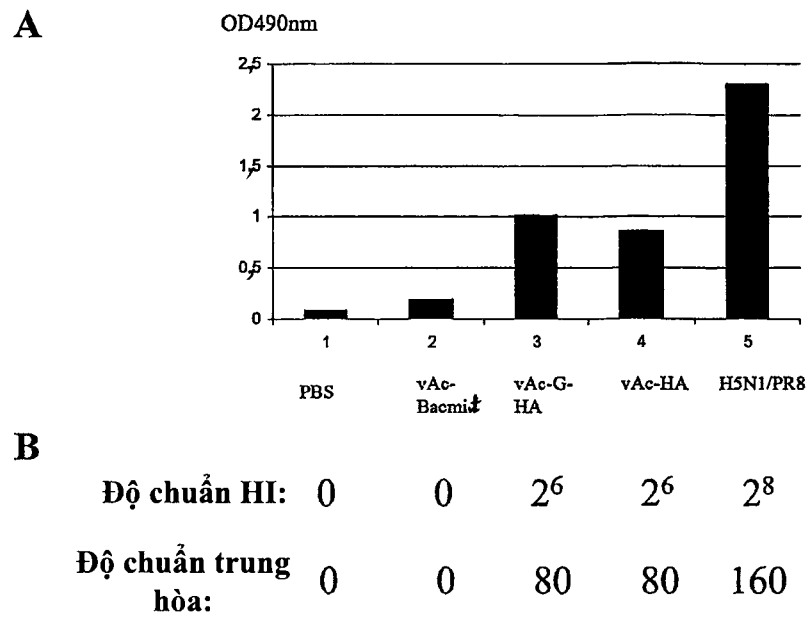


Fig. 5

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Temasek Lifesciences Laboratory

<120> Vacxin dùng để điều trị hoặc phòng bệnh liên quan đến virus cúm gia cầm, chế phẩm và kit chứa vacxin này

<130> 747345M

<160> 10

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 31

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 1

cgcggtatcca tgaagtcct tttgtactta g

31

<210> 2

<211> 30

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 2

cccaagcttc caacacacta ttgcaatgaa

30

<210> 3

<211> 33

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 3

tcccccgggg gatggttggc tacgtatact ccg

33

<210> 4

<211> 29

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 4

cgcggtatccg gtttcggacc gagatccgc

29

<210> 5

<211> 42

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 5

ataagaatgc ggccgctatg gagaaaacag tgcttcttct tg

42

<210> 6

<211> 41

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 6

cogctcgagc ggttaaagtc aaattctgca ttgtaacgat c

41

<210> 7

<211> 34

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 7

tccctacgta tcaattttat gtggctaagc gaga

34

<210> 8

<211> 37

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 8

acgcgtcgac cttgagtggg gagagagcta gttataa

37

<210> 9

<211> 36

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 9

cgcggtatccg atggagaaaa cagtgccttct tctttg

36

<210> 10

<211> 30

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 10

cggggtaccc tctctttgag gggatattct

30