



(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) 
1-0022197

(51)⁷ **C12N 7/04, C07K 14/09**

(13) **B**

(21)	1-2012-01070	(22)	24.09.2010		
(86)	PCT/GB2010/001807	24.09.2010	(87)	WO2011/048353	28.04.2011
(30)	0918375.7	20.10.2009	GB		
(45)	25.11.2019	380	(43)	25.05.2015	326
(73)	THE PIRBRIGHT INSTITUTE (GB) Ash Road Pirbright GU24 ONF (GB)				
(72)	CHARLESTON, Bryan (GB), JONES, Ian (GB)				
(74)	Công ty Cổ phần Sở hữu công nghiệp INVESTIP (INVESTIP)				

(54) **CẤU TRÚC CÓ KHẢ NĂNG SẢN XUẤT CAPSIT RỖNG CỦA VIRUT KHI ĐƯỢC BIỂU HIỆN TRONG TẾ BÀO CHỦ, VECTƠ, TẾ BÀO CHỦ, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT CAPSIT RỖNG CỦA VIRUT VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT VACXIN**

(57) **Sáng chế đề cập đến cấu trúc, mà khi được biểu hiện trong tế bào chủ, thì có khả năng sản xuất capsit rỗng của virus, cấu trúc này bao gồm:**

(i) **trình tự nucleotit mã hóa protein tiền chất capsit;**

(ii) **trình tự nucleotit mã hóa proteaza có khả năng phân cắt protein tiền chất capsit; và**

(iii) **yếu tố kiểm soát để kiểm soát sự biểu hiện của proteaza**

sao cho, khi cấu trúc này có mặt trong tế bào chủ, thì yếu tố kiểm soát làm cho proteaza được biểu hiện ở mức đủ để phân cắt protein tiền chất capsit, nhưng không đủ để gây ra độc tính đáng kể trong tế bào chủ. Sáng chế còn đề xuất vectơ và tế bào chủ chứa cấu trúc như vậy, phương pháp sản xuất capsit rỗng của virus và phương pháp sản xuất vacxin.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến cấu trúc mà, khi được biểu hiện trong tế bào chủ, thì có khả năng sản xuất vỏ capsit virut rỗng, cụ thể là, capsit virut bệnh lở mồm long móng (FMDV) rỗng. Sáng chế còn đề cập đến vector và tế bào chủ chứa những cấu trúc như vậy.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh lở mồm long móng (FMD)

FMD là bệnh có tính lây nhiễm cao và gây thiệt hại về mặt kinh tế của các động vật có móng chẻ (Bộ guốc chẵn - tên khoa học Artiodactyla), ảnh hưởng đến các động vật nhai lại được thuần hóa, lợn và một số lớn các loài hoang dã.

FMD là bệnh phân bố rộng rãi khắp thế giới. Các vùng phát triển như các lục địa của Bắc và Trung Mỹ và Nam Cực, và các nước như Úc và New Zealand thì không có bệnh này trong khi FMD là bệnh dịch tại nhiều nước đang phát triển như những nước ở Châu Phi hạ Sahara, Trung Đông, Nam Á, Đông Nam Á và Nam Mỹ. Cũng có một số khu vực của thế giới thường không có bệnh này, như Châu Âu nơi mà FMD bị thanh toán vào năm 1989 và nơi mà việc tiêm chủng đã ngừng từ năm 1991. Tuy nhiên, thỉnh thoảng có các đợt tấn công của bệnh như dịch bệnh năm 2001 ở UK/EIRE/Pháp/Hà Lan do chủng PanAsian O (Knowles *et al.*, (2001) Veterinary Record. 148. 258-259) và sự bùng phát năm 2007 ở UK của typ huyết thanh O1 BFS/1967.

Tác nhân gây bệnh của FMD là virut gây bệnh lở mồm long móng (FMDV), virut ARN sợi đơn, có nghĩa dương của họ Picornaviridae. FMDV tồn tại ở dạng bảy typ huyết thanh phân biệt về mặt kháng nguyên, là A, O, C, châu Á 1 và các lãnh thổ

Nam Châu Phi (South African Territories - SAT) 1, 2 và 3, với nhiều phân nhóm khác nhau trong mỗi typ huyết thanh.

Quá trình dịch mã ARN sợi đơn thu được polyprotein mà sau đó được xử lý bằng các proteaza được mã hóa bởi virus để tạo ra protein cấu trúc và protein phi cấu trúc cần thiết cho quá trình lắp ráp và sao chép virus. Proteaza dẫn đầu (L) phân cắt chính nó thành dạng *cis* hoặc thành dạng *trans* ở đầu cuối C của nó từ tiền chất capsit P1-2A. Proteaza 2A phân cắt chính nó ở đầu cuối C của nó để giải phóng P1-2A khỏi P2. Quá trình xử lý P1-2A được thực hiện bằng proteaza 3C để sản xuất các protein capsit 1AB (còn được gọi là VP0), 1C (VP3) và 1D (VP1). Trong virion, quá trình phân cắt 1AB xảy ra để tạo 1A (VP4) và 1B (VP2).

Vaccin FMDV

Các vaccin thông thường chống lại bệnh FMD bao gồm toàn bộ các virion virus mà đã được làm bất hoạt bằng hóa học, bình thường bằng cách sử dụng một aziridin như etylenimin nhị phân (BEI).

Các vaccin virus nguyên vẹn chưa được hoạt hóa đóng một vai trò thiết yếu trong chiến dịch kiểm soát và thanh toán bệnh FMD. Tuy nhiên, các vaccin được tạo ra từ nuôi cấy mô virus liên quan đến nguy cơ giải phóng virus trong suốt quá trình sản xuất vaccin. Đồng thời, có nguy cơ làm bất hoạt virus theo cách không thích hợp, điều này có nguy cơ dẫn đến những đợt bùng phát bệnh FMD liên quan đến vaccin.

Để làm giảm những nguy cơ này, khả năng sử dụng các hạt giống capsit rỗng của FMDV đã được xem xét. Những hạt này bao gồm các protein cấu trúc của FMDV nhưng không có tính sao chép và không có tính truyền nhiễm bởi vì chúng không có hệ gen ARN. Vì cấu trúc bên ngoài của capsit rỗng cần phải giống với virus kiểu đại, capsit rỗng cần phải có tính gây miễn dịch và kháng nguyên một cách tương tự.

Một vài nỗ lực nhằm sản xuất các hạt capsit FMD rỗng được tiến hành, nhưng đã có các vấn đề tái diễn liên quan đến hiệu suất và tính ổn định của sản phẩm.

Hệ thống biểu hiện virus vaccinia đã được sử dụng để biểu hiện catxet P1-2A-3C (Abrahams *et al* (1995) J. Gen Virol. 76:3089-3098). Đã phát hiện được rằng sự

biểu hiện cơ định của catxet là không thành công, nhưng các thể tái tổ hợp vv/FMDV (vacxin virut/FMDV) có thể được phân lập khi catxet được đặt dưới sự kiểm soát của thể thực khuẩn vùng khởi đầu T7. Tuy nhiên, một hệ thống như vậy không thể dùng được cho quá trình biểu hiện kéo dài của capsit rỗng bởi vì sau một thời gian, độc tính của catxet P1-2A-3C sẽ thắng thế. Cũng có vấn đề là sẽ cần đến sự biểu hiện của T7 Pol ổn định để thúc đẩy quá trình sản xuất P1-2A-3C. Có thể đạt được mục tiêu này ở quy mô nhỏ trong nuôi cấy mô, nhưng sẽ không thể ngoại suy điều này để áp dụng cho quy mô sản xuất. Ngoài ra, các sản phẩm được sản xuất trong hệ thống vaccinia không khả thi về mặt thương mại dùng cho ứng dụng y khoa hoặc thú y.

Li *et al* (2008) (PLoS ONE 28:3(5) e2273) thông báo về sự biểu hiện của các protein capsit của virut FMDV trong hệ biểu hiện baculovirut-tằm. Virut tái tổ hợp biểu hiện các vùng mã hóa nguyên vẹn của P1-2A và 3C được sử dụng để tiêm cho tằm và sau đó, dịch bạch huyết của máu thu được từ tằm chết. Đã biết được rằng chế phẩm của “những kháng nguyên được biểu hiện” này đã gây ra đáp ứng kháng thể kháng FMDV ở gia súc. Tuy nhiên, bản chất của “những kháng nguyên được biểu hiện” hoàn toàn không rõ ràng, và các tác giả này dường như cho rằng nó là “vacxin cấu trúc dưới đơn vị” trái ngược với capsit rỗng.

Cao *et al* ((2009) Veterinary Microbiology 137:10-17) mô tả hệ thống baculovirut tái tổ hợp có tác dụng biểu hiện một cách đồng thời các gen dùng cho protein P12A và 3C của FMDV từ các vùng khởi đầu riêng biệt. Phương pháp thẩm tách Western (Tây) đã cho thấy rằng các protein capsit được xử lý đến một mức độ nào đó bởi proteaza 3C và các hạt capsit rỗng có thể quan sát được bằng cách soi kính hiển vi miễn dịch điện tử. Quá trình gây miễn dịch bằng chất chiết thô của capsit rỗng đã tạo ra đáp ứng miễn dịch, nhưng các mức của các kháng thể đặc hiệu FMDV và các kháng thể trung hòa thì thấp hơn mức của vacxin được bất hoạt thông thường. Dự đoán rằng điều này là do các mức thấp hơn của các hạt capsit rỗng. Kết luận được rằng cần phải có các nghiên cứu thêm nữa để cải thiện lượng biểu hiện protein và tình trạng lắp ráp capsit rỗng trong các tế bào côn trùng.

Do đó, có nhu cầu về một phương pháp cải tiến dùng để sản xuất capsit rỗng của virut có chức năng sản xuất sản phẩm ổn định gây miễn dịch ở mức hiệu suất hợp lý.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các tác giả sáng chế đã ngạc nhiên phát hiện ra rằng lý do của hiệu suất thấp mà về mặt lịch sử gắn liền với quá trình sản xuất capsit rỗng của FMDV là mức proteaza 3C quá cao trong tế bào chủ, điều này gây ra độc tính. Để sản xuất các hạt capsit rỗng với hiệu suất cao, cần thiết phải làm cân bằng sự biểu hiện và/hoặc hoạt tính của proteaza 3C, sao cho nó được biểu hiện/có hoạt tính đủ để phân cắt tiền chất protein capsit nhưng không được biểu hiện/có hoạt tính ở các mức mà gây ra độc tính trong tế bào chủ.

Vì vậy, theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến cấu trúc, mà khi được biểu hiện trong tế bào chủ, có khả năng sản xuất capsit rỗng của virut, cấu trúc này bao gồm:

(i) trình tự nucleotit mã hóa protein tiền chất capsit;

(ii) trình tự nucleotit mã hóa proteaza có khả năng phân cắt protein tiền chất capsit; và

(iii) yếu tố kiểm soát để kiểm soát sự biểu hiện của proteaza

sao cho, khi cấu trúc này có mặt trong tế bào chủ, thì yếu tố kiểm soát làm cho proteaza được biểu hiện ở mức đủ để phân cắt protein tiền chất capsit, nhưng không đủ để gây ra độc tính đáng kể trong tế bào chủ.

Yếu tố kiểm soát có thể thu được từ retrovirut, cụ thể là yếu tố kiểm soát có thể là vị trí dịch khung của retrovirut, như vị trí dịch khung của HIV-1. Vị trí dịch khung của HIV-1 gây ra sự dịch khung trong khoảng 5% của các ARN thông tin được dịch mã.

Vị trí dịch khung có thể nằm giữa trình tự nucleotit mã hóa protein tiền chất capsit và trình tự nucleotit mã hóa proteaza, sao cho khi cấu trúc này được dịch mã thì:

(1) nếu ribosom không trải qua quá trình dịch khung, thì nó tạo ra sản phẩm bị cắt cụt (sản phẩm này bao gồm protein tiền chất capsit nhưng không phải proteaza); nhưng

(2) nếu ribosom trải qua quá trình dịch khung, thì cả protein tiền chất capsit và proteaza được dịch mã.

Trong cấu trúc theo khía cạnh thứ nhất của sáng chế, cũng có thể làm giảm hoạt tính của proteaza. Ví dụ, proteaza có thể bao gồm ít nhất một sự đột biến mà làm giảm hoạt tính phân cắt protein tiền chất capsit của nó.

Protease (ví dụ, proteaza đột biến) có thể có hoạt tính phân cắt protein tiền chất capsit thấp hơn xấp xỉ 3 lần so với proteaza kiểu dại.

Capsit rỗng được sản xuất bởi tế bào chủ chứa cấu trúc theo khía cạnh thứ nhất của sáng chế có thể là các capsit của picornavirut, như capsit của virut gây bệnh lở mồm long móng (FMDV).

Để sản xuất capsit rỗng của FMDV, protein tiền chất có thể là P1 và proteaza có thể là 3C. Để làm giảm hoạt tính của proteaza 3C, có thể bao gồm sự đột biến, ví dụ, ở Cys142.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến vector chứa cấu trúc theo khía cạnh thứ nhất của sáng chế. Vector này có thể là, ví dụ, vector chuyển baculovirut, vector ADN, plasmit hoặc vector virut.

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề cập đến tế bào chủ chứa cấu trúc theo khía cạnh thứ nhất của sáng chế. Theo phương án thứ nhất, tế bào chủ có thể có khả năng tạo ra vector theo khía cạnh thứ hai của sáng chế. Theo phương án thứ hai, tế bào chủ có thể có khả năng tạo ra capsit rỗng của virut.

Tế bào chủ có thể là, ví dụ, tế bào côn trùng hoặc tế bào động vật có vú.

Các khía cạnh khác nữa của sáng chế liên quan đến:

(i) phương pháp sản xuất capsit rỗng của virus bằng cách biểu hiện cấu trúc theo khía cạnh thứ nhất của sáng chế trong tế bào chủ và thu hoạch capsit rỗng của virus do tế bào chủ sản xuất;

(ii) phương pháp sản xuất vaccin, bằng cách sản xuất capsit rỗng của virus bằng phương pháp nêu trên và kết hợp capsit rỗng của virus vào vaccin;

(iii) biểu hiện cấu trúc theo khía cạnh thứ nhất của sáng chế ở đối tượng sao cho capsit rỗng được sản xuất *in vivo* để điều trị và/hoặc phòng ngừa bệnh ở đối tượng;

(iv) cấu trúc theo khía cạnh thứ nhất của sáng chế hoặc vector theo khía cạnh thứ hai của sáng chế để dùng trong phòng ngừa và/hoặc điều trị bệnh;

(v) cấu trúc theo khía cạnh thứ nhất của sáng chế, hoặc vector theo khía cạnh thứ hai của sáng chế được sử dụng để sản xuất được phẩm dùng để phòng ngừa và/hoặc điều trị bệnh;

(vi) yếu tố kiểm soát retrovirus được sử dụng để kiểm soát quá trình biểu hiện của protein picornavirus; và

(vii) cấu trúc mà bao gồm trình tự nucleotit mã hóa protein picornavirus dưới sự kiểm soát của yếu tố kiểm soát retrovirus.

Các vaccin trên cơ sở “capsit rỗng” thuận lợi so với các vaccin mầm bệnh nguyên vẹn chưa được bất hoạt truyền thống (ví dụ, đối với FMD) do không đòi hỏi các điều kiện chứa có độ an toàn cao để sản xuất, do đó sẽ giảm bớt nguy cơ bất kỳ về sự “tẩu thoát” virus. Chúng cũng không có tính truyền nhiễm, dễ thao tác và (về quan điểm sáng chế) dễ bào chế và việc bào chế không đòi hỏi chi phí cao.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 - Vector biểu hiện pOPINE5949-FS. Vector này là dẫn xuất của vector thương mại pTriEx1,1 (EMD Sciences) nhưng đã được sửa đổi cho phương pháp tách dòng vô tính không có đường nối (seamless cloning). Những đặc tính nổi bật của vector này và các vị trí trong số những vị trí cắt giới hạn dùng để chẩn đoán được thể hiện. Bước then chốt cần thiết cho sự biểu hiện thành công đối với capsit rỗng của FMDV là

đưa trình tự mã hóa vị trí dịch khung HIV-1 lên phía trước của vùng mã hóa 3C giữa vị trí cắt giới hạn Bsu36I và vị trí NotI duy nhất. Kết quả là, tất cả các ARN thông tin có nguồn gốc từ vùng khởi đầu p10 hoặc CMV dịch mã protein tiền chất P1 nhưng chỉ một phân nhóm dịch mã proteaza 3C. Khi được sử dụng để tạo baculovirus tái tổ hợp, trình tự giữa ORF603 cùng chiều kim đồng hồ với ORF1629 tái tổ hợp với hệ gen virus. Sau đó, vùng khởi đầu P10 được hoạt hóa như là một phần của chu kỳ gây nhiễm baculovirus sản xuất sản phẩm tái tổ hợp trong tế bào bị nhiễm.

Fig.2 - So sánh mức biểu hiện giữa baculovirus tái tổ hợp mã hóa P1-2A-3B3-3C (vết phải) hoặc P1-2A-3B3-3C_{163S} (vết trái). Việc bất hoạt hoạt tính 3C tránh cho tình trạng tổng hợp dư thừa P1.

Fig. 3 - Trình tự được sử dụng để gây ra sự dịch khung ở khớp nối P1-3C. Những đặc tính chủ chốt là sự chạy của uraxil (được gạch dưới) khi hiện tượng trượt xảy ra sau đó là nút giả mà làm cho ribosom ngừng để thúc đẩy sự trượt.

Fig. 4 - Việc đưa trình tự dịch khung HIV-1 vào trình tự FMDV. Khung đọc P1 là phần bên trên trong hai phần và sự chèn tạo ra phần cắt cụt của sản phẩm được dịch mã ở codon kết thúc được đánh dấu màu đỏ. Dịch khung A-1 ở phần bắt đầu của trình tự được chèn (hộp vàng cam) tạo ra phần chỉnh sửa của khung đọc để bao gồm phần dịch mã 3C (khung dưới).

Fig. 5 - Đánh giá hoạt tính *in vitro* của proteaza 3C được gây đột biến ở gốc 142. Lưu ý rằng 142T và 142S đều làm giảm hoạt tính khi so với trình tự mẹ.

Fig. 6 - Cây phát sinh loài picornavirus. Họ có quan hệ gần gũi có chung cách thức mã hóa và chu kỳ sao chép; những gì được quan sát đối với virus đã được nghiên cứu kỹ như virus gây bệnh bại liệt (PV) và virus gây bệnh lở mồm long móng (FMDV) là đúng với các thành viên khác.

Có thể tìm thấy phần cây phát sinh loài và phần bàn luận trong: Hughes AL. (2004) *Phylogeny of Picornaviridae and differential evolutionary divergence of protein picornavirus proteins*. Infect Genet Evol. 4:143-52.

Fig. 7 - Bản đồ tuyến tính của catxet biểu hiện trong Fig.1 và các sản phẩm dịch mã có thể có của nó. Các mức tương đối được gợi ý của phần dịch mã của sản phẩm P1 và P1-2A-3B-FS-3C được lấy từ tài liệu chuyên ngành và không được xác định bằng thực nghiệm.

Fig. 8 - Độ tính của proteaza 3C. Các tế bào côn trùng được gây nhiễm bằng baculovirut tái tổ hợp biểu hiện FMDV P1 được bắt cặp với 3C. Trong hình A, vết 1 là đột biến trong vị trí hoạt động Cys ở gốc 163 và sự tổng hợp dư thừa của protein dung hợp P1-3C mà suy biến tự phát thành P1 là rõ ràng. Vết 2 là proteaza kiểu dại; sự tổng hợp rất ít của P1 của protein capsit hoàn chỉnh VP1 là rõ ràng. Trong hình B, các virut tái tổ hợp biểu hiện P1 (vết 1) và P1 được bắt cặp với 3C được làm giảm hoạt lực (vết 2) được so sánh. Bây giờ, phép tổng hợp mức cao được duy trì và tiền chất P1 được chuyển hóa theo hệ số tỷ lệ thành protein capsit hoàn chỉnh VP1. Các sản phẩm phân giải tế bào được phân giải bằng 10% SDS-PAGE và thẩm tách Western được dò bằng kháng huyết thanh FMDV đa hóa trị mà trong đó hầu hết hoạt tính phản ứng là chống lại VP1. Các lượng phân tử gam của VP0 và VP3 cũng có mặt nhưng không được phát hiện bởi huyết thanh này.

Fig. 9 - Dạng lắp ráp của capsit rỗng của FMDV. Phân tích gradien sucroza đối với các sản phẩm biểu hiện từ các tế bào côn trùng được gây nhiễm baculovirut tái tổ hợp, trong đó đã đạt được sự cải biến hoạt tính proteaza 3C. Một số tiền chất P1 chưa được xử lý, có thể là kết tụ, có mặt ở đáy của gradient, trong khi đó sản phẩm phân cắt VP1 tạo thành đỉnh rộng và mạnh trong các phần 35-45% sucroza.

Vị trí trong gradien là dự kiến về hạt được lắp ráp và không phải là kháng nguyên tan được.

Fig.10 - Thể hiện hình ảnh của capsit rỗng của FMDV typ huyết thanh A do quá trình biểu hiện baculovirut tạo ra. Các phần đỉnh từ gradien sucroza được gom và cô trước khi được hấp phụ lên lưới Formvar được phủ cacbon và được nhuộm âm tính bằng uranyl axetat. Nhìn thấy một số hạt có đường kính là 25nm (hai mũi tên). Lưu ý vết nhuộm bên trong hạt cho thấy chúng là rỗng.

Hạt thể hiện sự xác định về góc đặc biệt tốt phù hợp với cấu trúc hai mươi mặt là dạng mũi tên đỏ.

Fig.11 - Thể hiện hình ảnh về capsit rỗng của FMDV huyết thanh typ O do quá trình biểu hiện baculovirut tạo ra.

Fig.12 - Biểu đồ thể hiện sự kích thích các kháng thể đặc hiệu ở chuột lang khi đáp ứng lại quá trình gây miễn dịch bằng capsit tổng hợp. Hiệu giá kháng thể được đo bằng cách sử dụng (A) thử nghiệm trung hòa virut, và (B) ELISA phong bế pha lỏng. Quá trình gây miễn dịch chuột lang bằng capsit huyết thanh typ A tổng hợp dẫn đến kích thích hiệu giá kháng thể phù hợp với các mức được thể hiện là có tính bảo vệ trong các nghiên cứu trước.

Mô tả chi tiết sáng chế

CẤU TRÚC

Theo khía cạnh thứ nhất của sáng chế, sáng chế đề cập đến cấu trúc bao gồm

- (i) trình tự nucleotit mã hóa protein tiền chất capsit;
- (ii) trình tự nucleotit mã hóa proteaza có khả năng phân cắt protein tiền chất capsit; và
- (iii) yếu tố kiểm soát để kiểm soát sự biểu hiện của proteaza.

Thuật ngữ “trình tự nucleotit” bao gồm trình tự ARN hoặc ADN. Nó có thể là sợi đơn hoặc sợi kép. Nó có thể là, ví dụ, ARN thông tin hoặc ADN hỗ trợ tái tổ hợp hệ gen.

Cấu trúc này có thể là trình tự nucleotit bao gồm các trình tự nucleotit (i) và (ii), có thể là theo cách kề nhau. Có thể có một đoạn trình tự giữa các trình tự nucleotit (i) và (ii). Yếu tố kiểm soát có thể có mặt trong đoạn trình tự này, sao cho nó kiểm soát được quá trình biểu hiện của proteaza nhưng không kiểm soát hoặc tác động đến quá trình biểu hiện của protein tiền chất capsit.

Cấu trúc này có thể có mặt như là một phần của plasmit, vector chuyển hoặc hệ gen tế bào chủ (xem dưới đây).

YẾU TỐ KIỂM SOÁT

Cấu trúc theo khía cạnh thứ nhất của sáng chế bao gồm yếu tố kiểm soát có tác dụng kiểm soát sự biểu hiện của proteaza. Yếu tố kiểm soát có thể, ví dụ, ít nhất kiểm soát một phần quá trình phiên mã và/hoặc dịch mã của proteaza.

Cụ thể là, yếu tố kiểm soát làm cho proteaza được biểu hiện ở mức đủ để phân cắt protein tiền chất capsit, nhưng không đủ để gây ra độc tính đáng kể trong tế bào chủ.

Sự phân cắt protein tiền chất capsit có thể được phân tích bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, chất chiết protein tái tổ hợp từ các tế bào chủ có thể được tách bằng cách điện di trên gel và các protein đã được tách được chuyển lên trên màng nitro-xenluloza dùng cho phương pháp thấm tách Western. Thấm tách Western bằng kháng thể kháng virus sẽ cho thấy mức độ và quy mô của sự phân cắt do proteaza gây ra.

Ví dụ, đối với FMDV, protein tiền chất capsit chưa được xử lý (P1-P2A) sẽ xuất hiện ở dạng dải là 81 kDa, và sự phân cắt có thể tạo ra VP31 (47kDa), VP3 (24kDa) và/hoặc VP1 (24 kDa).

Cũng có thể suy ra quá trình phân cắt protein tiền chất capsit bằng quá trình sản xuất capsit rỗng (xem dưới đây).

Mức độ độc tính đối với tế bào trong tế bào chủ do proteaza gây ra cũng có thể được phân tích bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, đào thải bằng phẩm xanh trypan có thể được sử dụng, ví dụ, bằng cách trộn các thể tích bằng nhau là 0,4% phẩm xanh trypan với các tế bào và xác định mức khả năng sống như được đo bằng máy đếm tế bào tự động Countess (Invitrogen).

Mức độ độc tính không được xem là “đáng kể” nếu nhỏ hơn 10%, nhỏ hơn 5% hoặc nhỏ hơn 2% tế bào chủ được làm cho không có khả năng sống bằng proteaza. Mức độ độc tính không được xem là “đáng kể” nếu tế bào chủ có khả năng biểu hiện protein tiền chất capsit ở 80, 90 hoặc 95% của mức mà có thể đạt được với sự vắng mặt

của hiện tượng đồng biểu hiện của protein 3C (bỏ qua hiệu quả của sự phân cắt protein tiền chất capsit bởi proteaza).

Yếu tố kiểm soát có thể làm giảm mức biểu hiện của proteaza 3C, so với mức biểu hiện tạo thành nếu yếu tố kiểm soát vắng mặt.

Yếu tố kiểm soát có thể là vị trí dịch khung mà làm cho ribosom dịch mã bỏ qua (hoặc lặp lại) ít nhất một bazơ theo tỷ lệ phần trăm của các trường hợp khi đọc ARN thông tin. Trong suốt quá trình dịch khung, các ribosom dịch mã có thể bị kích thích để trượt một nucleotit về trước hoặc về sau ở một điểm phân biệt trong sản phẩm phiên mã, mà sau đó, quá trình tổng hợp protein lần lượt tiếp tục trong khung đọc +1 hoặc -1.

Tín hiệu dịch khung ribosom -1 được lập trình được xác định đặc điểm rõ và một số hiện tượng biến dịch khung -1 của vi khuẩn cũng đã được ghi nhận. Một số virus gây nhiễm các tế bào có nhân thực sử dụng các phần dịch khung ribosom -1 được lập trình, thể hiện rằng các yếu tố *cis* liên quan đến quá trình làm dịch khung hoạt động trong sinh vật có nhân thực. Trong các hệ thống virus, tính hiệu quả của quá trình dịch khung là yếu tố quyết định thiết yếu theo hệ số tỷ lệ của các sản phẩm protein virus được tổng hợp, sản phẩm này phải được duy trì một cách ổn định để nhân giống virus hiệu quả.

Virus gây suy giảm miễn dịch ở người (HIV) -1 sử dụng quá trình dịch khung ribosom để sản xuất tỷ lệ cần thiết của polyprotein Gag và Gag-Pol. Cấu trúc vòng thân (stem-loop) của tín hiệu dịch khung được cho là gây cản trở ribosom và gây ra hiện tượng trượt theo chiều 5', điều này làm cho hiện tượng dịch khung -1 và sau đó, là dịch mã tiếp tục trong khung mới (xem Fig.3).

Yếu tố kiểm soát có thể gây ra hiện tượng dịch khung ở giữa 1-20%, 1-10%, 3-7% hoặc 5% ARN thông tin được dịch mã.

Trình tự dịch khung có thể bao gồm sự chạy của 6 uraxil, nơi hiện tượng trượt xảy ra, sau đó là trình tự có khả năng tạo nút giả mà làm cho ribosom ngừng, thúc đẩy sự trượt.

Yếu tố kiểm soát có thể là phần đầu nguồn của trình tự nucleotit mã hóa proteaza và phần cuối nguồn của protein tiền chất capsit mã hóa trình tự.

CAPSIT RỖNG

“Capsit rỗng” là thực thể bao gồm vỏ protein của virus nhưng thiếu hệ gen ARN hoặc ADN. Capsit rỗng cần phải có tính kháng nguyên và gây miễn dịch theo cùng một cách với vaccin kiểu dại do nó giữ lại những epitop cấu trúc tương tự, nhưng sẽ không tạo ra sự nhiễm, do thiếu hệ gen.

Quá trình sản xuất capsit rỗng có thể được kiểm tra hoặc xác minh bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này như ly tâm mật độ sucroza hoặc soi kính hiển vi điện tử (Abrahams *et al* (1995) như trên đây).

Các kháng thể đơn dòng có thể được sử dụng đặc hiệu với các epitop cấu tạo trên virus kiểu dại để kiểm tra xem liệu tính kháng nguyên của capsit rỗng có được giữ lại hay không.

PROTEAZA

Proteaza có thể là proteaza của virus bất kỳ có chức năng phân cắt protein tiền chất capsit như là một bước của quá trình sản xuất và lắp ráp capsit.

Như được đề cập trên đây, đối với picornavirus, như FMDV, quá trình xử lý bằng phân giải protein đối với tiền chất P1 thành VP0 (VP2 cộng với VP4), VP3 và VP1 xảy ra bằng phương tiện là proteaza 3C của virus hoặc tiền chất 3CD của nó.

Trình tự của proteaza 3C của FMDV kiểu dại từ chủng FMDV typ A được trình bày dưới đây:

```
1 sgapptdlqk mvmgntkpve lildgktvai ccatgvfgta ylvprhlfae kydkimldgr
61tmtdsdyrvf efeikvkgqd mlsdaalmvl hrgnrvrdir khfrdvarmk kgtpvvgvin
121 nadvgrlifs gealtykdiv vcmdgdtmpg lfaykaatka gycggavlak dgaetfivgt
181 hsaggngvgy cscvsrsmf kmkahidpep hhe
```

Cấu trúc tinh thể của proteaza 3C đã được làm sáng tỏ và phép phân tích gây đột biến được thực hiện để cung cấp thông tin về điểm hoạt động (Sweeney *et al* (2007) J. Virol. 81:115-124).

Cấu trúc theo khía cạnh thứ nhất của sáng chế có thể bao gồm ít nhất một sự đột biến mà làm giảm hoạt tính phân cắt protein tiền chất capsit của nó.

Đột biến này có thể, ví dụ, ở trong điểm hoạt động của proteaza. Được cho rằng bộ ba xúc tác trong điểm hoạt động cấu thành bởi các gốc 163, 46 và 84. Sự đột biến này có thể bao gồm loại bỏ hoặc thay thế một hoặc nhiều trong số những gốc này. Sự đột biến sẽ làm giảm, nhưng không loại bỏ hoạt tính phân cắt protein tiền chất capsit.

Cấu trúc tinh thể của proteaza 3C cho thấy rằng có dải β mà gấp cuộn trên rãnh liên kết peptit và góp phần vào sự nhận diện cơ chất (Sweeney *et al* (2007) như trên đây). Đột biến này có thể, ví dụ, ở trong dải β (các gốc 138 đến 150). Đột biến này có thể, ví dụ, là thay thế ở gốc 142. Đột biến này có thể là đột biến C142V, C142A hoặc C142T. Đột biến này có thể là đột biến C142T.

Đột biến này có thể làm giảm hằng số đặc hiệu đối với enzym là từ 3 lần đến 2 lần, hoặc 3 lần đến 1,5 lần. Ví dụ, nếu hằng số đặc hiệu đối với enzym kiểu đại là 990 k_{cat}/K_m , thì hằng số đặc hiệu đối với enzym đột biến có thể là từ 495 đến 330, hoặc từ 660 đến 330 k_{cat}/K_m .

Proteasea đột biến có thể có 10-50%, 20-40% hoặc 30% hoạt tính phân cắt protein tiền chất capsit so với hoạt chất proteaza kiểu đại.

PROTEIN TIỀN CHẤT CAPSIT

Protein tiền chất capsit có thể (đối với picornavirut) là P1, chất này được phân cắt bằng proteaza 3C thành VP0, VP3 và VP1.

Theo cách khác, protein tiền chất capsit có thể là P1-2A. Proteaza 2A phân cắt chính nó ở đầu cuối C của nó để giải phóng P1-2A khỏi P2.

Protein tiền chất capsit có thể phân cắt được bằng proteaza để tạo (một phần của) capsit rỗng. Protein tiền chất có thể bao gồm tất cả các loại protein cần thiết để tạo capsit rỗng, chất này có thể sản xuất được bằng quá trình phân cắt proteaza.

VECTOR

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến vector chứa cấu trúc theo khía cạnh thứ nhất của sáng chế.

Vector này có thể là, ví dụ, plasmit, hoặc vector chuyển baculovirut, vector ADN hoặc vector virut.

Vector này có thể có khả năng chuyển cấu trúc này vào tế bào chủ.

Vector này có thể có khả năng chuyển cấu trúc này vào tế bào thực vật, côn trùng, hoặc tế bào động vật.

Hệ thống biểu hiện baculovirut được sử dụng rộng rãi để sản xuất virut và các hạt giống virut.

Vector theo sáng chế có thể là, ví dụ, một hoặc nhiều plasmit chuyển được sử dụng để biến nạp tế bào (ví dụ, tế bào *E. coli*) mà trong đó vector con thoi baculovirut được nhân giống.

Cấu trúc theo khía cạnh thứ nhất của sáng chế có thể là hoặc bao gồm ADN baculovirut tái tổ hợp được tạo ra bởi sự chuyển vị đặc hiệu vị trí của ADN từ vector chuyển vào vector con thoi baculovirut (bacmid). ADN này có thể được chuyển nhiễm thành các tế bào côn trùng để tạo ra baculovirut tái tổ hợp.

Vector theo sáng chế có thể là baculovirut tái tổ hợp thu được.

Các vector virut khác bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, vector adenovirut, vector virut liên quan đến adeno (adeno-associated viral) (AAV), vector virut ecpet, vector retrovirut (trong đó có vector lentivirut).

Các retrovirut thường được sử dụng trong các phương pháp liệu pháp gen. Các retrovirut tái tổ hợp như virut gây bệnh bạch cầu trên chuột Moloney có khả năng kết hợp vào hệ gen của vật chủ theo phương thức ổn định. Chúng chứa transcriptaza

ngịch đảo cho phép kết hợp vào hệ gen của vật chủ. Các vectơ retrovirut đã được sử dụng trong một số thử nghiệm lâm sàng được FDA phê duyệt như thử nghiệm SCID-X1.

Sự bất cập đầu tiên trong việc sử dụng các retrovirut như retrovirut Moloney liên quan đến yêu cầu để các tế bào được phân chia một cách tích cực cho sự tải nạp. Kết quả là, các tế bào như tế bào thần kinh có khả năng kháng rất mạnh đối với tình trạng nhiễm bệnh và tải nạp bởi các retrovirut.

Lentivirut là phân nhóm của các retrovirut. Gần đây, chúng đã được làm thích ứng ở dạng phương tiện chuyển gen (các vectơ) do khả năng của chúng trong việc kết hợp vào hệ gen của các tế bào không phân chia. Hệ gen virut ở dạng ARN được phiên mã ngược khi virut xâm nhập tế bào để tạo ra ADN, sau đó, chất này được chèn vào hệ gen ở vị trí ngẫu nhiên bởi enzym virut integraza. Vectơ, bây giờ được gọi là provirut, vẫn nằm trong hệ gen và được truyền sang thế hệ con của tế bào khi nó phân chia.

Vì lý do an toàn, các vectơ lentivirut không bao giờ mang gen cần thiết cho quá trình sao chép của chúng. Để sản xuất lentivirut, một vài plasmit được chuyển nhiễm vào cái gọi là dòng tế bào đóng gói, thường là HEK 293. Một hoặc nhiều plasmit, thường được gọi là plasmit đóng gói, mã hóa protein virion, như capsit và transcriptaza nghịch đảo. Một plasmit khác chứa vật liệu di truyền sẽ được phân phối bởi vectơ. Plasmit này được phiên mã để tạo ra hệ gen ARN virut sợi đơn và được đánh dấu bởi sự có mặt của trình tự ψ (psi). Trình tự này được sử dụng để đóng gói hệ gen vào virion.

Trái ngược với lentivirut, ADN của adenovirut không kết hợp vào hệ gen và không được sao chép trong suốt quá trình phân chia tế bào. Những ứng dụng trước tiên của chúng là trong liệu pháp gen và chủng ngừa. Vì con người thường tiếp xúc với adenovirut, virut này gây ra tình trạng lây nhiễm mắt, dạ dày-ruột và hô hấp, chúng gây ra đáp ứng miễn dịch nhanh với những hậu quả nguy hiểm tiềm tàng. Để giải quyết vấn đề này, các nhà khoa học hiện đang nghiên cứu các adenovirut mà con người không có tính sinh miễn dịch đối với nó.

Virut liên quan đến adeno (AAV) là virut nhỏ mà lây nhiễm cho con người và một số loài linh trưởng khác. Hiện tại chưa biết là AAV gây bệnh và hậu quả là, virut này gây ra đáp ứng miễn dịch rất nhẹ. AAV có thể gây nhiễm cho cả tế bào phân chia và tế bào không phân chia và có thể sát nhập hệ gen của nó vào hệ gen của tế bào chủ. Những đặc điểm này làm cho AAV trở thành một ứng viên rất hấp dẫn dùng để tạo các vector virut cho liệu pháp gen.

TẾ BÀO CHỦ

Sáng chế còn đề xuất tế bào chủ chứa cấu trúc theo khía cạnh thứ nhất của sáng chế.

Tế bào chủ có thể có khả năng tạo ra vector (như, vector virut) theo khía cạnh thứ hai của sáng chế.

Tế bào chủ có thể là tế bào đóng gói hoặc tế bào sản xuất, có khả năng tạo ra vector virut.

Tế bào chủ có thể là tế bào côn trùng Sf9, có khả năng tạo ra baculovirut tái tổ hợp theo khía cạnh thứ hai của sáng chế.

Tế bào chủ có thể có khả năng tạo ra capsit rỗng của virut.

Tế bào chủ có thể là tế bào vi khuẩn, tế bào côn trùng, tế bào thực vật hoặc tế bào động vật.

CÁC PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT

Sáng chế còn đề xuất phương pháp sản xuất capsit rỗng của virut bao gồm các bước dưới đây :

- (i) biểu hiện cấu trúc theo khía cạnh thứ nhất của sáng chế trong tế bào chủ; và
- (ii) thu hoạch capsit rỗng của virut do tế bào chủ sản xuất.

Cấu trúc của sáng chế có thể được đưa vào tế bào chủ bằng, ví dụ, quá trình chuyển nhiễm hoặc tải nạp bằng vector theo khía cạnh thứ hai của sáng chế.

Nếu capsit rỗng của virus được biểu hiện bên ngoài tế bào chủ, thì chúng có thể được thu hoạch từ phần dịch nổi ở trên.

Nếu capsit rỗng của virus được biểu hiện bên trong tế bào chủ, thì chúng có thể được thu hoạch bằng, ví dụ,

- (i) sự phân giải các tế bào chủ (ví dụ, bằng đông-rã đông); và tùy ý
- (ii) cô (ví dụ bằng PEG-kết tủa), và /hoặc
- (iii) tinh chế.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp dùng cho việc sản xuất vaccin, phương pháp này bao gồm bước sản xuất capsit rỗng của virus bằng phương pháp như vậy và kết hợp capsit rỗng của virus vào vaccin.

Vaccin cũng có thể bao gồm chất pha loãng được dụng, chất phụ trợ hoặc tá dược.

CÁC VIRUT

Sáng chế đề cập đến việc sản xuất capsit rỗng của một virus cụ thể.

Virus này có thể là, ví dụ, picornavirus.

Các ví dụ về chi picornavirus, loài và các typ huyết thanh được đưa ra trong bảng 1:

Bảng 1

Chi	Loài (* biểu đạt loài typ)	Typ huyết thanh
<i>Enterovirut</i>	<i>Enterovirut của bò</i>	hai typ: enterovirut ở bò (BEV) 1 và BEV-2
	<i>Enterovirut A của người</i>	21 typ bao gồm một số virut Coxsackie A và enterovirut
	<i>Enterovirut B của người</i>	57 typ bao gồm enterovirut, virut Coxsackie B, echovirut, và virut gây bệnh mụn nước ở lợn
	<i>Enterovirut C của người</i>	14 typ bao gồm một số virut Coxsackie A và enterovirut
	<i>Enterovirut D của người</i>	ba typ: EV-68, EV-70, EV-94
	<i>Virut bệnh bại liệt *</i>	ba typ: virut bại liệt (PV) 1, PV-2 và PV-3
	<i>Enterovirut A của lợn</i>	một typ: enterovirut lợn (PEV) 8
	<i>Enterovirut B của lợn</i>	hai typ: PEV-9 và PEV-10
	<i>Enterovirut A của khỉ</i>	một typ: enterovirut ở khỉ (SEV) A1
<i>Rhinovirut</i>	<i>Rhinovirut A * của người</i>	74 typ huyết thanh
	<i>Rhinovirut B của người</i>	25 typ huyết thanh
	<i>Rhinovirut C của người</i>	7 typ huyết thanh

<i>Hepatovirut</i> (còn được phân loại là <i>Heparnavirut</i>)	Virut viêm gan A *	một typ huyết thanh: virut viêm gan (HAV)
	virut giống virut viêm não-tủy ở gia cầm	một typ: virut viêm não-tủy ở gia cầm (AEV)
<i>Cardiovirut</i>	Virut viêm não-cơ tim *	một typ huyết thanh: virut viêm não-cơ tim (EMCV). Lưu ý: virut Columbia SK, virut Maus Elberfeld và Mengovirut là những chủng của EMCV.
	<i>Theilovirut</i>	năm typ: virut viêm não-tủy ở chuột Theiler (TMEV), virut viêm não-tủy Vilyuisk ở người (VHEV), virut giống Theiler (TLV) của chuột cống, virut Saffold (SAFV) 1 và sAFV-2
<i>Aphthovirut</i>	Virut gây bệnh lở mồm long móng ^[2] *	bảy typ huyết thanh: O, A, C, các Lãnh thổ Nam Châu Phi (SAT) 1, SAT 2, SAT 3 và Châu Á 1
	Virut viêm mũi A ở ngựa	Một typ huyết thanh: virut viêm mũi ở ngựa (ERAV)
<i>Parechovirut</i>	<i>Parechovirut ở người</i> *	sáu typ: Parechovirut ở người (HPeV) 1, HPeV-2, HPeV-3, HPeV-4, HPeV-5, HPeV-6
	<i>Virut Ljungan</i>	Có thể là ba typ đã được mô tả
<i>Erbovirut</i>	<i>Virut viêm mũi B ở ngựa</i> *	Ba typ: Virut viêm mũi B ở ngựa (ERBV) 1, ERBV-2, ERBV-3
<i>Kobuvirut</i>	Virut <i>Aichi</i> *	Một typ huyết thanh: virut Aichi (AiV)
	<i>Kobuvirut ở bò</i>	Một typ huyết thanh: kobuvirut ở bò (BKV)

<i>Teschovirus</i>	<i>Teschovirus ở lợn*</i>	11 typ huyết thanh: teschovirus ở lợn (PTV) 1 đến PTV-11
--------------------	---------------------------	--

Cũng có các picornavirus ở thực vật mà đã được phân loại thành siêu họ Secoviridae chứa các họ Comoviridae (các chi Comovirus, Fabavirus và Nepovirus, Sequiviridae (các chi Sequivirus và Waikavirus) và một số chi chưa được xác định (Cheravirus, Sadwavirus và Torradovirus (loài typ virus Tomato torrado)).

Virus này có thể là virus ở ong, như virus gây chứng liệt cấp tính ở Israel; virus ở ong Kashmir; virus Kakugo; virus Varroa Destructor; virus Sacbrood; virus gây biến dạng cánh (Deformed Wing Virus). Có sự liên quan giữa tất cả các virus này và sự mất đi của những đàn ong, vì vậy có nhu cầu về xét nghiệm chẩn đoán để xác định nguyên nhân của sự mất đi của quần thể.

Virus có thể là mầm bệnh động vật, như FMDV hoặc virus gây bệnh mụn nước ở lợn. Virus này có thể là mầm bệnh ở người, như Enterovirus 71 (virus này gây ra những đợt bùng phát của bệnh tiêu chảy); virus Coxsackievirus B (gây bệnh đái tháo đường và viêm cơ tim), hoặc virus gây bệnh bại liệt.

Việc sản xuất capsit rỗng dùng cho các virus mà (ở trạng thái tự nhiên của chúng) đóng vai trò làm mầm bệnh cho người hoặc mầm bệnh cho động vật là quan trọng đối với việc tạo các vaccin và các dược phẩm.

VACCIN

Thuật ngữ ‘vaccin’ như được sử dụng ở đây được dùng để chỉ chế phẩm mà, khi được cung cấp cho đối tượng, gây ra hoặc kích thích đáp ứng miễn dịch có tính bảo vệ. Vaccin này có thể làm cho sinh vật miễn dịch với một bệnh cụ thể.

Vaccin có thể được sử dụng với mục đích điều trị, để điều trị tình trạng lây nhiễm hiện có; hoặc với mục đích phòng bệnh, để ngăn chặn hoặc làm giảm khả năng lây nhiễm và/hoặc phòng ngừa hoặc làm giảm khả năng tiếp xúc với bệnh.

Vacxin bao gồm một hoặc nhiều thực thể để gây miễn dịch và tùy ý một hoặc nhiều chất phụ trợ, tá dược, chất mang và chất pha loãng.

Vacxin cũng có thể bao gồm, hoặc có khả năng biểu hiện, hoạt chất khác, ví dụ, một chất mà có thể kích thích sự bảo vệ sớm trước đáp ứng miễn dịch thích ứng do thực thể gây miễn dịch gây ra. Chất này có thể là chất chống virus, như interferon typ I. Theo cách khác, hoặc ngoài ra, chất này có thể là yếu tố kích thích khuẩn lạc đại thực bào-bạch cầu hạt (GM-CSF).

Thực thể gây miễn dịch có thể, ví dụ, theo cấu trúc của khía cạnh thứ nhất của sáng chế, vectơ của khía cạnh thứ hai của sáng chế hoặc capsit rỗng do tế bào chủ của khía cạnh thứ ba của sáng chế tạo ra.

Gây miễn dịch bằng ADN có một số ưu điểm so với vacxin trên cơ sở protein. Ví dụ, vacxin ADN tạo ra sự biểu hiện nội sinh của kháng nguyên *in vivo*, cho phép peptit kháng nguyên được trình diễn vào hệ miễn dịch thông qua cả con đường MHC nhóm I và II, do đó, khởi đầu cho không chỉ tế bào T CD4+, mà cả tế bào T CD8+ nữa. Vì vậy, các vacxin ADN có thể gây ra cả đáp ứng miễn dịch dịch thể và đáp ứng miễn dịch tế bào mạnh. Việc sử dụng plasmid ADN làm vacxin cũng có thể khởi động hệ miễn dịch tự nhiên của vật chủ, thông qua motif CpG chưa được metyl hóa trong khung chính plasmid vi khuẩn và thụ thể giống Toll 9 (TLR9).

Vacxin này có thể thiếu gen mã hóa protein không cấu trúc 2B và 2C mà có thể gây nhiều các đáp ứng miễn dịch tế bào bằng cách điều hòa ngược MHC và tiết cytokin (Moffat et al., (2005) J Virol. 79. 4382-95 và Moffat et al., (2007) J Virol. 81. 1129-39).

Nhiều vacxin FMD có bán trên thị trường là đa hóa trị cung cấp toàn diện chống lại các typ huyết thanh FMD khác nhau. Vì vậy, vacxin theo sáng chế có thể bao gồm nhiều thực thể gây miễn dịch, mỗi loại hướng đến một typ huyết thanh khác và/hoặc các phân typ khác nhau trong typ huyết thanh đã cho.

ĐIỀU TRỊ/PHÒNG NGỪA BỆNH

Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều trị và/hoặc phòng ngừa bệnh ở đối tượng bằng cách cho dùng lượng hữu hiệu của vacxin như vậy.

Thuật ngữ ‘phòng ngừa’ nhằm đề cập đến việc ngăn chặn, làm trì hoãn, gây trở ngại hoặc cản trở sự tiếp xúc với bệnh. Vacxin này có thể, ví dụ, phòng ngừa hoặc làm giảm khả năng virus gây nhiễm xâm nhập tế bào.

‘Điều trị’ như được sử dụng ở đây được dùng để chỉ sự chăm sóc đối tượng bị bệnh, nhằm cải thiện, chữa lành hoặc làm giảm các triệu chứng của bệnh, hoặc làm giảm hoặc chặn đứng sự tiến triển của bệnh. Nó cũng được dùng để chỉ sự điều trị mà làm cho đối tượng bị nhiễm virus không có tính lây nhiễm đối với các đối tượng khác.

Đối tượng này có thể là động vật hoặc thực vật bất kỳ mà dễ mắc bệnh. Đối tượng này có thể là người, côn trùng (như ong), thực vật, động vật có vú hoặc động vật khác.

Đối với FMD, đối tượng có thể là động vật có móng guốc. Các động vật dễ mắc FMD bao gồm gia súc, cừu, lợn, và dê trong số động vật nuôi, cũng như lạc đà không bướu (lạc đà, lạc đà llama, alpaca, guanaco và vicuña). Một số động vật hoang dã như nhím Âu, coypu, và các động vật có móng guốc hoang dã bất kỳ như hươu và các động vật sở thú trong đó có voi cũng có thể mắc FMD.

CÁCH DÙNG THUỐC

Các phương pháp phân phối gen không virus bao gồm việc sử dụng phương pháp vật lý (phân phối gen không có chất mang) và phương pháp hóa học (phân phối gen trên cơ sở vector tổng hợp). Các phương pháp vật lý, trong đó có tiêm bằng kim, xung điện, súng bắn gen, siêu âm, và phân phối thủy động lực học, sử dụng lực vật lý có tác dụng thấm vào màng tế bào và tạo thuận lợi cho sự chuyển gen nội bào. Các phương pháp hóa học sử dụng hợp chất tổng hợp hoặc hợp chất có trong tự nhiên làm chất mang để phân phối trình tự nucleotit vào tế bào.

Phương pháp phân phối thích hợp nhất sẽ phụ thuộc vào hệ phân phối được sử dụng để phân phối trình tự nucleotit vào tế bào đích. Ví dụ, đối với việc dùng plasmid,

chế phẩm plasmid có thể được cung cấp vào trong cơ, trong da hoặc sự kết hợp của các phương pháp trên đây .

Các vector virus có thể được cung cấp cho đối tượng bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này, như tiêm trực tiếp.

KIỂM SOÁT RETROVIRUT CỦA PROTEIN PICORNAVIRUT

Sáng chế còn đề cập đến việc sử dụng yếu tố kiểm soát retrovirus để kiểm soát quá trình biểu hiện của protein picornavirus và đề cập đến cấu trúc mà bao gồm trình tự nucleotit mã hóa protein picornavirus dưới sự kiểm soát của yếu tố kiểm soát retrovirus.

Yếu tố kiểm soát retrovirus có thể là vị trí dịch khung retrovirus, như vị trí dịch khung có thể thu được từ vị trí dịch khung HIV-1 có tác dụng kiểm soát sự biểu hiện của Gag và Gag-pol trong virus đó.

Protein picornavirus có thể là protein không cấu trúc, như proteaza. Protein picornavirus có thể có khả năng phân cắt protein tiền chất capsit. Protein picornavirus có thể là proteaza 3C từ picornavirus hoặc tiền chất 3CD của nó.

Sáng chế sẽ được mô tả thêm bằng các ví dụ, những ví dụ này được đưa ra nhằm giúp người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này thực hiện được sáng chế và không nhằm làm giới hạn phạm vi của sáng chế theo cách bất kỳ.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1 - Phân tích đột biến của proteaza 3C trong vector mà trong đó sự biểu hiện của protein này là dưới sự kiểm soát của vùng khởi đầu p10

Vector chuyển baculovirus pOPINE5949 mã hóa protein tiền chất capsit FMDV P1, sau đó là proteaza của FMDV 3C được kết nối bởi vùng đệm ngắn (2A-3B3) dưới sự kiểm soát của vùng khởi đầu baculovirus p10 mạnh (Fig.1). Phần lớn phần còn lại của hệ gen FMDV là mất đi. Khi được sử dụng để tạo ra baculovirus tái tổ hợp, kết quả lý thuyết là sự biểu hiện của protein dung hợp P1-2A-3B3-3C mà sẽ tự phân cắt để tạo các protein capsit VP1-4 hoàn chỉnh (được mã hóa bởi P1) và lắp ráp thành capsit của

virut. Kết quả thực tế của sự nhiễm bằng baculovirut tái tổ hợp như vậy là rất ít sản phẩm được tạo ra.

Lượng thấp này của sản phẩm là kết quả của độc tính 3C. Điều này được minh họa qua thực tế là sự bao gồm trong pOPINE5949, đột biến điểm đơn lẻ của điểm hoạt động xystein (Cys 163) của 3C cho phép có sự biểu hiện của các lượng phong phú của protein dung hợp P1-2A-3B3-3C (Fig.2). Điều này chính thức chứng minh rằng hoạt tính 3C là đặc điểm kiểm soát của phép tổng hợp FMDV tái tổ hợp.

Các phương pháp

Đột biến Cys 163 được đưa vào bằng phương pháp phát sinh đột biến hướng vị trí tiêu chuẩn và sau đó, catxet đột biến được tái biểu hiện.

Thẩm tách Western

Các mẫu protein được tách trên gel 10% Tris.HCl SDS-polyacrylamit đúc sẵn (BioRad) và được chuyển đến các màng Immobilon-P (Millipore) bằng cách sử dụng bộ thẩm tách bán khô. Các bộ lọc được phong bế trong một giờ ở nhiệt độ trong phòng bằng cách sử dụng TBS chứa 0,1% thể tích/thể tích Tween-20 (TBS-T), 5% trọng lượng/thể tích bột sữa. Kháng thể chuột lang sơ cấp chống virut FMDV typ A được sử dụng ở mức pha loãng là 1:1000 trong PBS-T, 5% trọng lượng/thể tích sữa bột trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau một vài lần rửa bằng TBS-T, các màng được ủ trong 1 giờ bằng kháng thể kháng chuột lang được tiếp hợp HRP và các kháng thể đã liên kết được phát hiện bằng phương pháp phát quang hóa học BM (Roche).

Ví dụ 2 - Sản xuất cấu trúc mà trong đó hoạt tính proteaza 3C và mức biểu hiện được giảm xuống

Để điều hòa hoạt tính của proteaza 3C giữa hai thái cực này, hai phương pháp được kết hợp như sau:

- 1) đưa yếu tố dịch khung vào vùng liên kết 3B giữa các trình tự mã hóa P1 và 3C gây ra mức giảm về lượng của 3C được tổng hợp; và
- 2) gây đột biến gốc 3C, Cys142, vì thế mà làm giảm hoạt tính của 3C

Yếu tố dịch khung là một đoạn của trình tự mà làm cho ribosom dịch mã bỏ qua một bazơ theo tỷ lệ phần trăm của các trường hợp khi đọc ARN thông tin. Yếu tố dịch khung được mô tả rõ là được mô tả đối với retrovirut HIV-1, virut này gây ra hiện tượng dịch khung -1 trong khoảng 5% ARN thông tin được dịch mã. Các tác giả sáng chế đã sử dụng trình tự được Dinman *et al.*, định nghĩa, (PNAS 16 tháng tư, 2002 quyển 99, số 8 5331-5336 (Fig.3).

Vì vậy, vector pOPINE5949-FS được tạo cấu trúc với trình tự dịch khung được chèn vào vùng liên kết 3B3 theo cách mà kết thúc được khung đọc ở vị trí này. Việc chèn trình tự dịch khung làm gián đoạn tính liên tục của ARN thông tin P1-2A-3B3-3C sao cho sản phẩm được dịch mã được cắt cụt trong vùng 3B3 và không có 3C nào được tạo ra (mặc dầu trình tự cuối dòng mã hóa nó là có mặt trong thông tin này). Tuy nhiên, sự dịch khung trừ 1 bằng ribosom trong vùng này tạo ra sự biểu hiện protein dung hợp P1-2A-3B3-3C bằng phân nhóm của ARN thông tin gắn kết bởi ribosom (Fig. 4). Nếu tần suất của sự biến dịch khung trong các tế bào côn trùng là giống với tần suất được đo trong tế bào động vật có vú, thì các sản phẩm của quá trình dịch mã sẽ là 95% P1-2A và 5% P1-2A-3B3-3C. Vì vậy, có mức thấp cân xứng của phép tổng hợp proteaza 3C.

Baculovirut tái tổ hợp được tạo cấu trúc bằng cách sử dụng trình tự pOPINE5949-FS thể hiện mô hình phân cắt phù hợp với việc tạo ra các mức thấp của proteaza 3C (dữ liệu không được thể hiện). Tuy nhiên, mức tổng của phép tổng hợp vẫn cho thấy một số độc tính đối với tế bào và hoạt tính của 3C được làm giảm thêm bằng sự phát sinh đột biến định hướng vị trí của trình tự 3C tại vị trí Cys 142, vị trí này có vai trò nhất định trong hoạt tính enzym (Sweeney *et al* (2007 - như trên đây)) (Fig. 5).

Ví dụ 3 - Sản xuất sản phẩm VP1 được phân cắt và capsit rỗng của FMDV

Sự kết hợp của dịch khung và gây đột biến 142T trong baculovirut tái tổ hợp đã tạo ra mức mong muốn của P1 và 3C và tạo ra các lượng đáng kể của sản phẩm VP1 được phân cắt, sản phẩm này lắp ráp với sản phẩm phân cắt khác để tạo capsit rỗng của FMDV.

Tất cả các công bố được đề cập trong phần mô tả trên đây được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Các thay đổi và cải biến khác nhau của các phương pháp và hệ thống được mô tả của sáng chế là rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình lĩnh vực này mà không nằm ngoài phạm vi và tinh thần của sáng chế. Mặc dầu sáng chế đã được mô tả chung với các phương án được ưu tiên cụ thể, cần hiểu rằng sáng chế như được yêu cầu bảo hộ không nên giới hạn quá vào các phương án cụ thể như vậy. Thực sự, các cải biến khác nhau của các phương án thực hiện sáng chế được mô tả mà là rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực virus học, sinh học phân tử hoặc lĩnh vực có liên quan là có ý bao hàm trong phạm vi của các điểm yêu cầu bảo hộ dưới đây.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Cấu trúc, mà khi được biểu hiện trong tế bào chủ, có khả năng sản xuất capsit rỗng của virus, cấu trúc này bao gồm:

(i) trình tự nucleotit mã hóa protein tiền chất capsit P1;

(ii) trình tự nucleotit mã hóa proteaza 3C có khả năng phân cắt protein tiền chất capsit picornavirus, trong đó proteaza này bao gồm đột biến tại Cys142 làm giảm hoạt tính phân cắt protein tiền chất capsit của nó; và

(iii) yếu tố kiểm soát để kiểm soát sự biểu hiện của proteaza

sao cho, khi cấu trúc này có mặt trong tế bào chủ, thì yếu tố kiểm soát làm cho proteaza được biểu hiện ở mức đủ để phân cắt protein tiền chất capsit, nhưng không đủ để gây ra độc tính đáng kể trong tế bào chủ, trong đó yếu tố kiểm soát là vị trí dịch khung retrovirus.

2. Cấu trúc theo điểm 1, trong đó yếu tố kiểm soát là vị trí dịch khung HIV-1.

3. Cấu trúc theo điểm 2, trong đó vị trí dịch khung nằm ở giữa trình tự nucleotit mã hóa protein tiền chất capsit và trình tự nucleotit mã hóa proteaza, sao cho khi cấu trúc này được dịch mã: nếu ribosom không trải qua quá trình dịch khung, thì nó tạo ra sản phẩm bị cắt cụt mà bao gồm protein tiền chất capsit nhưng không phải proteaza; nhưng nếu ribosom trải qua quá trình dịch khung, thì cả protein tiền chất capsit và proteaza được dịch mã.

4. Cấu trúc theo điểm 2 hoặc 3, trong đó yếu tố kiểm soát gây ra sự dịch khung là khoảng 5% ARN thông tin được dịch mã.

5. Cấu trúc theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 4, trong đó proteaza với đột biến này có hoạt tính phân cắt protein tiền chất capsit thấp hơn xấp xỉ 3 lần so với proteaza 3C kiểu dại.

6. Cấu trúc theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, mà khi được biểu hiện trong tế bào chủ, có khả năng sản xuất capsit rỗng của virus gây bệnh lở mồm long móng (FMDV).
7. Vector chứa cấu trúc theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên.
8. Vector theo điểm 7, trong đó vector này là vector chuyển baculovirus, vector ADN, plasmid hoặc vector virus.
9. Tế bào chủ chứa cấu trúc theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6.
10. Tế bào chủ theo điểm 9, trong đó tế bào này là tế bào côn trùng hoặc tế bào động vật có vú.
11. Phương pháp sản xuất capsit rỗng của virus bao gồm các bước sau:
 - (i) biểu hiện cấu trúc theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6 trong tế bào chủ; và
 - (ii) thu hoạch capsit rỗng của virus do tế bào chủ sản xuất.
12. Phương pháp sản xuất vaccine, trong đó phương pháp này bao gồm bước sản xuất capsit rỗng của virus bằng phương pháp theo điểm 11 và đưa capsit rỗng của virus vào vaccine.

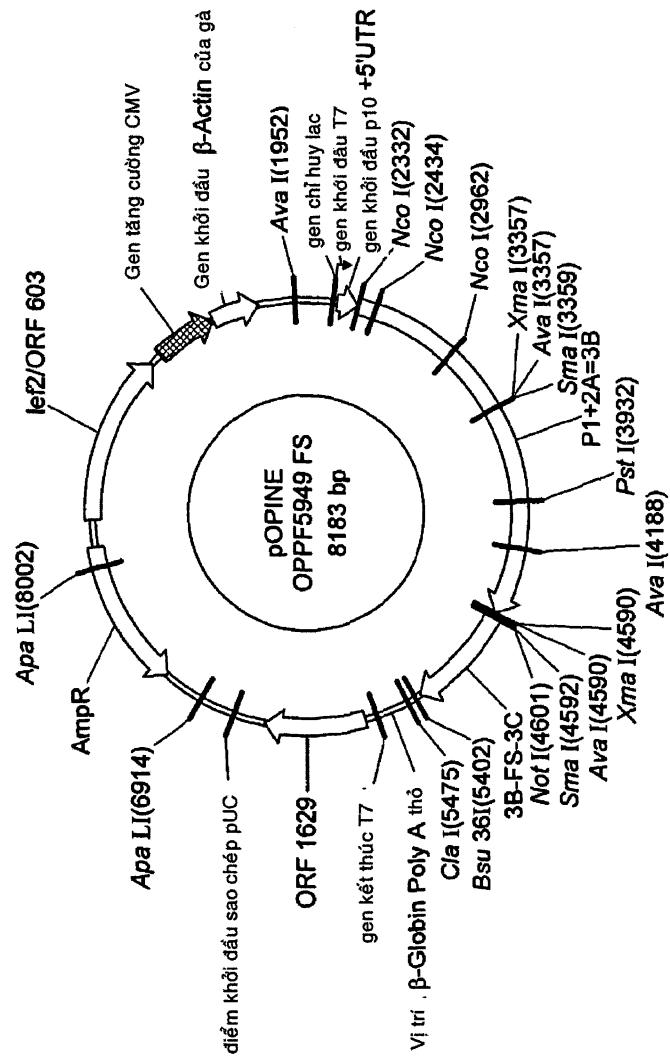


FIG. 1

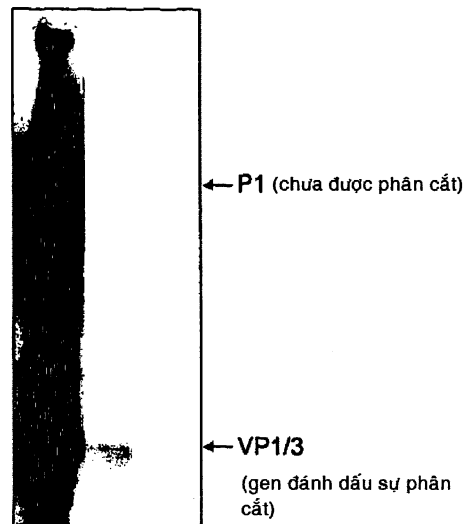


FIG. 2

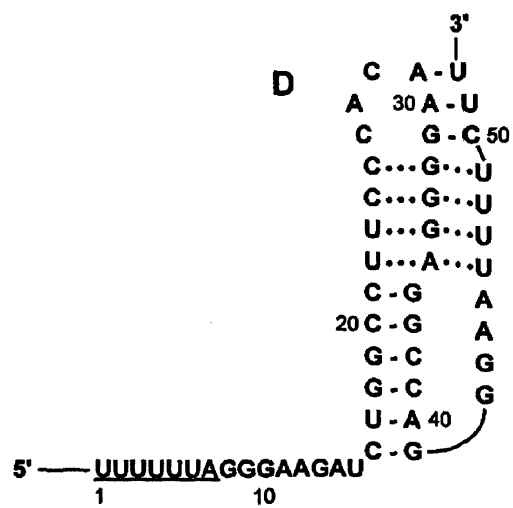


FIG. 3

4261	CTACACCGCG	CCACACCGCG	TGTTGGCAAC	AGTGTAACAC	GGGACGACGA	AGTACTCCGC	
	GATGTGGCGC	GGTGTGGCGC	ACAACCGTTG	TCACATGTTG	CCCTGCTCGT	TCATGAGGGC	
	-2 Ala Gly Gly Thr	Gly Arg Arg Gly	Asp Leu Gly	Pro Leu Ala	Ala Arg Val Ala	Ala Ala Gln Leu	
4321	AGGTGGTACG	GGCAGACGGG	GCGACCTAGG	GCCTCTCGCG	GCGAGGGTCC	CCGCTCAGCT	
	TCCACCATCT	CGCTCGCC	CGCTGGATCC	CGGAGACGCG	CGCTCCACGC	GGCGAGTCGA	
	-2 Leu Pro Ala Ser	Phe Asn Phe Gly	Ala Ile Gln Ala	Thr Thr Thr	Ile His Glu Leu	Leu Leu Val Arg	
4381	TCCTGCTTCT	TTCAACTTTG	GTGCAATTCA	AGGCCAGACC	ATCCACGAGC	TCCTGTGGCG	
	AGGACGAAGA	AAGTTGAAAC	CACGTTAAGT	TCGGTGTCTG	TAGGTGCTCG	AGGAGCACGC	
	-2 Arg Met Lys Arg	Ala Glu Leu Tyr	Cys Pro Arg	Pro Leu Leu	Ala Val Glu Val	Ser Ser Gln	
4441	CATGAAGCGT	GCCGAAGTCT	ACTGCCCCAG	ACCACTGTTG	GCAGTGGAGG	TGTCGTCTCA	
	GTACTTCGCA	CGGCTTGAGA	TGACGGGGTC	TGTTGACAAC	CGTCACCTCC	ACAGCAGAGT	
	-2 Gln Asp Arg His	Lys Gln Lys Ile	Ile Ala Pro	Gln Lys Gln	Leu Leu Asn Phe	Asp Leu Leu	
4501	AGACAGACAC	AAACAGGAAG	TCATTGTCACC	TGCAAAAACAA	CTTTTGAATCT	TGGATTGTGCT	
	TCGTCTCTGT	TTTGTCTTCT	AGTAACTGGG	ACGTTTTGTT	GAAACTTGA	AGCTAAACGA	

[illegible]

FIG. 4

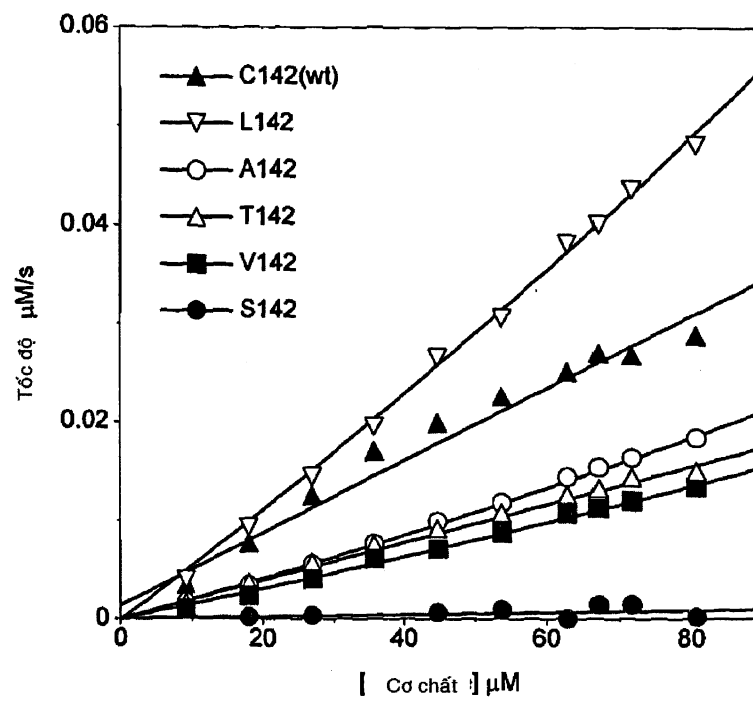


FIG. 5

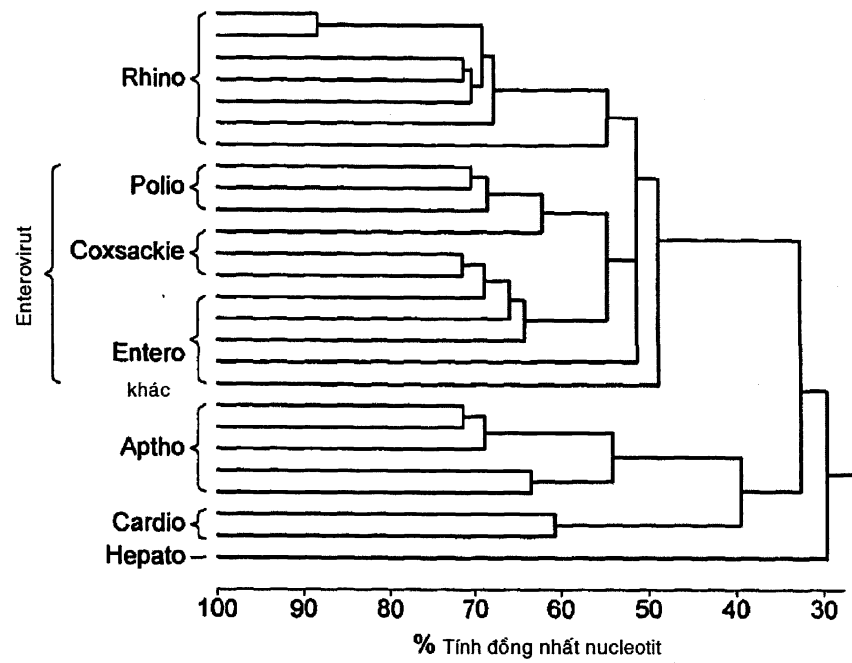


FIG. 6

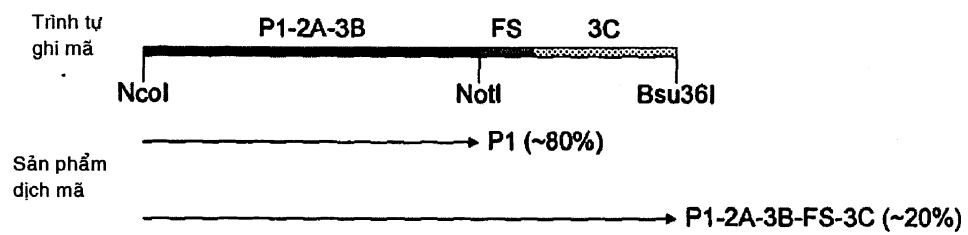


FIG. 7

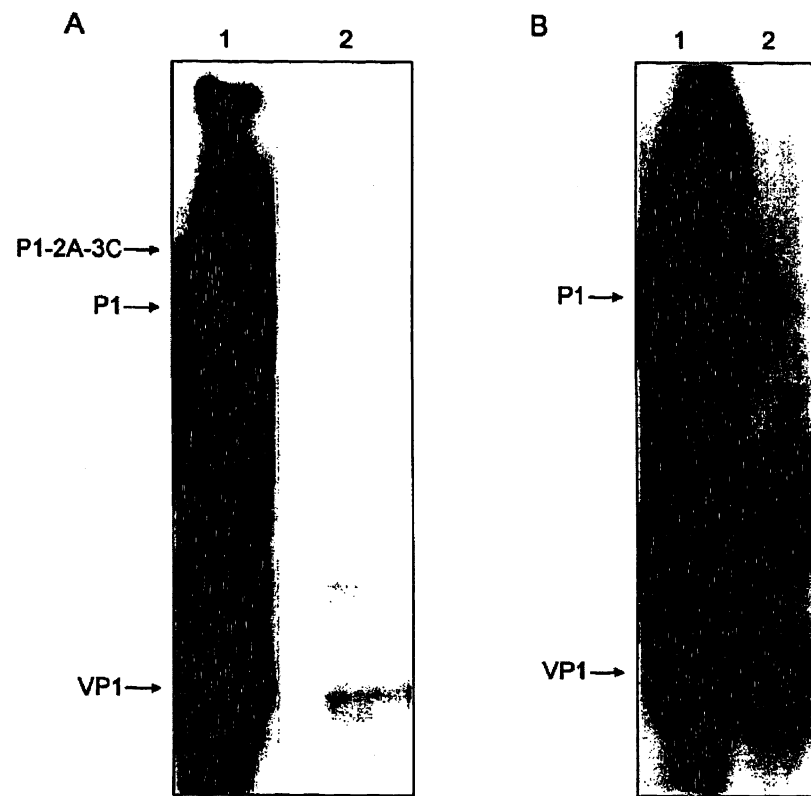
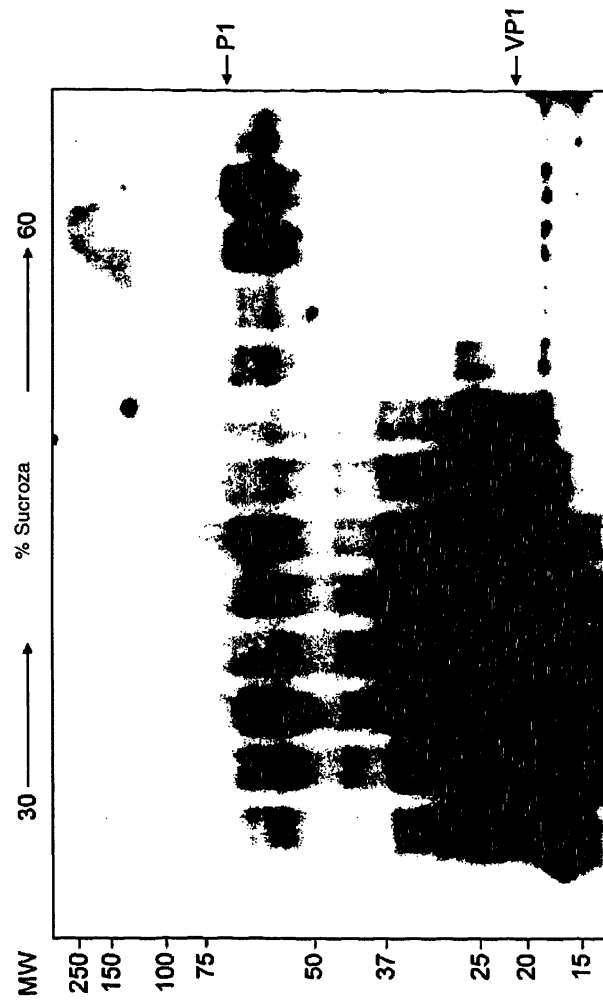


FIG. 8



Các phần dính

FIG. 9

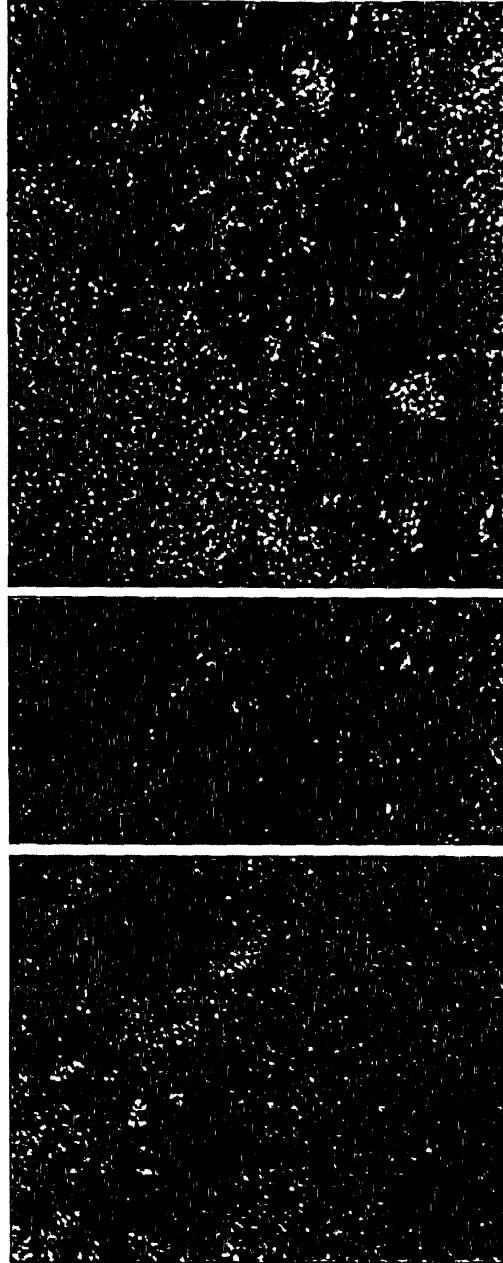


FIG. 10

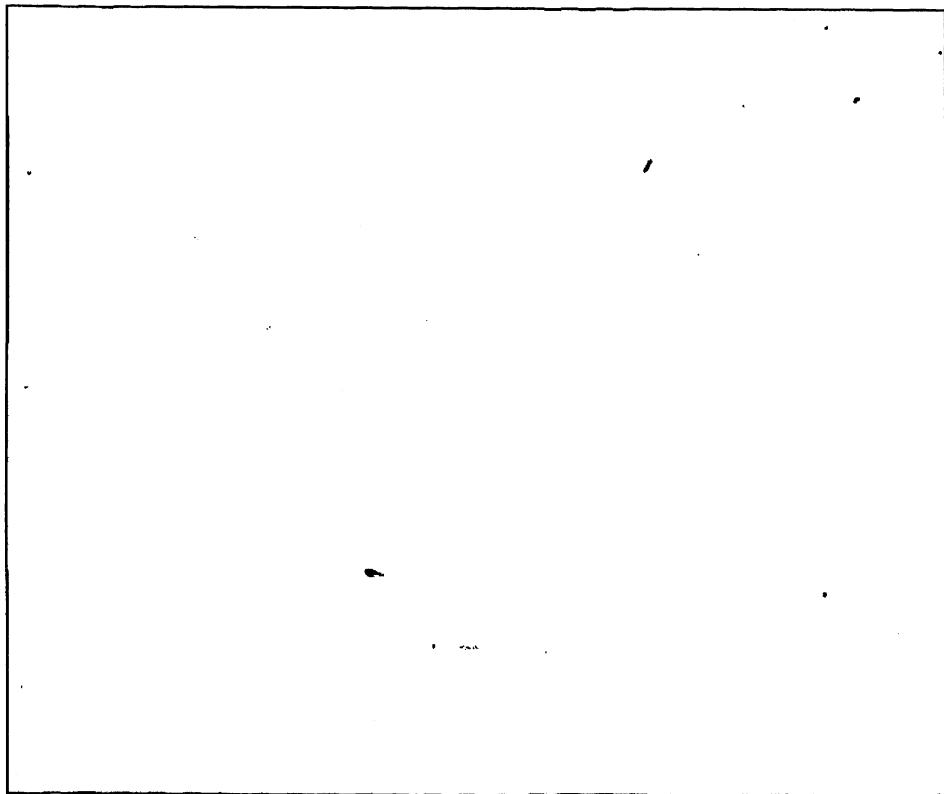


FIG. 11

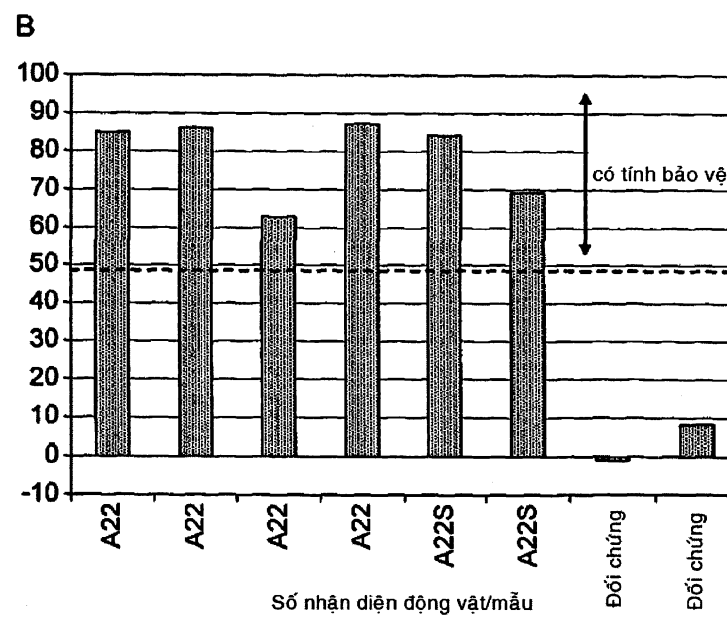
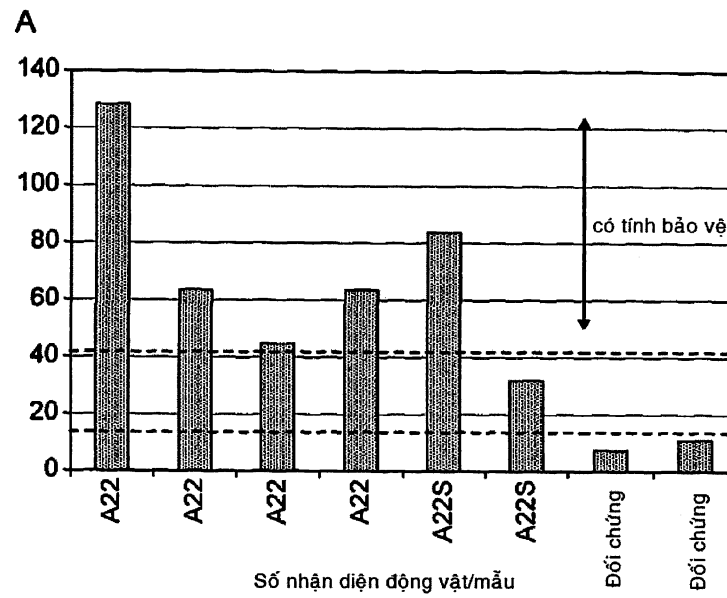


FIG. 12