



(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) 
1-0022320

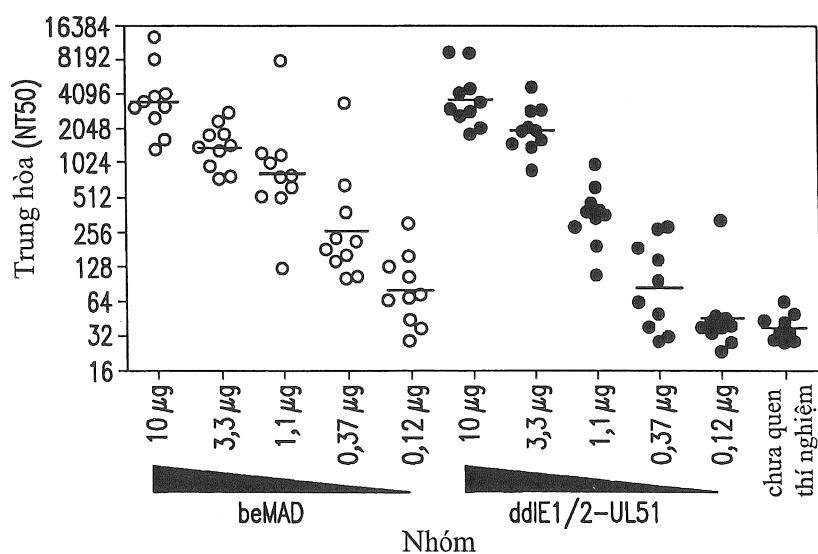
(51)⁷ C12N 7/00, A61K 39/12, 39/00

(13) B

(21) 1-2014-00814 (22) 04.09.2012
(86) PCT/US2012/053599 04.09.2012 (87) WO2013/036465 14.03.2013
(30) 61/532,667 09.09.2011 US
(45) 25.11.2019 380 (43) 27.10.2014 319
(73) Merck Sharp & Dohme Corp. (US)
126 East Lincoln Avenue, Rahway, New Jersey 07065-0907, United States of America
(72) FU, Tong-Ming (US), WANG, Dai (US), MEDI, Muneeswara Babu (US)
(74) Công ty TNHH Tâm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) CHẾ PHẨM GÂY MIỄN DỊCH CHỨA CYTOMEGALOVIRUT (CMV) KHIẾM KHUYẾT TRONG SAO CHÉP CÓ ĐIỀU KIỆN

(57) Sáng chế đề cập đến các phương pháp gây đáp ứng miễn dịch với cytomegalovirut (CMV) sử dụng CMV biến đổi gen tức là có khiếm khuyết trong sao chép có điều kiện. Các phương pháp theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị và/hoặc ngăn ngừa sự nhiễm CMV ban đầu, sự nhiễm do tái hoạt hóa CMV tiềm ẩn và siêu nhiễm chủng CMV khác nhau mà đã gặp trước đó. Sáng chế còn đề cập đến CMV có khiếm khuyết trong sao chép được biến đổi tái tổ hợp để cho phép kiểm soát bên ngoài sự sao chép của virut. Chế phẩm chứa CMV có khiếm khuyết trong sao chép cũng thuộc phạm vi của sáng chế này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các phương pháp gây đáp ứng miễn dịch với cytomegalovirus (CMV) sử dụng CMV biến đổi gen có khiếm khuyết trong sao chép có điều kiện. Sáng chế còn đề cập đến CMV được biến đổi bằng tái tổ hợp để cho phép kiểm soát sự sao chép ở virus từ bên ngoài. Chế phẩm chứa CMV có khiếm khuyết trong sao chép cũng thuộc phạm vi của sáng chế này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Cytomegalovirus (CMV), còn được biết là virus herpes 5 ở người (HHV-5), là virus herpes được phân loại là thành viên của phân họ beta của herpesviridae. Theo Trung tâm Kiểm soát và Phòng ngừa Dịch bệnh Hoa Kỳ (Centers for Disease Control and Prevention), việc nhiễm CMV được thấy là khá phổ biến ở người, với ước tính 40-80% dân số trưởng thành ở Mỹ bị nhiễm. Virus này lây lan phổ biến là qua dịch cơ thể và thường được truyền từ mẹ sang thai nhi hoặc trẻ mới sinh. Ở hầu hết các cá thể, việc nhiễm CMV diễn ra âm ỉ, mặc dù sự hoạt hóa virus có thể dẫn đến tình trạng sốt cao, ớn lạnh, mệt mỏi, đau đầu, buồn nôn, và phồng đại lách.

Mặc dù hầu hết các ca nhiễm CMV ở người đều không có triệu chứng bệnh, nhưng tình trạng nhiễm CMV ở các cá thể bị tổn thương hệ miễn dịch, (như bệnh nhân dương tính với HIV, bệnh nhân cấy ghép dị sinh và bệnh nhân ung thư) hoặc những người có hệ miễn dịch chưa được phát triển hoàn thiện (như trẻ mới sinh) có thể là đặc biệt khó giải quyết (Mocarski et al., Cytomegalovirus, in Field Virology, 2701-2772, Editor: Knipes và Howley, 2007). Sự nhiễm CMV ở các cá thể này có thể dẫn đến tỷ lệ mắc bệnh nghiêm trọng, bao gồm viêm phổi, viêm gan, viêm não, viêm ruột kết, viêm màng mạch nhỏ, viêm võng mạc, mù, và bệnh về thần kinh, trong số các tình trạng bệnh có hại khác. Ngoài ra, tình trạng nhiễm CMV trong khi mang thai là nguyên nhân hàng đầu của các khiếm khuyết bẩm sinh (Adler, 2008 J. Clin Virol, 41:231; Arvin et al, 2004 Clin Infect Dis, 39:233; Revello et al, 2008 J Med Virol, 80:1415). CMV nhiễm vào các tế bào khác nhau in vivo, bao gồm các đơn bào, đại thực bào, tế bào hình cây, tế bào ưa nhân, tế bào nội mô, tế bào biểu mô, nguyên bào

sợi, noron tế bào thần kinh, tế bào cơ trơn, tế bào gan, và tế bào đệm (Plachter et al. 1996, Adv. Virus Res. 46:195). Mặc dù các thể phân lập CMV lâm sàng sao chép trong nhiều loại tế bào, các chủng AD169 trong phòng thí nghiệm (Elek & Stern, 1974, Lancet 1:1) và Towne (Plotkin et al., 1975, Infect. Immun. 12:521) sao chép gần như là chỉ trong nguyên bào sợi (Hahn et al., 2004, J. Virol. 78:10023). Sự hạn chế ở tính hướng kích thích, mà do các lần đi qua tuần tự và cuối cùng là sự thích nghi của virus trong nguyên bào sợi, được quy định là yếu tố đánh dấu sự giảm độc lực (Gerna et al., 2005, J. Gen. Virol. 86:275; Gerna et al, 2002, J. Gen Virol. 83:1993; Gerna et al, 2003, J. Gen Virol. 84:1431; Dargan et al, 2010, J. Gen Virol. 91:1535). Các đột biến làm mất tính hướng kích thích tế bào biểu mô, tế bào nội mô, bạch cầu, và tế bào hình cây ở các chủng CMV phòng thí nghiệm ở người được lập bản đồ đối với ba khung đọc mở (ORF): UL128, UL130, và UL131 (Hahn et al., 2004, J. Virol. 78:10023; Wang và Shenk, 2005 J. Virol. 79:10330; Wang và Shenk, 2005 Proc Natl Acad Sci USA. 102:18153). Các nghiên cứu hóa sinh và tái cấu trúc chỉ ra rằng UL128, UL130 và UL131 tập hợp trên giá đỡ gH/gL để tạo ra phức gH pentame (Wang and Shenk, 2005 Proc Natl Acad Sci USA. 102:1815; Ryckman et al, 2008 J. Virol. 82:60). Sự khôi phục phức này trong các hạt virus giúp khôi phục lại tính hướng kích thích biểu mô virus ở các chủng phòng thí nghiệm (Wang and Shenk, 2005 J. Virol. 79:10330).

Việc mất đi tính hướng kích thích nội mô và biểu mô được nghi ngờ là một sự khiếm khuyết trong các vacxin đã được đánh giá trước đây như Towne (Gerna et al, 2002, J. Gen Virol. 83:1993; Gerna et al, 2003, J. Gen Virol. 84:1431). Các kháng thể trung hòa trong huyết thanh từ các đối tượng là người bị nhiễm CMV tự nhiên có hoạt tính chống lại sự xâm nhập vào biểu mô của virus cao hơn gấp 15 lần so với kháng lại sự xâm nhập vào nguyên bào sợi (Cui et al, 2008 Vaccine 26:5760). Người bị nhiễm lần đầu tăng nhanh các kháng thể trung hòa trước sự xâm nhập vào nội mô và biểu mô của virus nhưng tăng chậm các kháng thể trung hòa trước sự xâm nhập vào nguyên bào sợi của virus (Gerna et al, 2008 J. Gen. Virol. 89:853). Hơn nữa, hoạt tính trung hòa chống lại sự xâm nhập vào biểu mô và nội mô của virus là không có mặt trong huyết thanh miễn dịch từ các đối tượng là người nhận vacxin Towne (Cui et al, 2008 Vaccine 26:5760). Gần đây hơn, bảng các kháng thể đơn dòng của người từ bốn thể

cho bị nhiễm HCMV được mô tả, và các dòng trung hòa tiềm năng hơn từ bảng này nhận diện được các kháng nguyên của phức pentamer gH (Macagno et al, 2010 J. Virol. 84:1005).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến CMV có khiếm khuyết trong sao chép (rdCMV) có điều kiện và việc sử dụng rdCMV trong chế phẩm và phương pháp điều trị và/hoặc làm giảm khả năng nhiễm CMV hoặc bệnh đi kèm nhiễm CMV ở bệnh nhân. rdCMV được mô tả trong bản mô tả chứa axit nucleic mã hóa cho một hoặc nhiều protein dung hợp gồm protein thiết yếu được dung hợp với protein khử ổn định. Khi không có chất làm ổn định, protein dung hợp bị phân hủy. Do đó, rdCMV có thể được phát triển trên môi trường nuôi cấy mô dưới các điều kiện cho phép quá trình sao chép xảy ra (tức là, khi có mặt chất làm ổn định) nhưng sự sao chép này được làm giảm, và tốt hơn là được ngăn chặn, khi được đưa vào bệnh nhân (không có mặt chất làm ổn định).

Một phương án của sáng chế là CMV có khiếm khuyết trong sao chép có điều kiện. rdCMV chứa axit nucleic mã hóa một hoặc nhiều protein dung hợp mà gồm protein thiết yếu dung hợp với protein khử ổn định. Các axit nucleic mã hóa protein thiết yếu tự nhiên không còn có mặt trong rdCMV và do đó protein dung hợp là cần cho sự sao chép của virus. Theo phương án ưu tiên, protein thiết yếu được chọn từ nhóm gồm IE1/2, UL51, UL52, UL79 và UL84 và protein khử ổn định là FKBP hoặc dẫn xuất của nó.

Phương án khác của sáng chế là chế phẩm chứa rdCMV đã được phân lập và chất mang được dung. Chế phẩm này có thể còn chứa tá dược bao gồm, nhưng không giới hạn ở, tá dược ISCOMATRIX® và tá dược nhôm phosphat.

Phương án khác của sáng chế là sử dụng chế phẩm rdCMV để gây ra đáp ứng miễn dịch kháng lại CMV ở bệnh nhân. Bệnh nhân có thể được điều trị theo cách phòng tránh hoặc trị liệu bằng cách sử dụng rdCMV theo sáng chế. Điều trị phòng tránh tạo ra tính miễn dịch bảo vệ đầy đủ để làm giảm khả năng hoặc mức độ nghiêm trọng của việc nhiễm CMV, bao gồm nhiễm lần đầu, nhiễm tái phát (tức là, nhiễm do sự tái hoạt hóa CMV ẩn) và siêu nhiễm (tức là, nhiễm do nhiễm chủng CMV khác với chủng mà bệnh nhân đã bị nhiễm trước đó). Theo phương án cụ thể, phụ nữ trong độ

tuổi sinh đẻ, đặc biệt là nữ ở độ tuổi thiếu niên, được cho dùng vaccin để làm giảm khả năng nhiễm CMV (hoặc là nhiễm lần đầu, nhiễm tái phát hoặc siêu nhiễm) trong quá trình mang thai và do đó làm giảm khả năng lây truyền CMV sang thai nhi. Việc điều trị trị liệu có thể được thực hiện để làm giảm sự kéo dài/mức độ nghiêm trọng của tình trạng nhiễm CMV hiện tại.

Phương án khác của sáng chế là các phương pháp tạo ra rdCMV theo sáng chế gồm bước nhân giống rdCMV trên tế bào biểu mô, như tế bào ARPE-19 (nộp lưu ATCC số CRL-2302), khi có mặt Shield-1. Theo một số phương án, rdCMV được nhân giống trên tế bào biểu mô trên vi chất mang hoặc hệ nuôi cấy tế bào mật độ cao khác.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG.1A-1C thể hiện giản đồ cấu trúc của chủng CMV với sự biểu hiện phức gH pentame được khôi phục. (A) Chiến lược tạo ra nhiễm sắc thể nhân tạo của vi khuẩn (Bacterial Artificial Chromosome - BAC) tự cắt được để thao tác trên bộ gen virus AD169. (B) Sửa chữa đột biến xê dịch khung trong UL131 để khôi phục biểu hiện của nó. (C) Thay thế GFP bằng gen cre recombinaza để tạo ra BAC CMV tự cắt được.

FIG.2A-2D thể hiện tác dụng của các phương pháp làm bất hoạt thông thường đến tính sinh miễn dịch của phức gH. Bức xạ γ (A, B) và β -propiolactonE (BPL) (C, D) được sử dụng để làm bất hoạt CMV biểu hiện phức gH. Động học bất hoạt được xác định bằng thử nghiệm tạo vết (A, C) trong khi tính sinh miễn dịch được xác định bằng cách đánh giá huyết thanh từ chuột nhất được đưa CMV vào cho hoạt tính trung hòa kháng lại sự xâm nhập tế bào biểu mô của virus (B, D).

FIG.3 thể hiện việc sản xuất CMV đời sau của virus biểu hiện phức gH phụ thuộc nồng độ Shield 1 với các protein thiết yếu khác nhau được dung hợp với dẫn xuất FKBP. Tế bào ARPE-19 được gây nhiễm các virus rdCMV ở bội số của 0,01 PFU/tế bào trong 1 giờ, được rửa hai lần với môi trường mới, và ủ trong môi trường sinh trưởng chứa Shield-1 ở nồng độ 0, 0,05, 0,1, 0,5 hoặc 2 μ M. Bảy ngày sau gây nhiễm, tế bào không chứa virus được tập hợp lại, và hiệu giá virus được xác định bằng thử nghiệm TCID50 trên tế bào ARPE-19 khi có mặt Shield 1 nồng độ 2 μ M.

FIG.4A-4D thể hiện động học sinh trưởng của rdCMV trong tế bào ARPE-19. Tế bào được gây nhiễm các virus chứa các protein dung hợp (A) IE1/2, (B) UL51, (C) IE1/2-UL51 hoặc (D) virus beMAD bố mẹ ở bội số của 0,01 PFU/tế bào. Sau một giờ, tế bào được rửa hai lần với môi trường mới, và được ủ khi không có mặt (vòng tròn mở) hoặc có mặt (vòng tròn đóng) Shield-1 nồng độ 2 μ M. Tế bào không chứa virus được tập hợp lại ở các thời điểm chỉ định sau gây nhiễm, và virus gây nhiễm được định lượng bằng thử nghiệm TCID50 trên tế bào ARPE-19 trong môi trường chứa Shield-1 nồng độ 2 μ M.

FIG.5A-5E Động học sinh trưởng của rdCMV IE1/2-UL51 trong các loại tế bào khác nhau. Các tế bào (A) MRC-5 (B) HUVEC (C) AoSMC (D) SKMC (E) CCF-STTG1 được gây nhiễm virus rdCMV và được ủ trong một giờ. Các tế bào này được rửa hai lần với môi trường mới, và sau đó được ủ khi không có mặt (vòng tròn mở) hoặc có mặt (vòng tròn đóng) Shield-1 nồng độ 2 μ M. Tế bào không chứa virus được tập hợp lại ở các thời điểm chỉ định sau gây nhiễm, và virus gây nhiễm được định lượng bằng thử nghiệm TCID50 trên tế bào ARPE-19 trong môi trường chứa Shield-1 nồng độ 2 μ M.

FIG.6A-6C Phân tích tính sinh miễn dịch của rdCMV IE1/2-UL51 ở chuột nhắt, thỏ và khỉ *Rhesus macaques*. (A) Các con chuột nhắt được gây miễn dịch ở các tuần 0 và 4 bằng beMAD (vòng tròn mở) hoặc rdCMV IE1/2-UL51 (vòng tròn đóng). (B) Các con thỏ được gây miễn dịch ở các tuần 0, 3 và 8 bằng 10 μ g beMAD hoặc rdCMV chỉ định. (C) Khi *Rhesus macaques* được gây miễn dịch ở các tuần 0 và 8 bằng 100 μ g beMAD hoặc rdCMV IE1/2-UL51. Trong mỗi trường hợp, các mẫu huyết thanh được tập hợp và được phân tích bằng thử nghiệm trung hòa vi lượng CMV trên tế bào ARPE-19. Các dòng chỉ ra hiệu giá trung bình hình học (geometric mean titers) của sự trung hòa (NT50) trong mỗi nhóm.

FIG.7 thể hiện hiệu giá trung hòa theo trục tung ở các con khỉ *Rhesus macaques* được cho dùng vaccin virus thể dung hợp kép IE1/2-UL51. Các nhóm khỉ Rhesus (n=5) được cho dùng vaccin với liều hoặc chế phẩm vaccin chỉ định ở các tuần 0, 8, và 24 (được thể hiện bằng các hình tam giác màu đỏ), trong khi một nhóm nhận gb/mf59 (30 mg/liều) ở các tuần 0, 4 và 24. Huyết thanh miễn dịch được tập hợp ở các thời điểm

chi định và được đánh giá trong thử nghiệm trung hòa virus. GMT của các hiệu giá NT50 được vẽ đồ thị trên trục tung với sai số chuẩn cho nhóm này. AAHS: nhôm hydroxylphosphat sulfat vô định hình; IMX: ISCOMATRIX; HNS: chất đệm bazơ.

FIG.8A-8D thể hiện IFN- γ ELISPOT ở các con khỉ *Rhesus macaques* được cho dùng vaccin virus thể dung hợp kép IE1/2-UL51 với 100 μ g (A) hoặc 10 μ g (B-D) mỗi liều. Cả tá dược (A-B), AAHS (C) hoặc ISCOMATRIX (D) đều không được sử dụng. PBMC được kích thích bằng nhóm peptit biểu thị kháng nguyên HCMV. Các thanh màu xám biểu thị GMT cho mỗi kháng nguyên của nhóm (n=5). Tỷ lệ bộ đáp ứng với mỗi kháng nguyên được thể hiện ở trên đỉnh của mỗi kháng nguyên bên trong các bảng.

FIG.9A-9B cho thấy việc dùng vaccin virus thể dung hợp kép IE1/2-UL51 có thể gây ra các đáp ứng tế bào T của cả hai kiểu hình CD8+ (A) và CD4+ (B) ở các con khỉ *Rhesus macaques*. PBMC được tập hợp từ các con khỉ được cho dùng vaccin liều 100 μ g hoặc 10 μ g với ISCOMATRIX® làm tá dược. PBMC được kích thích bằng nhóm peptit biểu thị kháng nguyên HCMV, sau đó nhuộm IFN- γ và gen đánh dấu bề mặt CD4+/CD8+ tế bào T. Các dữ liệu này được biểu diễn dưới dạng số tế bào dương tính CD4+/CD8+, dương tính IFN- γ trong 1 triệu PBMC. Các dòng biểu diễn hiệu giá trung bình hình học (GMT) của nhóm nhận cùng một vaccin (n=5). Các số ở đáy của đồ thị là GMT của cả hai nhóm được cho dùng vaccin (n=10). CMV: virus được tinh sạch; SEB: mitogen được sử dụng làm chất đối chứng dương; IMX: ISCOMATRIX.

FIG.10 cho thấy tá dược nhôm phosphat Merck (MAPA) có thể làm tăng cường hiệu giá kháng thể trung hòa ở các con khỉ. Khỉ Rhesus được gây miễn dịch bằng vaccin virus thể dung hợp kép liều 30 μ g được bào chế trong HNS (chất đệm bazơ), AAHS hoặc MAPA ở các tuần 0 và 8. Các mẫu huyết thanh được tập hợp ở tuần 12 và được đánh giá hiệu giá trung hòa. Các dòng biểu thị giá trị trung bình hình học của nhóm.

FIG.11A-11B thể hiện tính ổn định của CMV biểu hiện gH trong dung dịch muối cân bằng Hank (HBSS) ở các nhiệt độ khác nhau. (A) Các mẫu CMV trong HBSS được bảo quản ở các nhiệt độ quy định trong 4 ngày trước khi đo tính ổn định virus CMV sử dụng thử nghiệm xâm nhập của virus. (B) Giá trị EC50 được tính toán cho các mẫu sử

dụng các kết quả của thử nghiệm xâm nhập của virus. * chỉ ra rằng không thể tính EC50 do việc mất hoàn toàn tính gây nhiễm.

FIG.12A-12B thể hiện ảnh hưởng của pH đến tính ổn định của CMV biểu hiện gH ở nhiệt độ trong phòng. (A) Các mẫu CMV trong các chất đệm có pH khác nhau được bảo quản ở nhiệt độ trong phòng trong 4 ngày trước khi đo tính ổn định của virus CMV sử dụng thử nghiệm xâm nhập của virus. (B) Giá trị EC50 được tính cho các mẫu bằng cách sử dụng các kết quả từ thử nghiệm xâm nhập của virus.

FIG.13A-13B thể hiện ảnh hưởng của một mình ure hoặc ure kết hợp với natri clorua đến tính ổn định của virus CMV biểu hiện gH. (A) ure 2% một mình hoặc kết hợp với NaCl 150mM được thêm vào CMV trong đệm histidin 25mM, pH = 6 ở nhiệt độ trong phòng trong 4 ngày trước khi đo tính ổn định của virus CMV sử dụng thử nghiệm xâm nhập của virus. (B) Giá trị EC50 được tính cho các mẫu sử dụng các kết quả từ thử nghiệm xâm nhập của virus.

FIG.14A-14B thể hiện ảnh hưởng của nồng độ ion đến tính ổn định của virus CMV biểu hiện gH. (A) Các nồng độ tăng dần của NaCl (NaCl 0mM, 75mM, 150mM và 320mM) được thêm vào CMV trong đệm histidin 25mM, pH = 6 ở nhiệt độ trong phòng trong 4 ngày trước khi đo tính ổn định của virus CMV sử dụng thử nghiệm xâm nhập của virus. (B) Giá trị EC50 được tính cho các mẫu sử dụng các kết quả từ thử nghiệm xâm nhập của virus.

FIG.15 thể hiện ảnh hưởng của chất bảo quản lạnh đông đến tính ổn định của CMV biểu hiện gH chống lại chu trình đóng băng-tan băng. Chất bảo quản lạnh đông chỉ định được thêm vào CMV trong đệm histidin 25mM, pH = 6 và được đưa qua 3 chu trình đóng băng-tan băng trước khi đo tính ổn định của virus CMV sử dụng thử nghiệm xâm nhập của virus. Giá trị EC50 được tính cho các mẫu sử dụng các kết quả từ thử nghiệm xâm nhập của virus.

FIG.16A-16B thể hiện ảnh hưởng của nhiệt độ bảo quản đến việc cảm ứng các kháng thể trung hòa CMV trong nghiên cứu tính sinh miễn dịch ở chuột. Chuột nhắt được gây miễn dịch ở ngày 0 và được tăng cường ở ngày 21 sau đó lấy máu vào ngày 28. Huyết thanh chuột nhắt được kiểm tra các kháng thể trung hòa kháng lại CMV biểu hiện gH sử dụng tế bào ARPE-19. Hiệu giá NT50 thu được bằng phương pháp làm

khớp đường cong phi tuyến tính. (A) Các mẫu CMV được bảo quản ở các nhiệt độ khác nhau trong 3 tháng trước nghiên cứu tính sinh miễn dịch. (B) các mẫu CMV được bảo quản ở các nhiệt độ khác nhau trong 8 giờ sau khi tan băng và trước nghiên cứu tính sinh miễn dịch.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến CMV có khiếm khuyết trong sao chép (rdCMV) có điều kiện và sử dụng rdCMV trong các chế phẩm và phương pháp điều trị và/hoặc làm giảm khả năng nhiễm CMV hoặc bệnh liên quan đến nhiễm CMV ở bệnh nhân. rdCMV được mô tả theo sáng chế mã hóa một hoặc nhiều protein dung hợp mà chứa protein thiết yếu dung hợp với protein khử ổn định thay vì protein thiết yếu tự nhiên. Khi không có mặt chất làm ổn định, protein dung hợp bị phân hủy bởi bộ máy của tế bào chủ. Khi có mặt chất làm ổn định, protein dung hợp được làm ổn định và không bị phân hủy.

Protein dung hợp thích hợp để sử dụng trong sáng chế giữ lại hoạt tính protein thiết yếu đủ để tạo thuận lợi cho việc sao chép virus trong tế bào chủ khi có mặt chất làm ổn định và làm giảm (tốt hơn là giảm hơn 50%, 75%, 90%, 95%, hoặc 99%) sự sao chép CMV khi không có mặt chất làm ổn định. Tốt hơn là, protein thiết yếu để sử dụng trong protein dung hợp mã hóa protein phi cấu trúc và do đó không bị bọc vào trong các hạt virus rdCMV. Protein thiết yếu thích hợp được xác định trong bản mô tả gồm protein CMV được mã hóa bởi các gen thiết yếu IE1/2, UL51, UL52, UL79 và UL84.

Ví dụ về protein khử ổn định và chất làm ổn định được mô tả trong đơn sáng chế Mỹ số 2009/0215169 bộc lộ chế phẩm, hệ thống và phương pháp điều biến tính ổn định của protein sử dụng phân tử nhỏ. Tóm tắt lại, protein được dung hợp với protein tác động đến tính ổn định, FKBP hoặc dẫn xuất của nó. Phân tử nhỏ thẩm qua được tế bào được bổ sung ngoại sinh, Shield-1 (Shld-1), tương tác với FKBP hoặc dẫn xuất của nó và làm ổn định protein dung hợp. Khi không có mặt Shield-1, FKBP hoặc dẫn xuất của nó làm cho protein dung hợp bị phân hủy bởi bộ máy của tế bào chủ.

Theo một phương án của sáng chế, protein CMV thiết yếu được dung hợp với FKBP hoặc dẫn xuất của nó. Khi có mặt Shield-1, protein dung hợp được làm ổn định.

Tuy nhiên, khi không có mặt Shield-1, FKBP hoặc dẫn xuất của nó làm cho protein dung hợp bị phân hủy bởi bộ máy của tế bào chủ.

Khi không có mặt protein dung hợp, sự sao chép của rdCMV bị giảm (tốt hơn là hơn 50%, 75%, 90%, 95%, hoặc 99% so với CMV không chứa protein thiết yếu bị khử ổn định) hoặc bị ngăn chặn.

Virut tái tổ hợp được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế cũng thể hiện phức gH pentame sinh miễn dịch trên các hạt virut của nó.

Các phương án còn bao gồm CMV tái tổ hợp hoặc chế phẩm của nó, được mô tả trong bản mô tả, hoặc vaccin chứa hoặc có chứa CMV hoặc chế phẩm này (i) để sử dụng trong, (ii) để sử dụng làm thuốc trong, hoặc (iii) để sử dụng trong bào chế thuốc trong: (a) trị liệu (ví dụ, trên cơ thể người); (b) y học; (c) ức chế sao chép CMV; (d) điều trị hoặc phòng tránh nhiễm CMV hoặc, (e) điều trị, phòng tránh, hoặc trì hoãn sự tấn công hoặc tiến triển của các bệnh đi kèm CMV. Trong các sử dụng này, CMV tái tổ hợp, chế phẩm của nó, và/hoặc vaccin chứa hoặc có chứa CMV hoặc chế phẩm này có thể tùy ý được sử dụng kết hợp với một hoặc nhiều chất kháng virut (ví dụ, hợp chất kháng virut hoặc globulin miễn dịch kháng virut; vaccin tổ hợp, được mô tả dưới đây).

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "gây đáp ứng miễn dịch" dùng để chỉ khả năng của CMV có khiếm khuyết trong sao chép có điều kiện trong việc tạo ra đáp ứng miễn dịch ở bệnh nhân, tốt hơn là động vật có vú, tốt hơn nữa là người mà được đưa CMV này vào, trong đó đáp ứng này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, sản xuất các yếu tố (như kháng thể) liên kết đặc hiệu với, và tốt hơn nếu là trung hòa, CMV và/hoặc làm hoạt hóa tế bào T. "Đáp ứng miễn dịch bảo vệ" là đáp ứng miễn dịch làm giảm khả năng nhiễm CMV ở bệnh nhân (bao gồm nhiễm lần đầu, nhiễm tái phát và/hoặc siêu nhiễm) và/hoặc làm giảm ít nhất một bệnh đi kèm nhiễm CMV và/hoặc làm giảm mức độ nghiêm trọng/sự kéo dài của tình trạng nhiễm CMV.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "lượng hữu hiệu về mặt miễn dịch" dùng để chỉ lượng chất sinh miễn dịch có thể gây ra đáp ứng miễn dịch kháng lại CMV khi được đưa vào bệnh nhân mà có thể bảo vệ bệnh nhân khỏi sự nhiễm CMV (bao gồm nhiễm lần đầu, nhiễm tái phát và/hoặc siêu nhiễm) và/hoặc làm giảm ít nhất

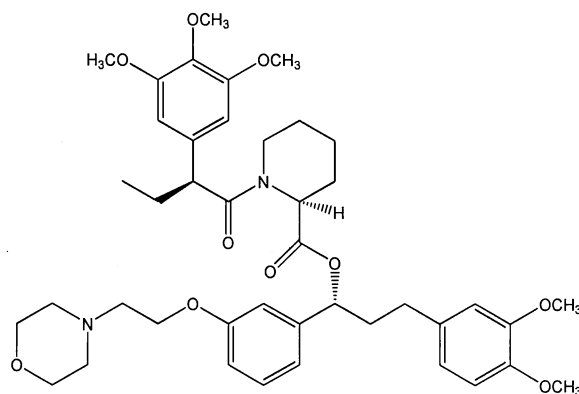
một bệnh đi kèm nhiễm CMV và/hoặc làm giảm mức độ nghiêm trọng/sự kéo dài của tình trạng nhiễm CMV ở bệnh nhân. Lượng này cần đủ để làm giảm đáng kể khả năng hoặc mức độ nghiêm trọng của tình trạng nhiễm CMV. Các mẫu động vật đã biết trong lĩnh vực có thể được sử dụng để đánh giá tác dụng bảo vệ của việc đưa chất sinh miễn dịch vào. Ví dụ, huyết thanh miễn dịch hoặc tế bào T miễn dịch từ các cá thể được đưa chất sinh miễn dịch vào có thể được thử nghiệm khả năng trung hòa bởi các kháng thể hoặc tế bào T gây độc tế bào hoặc khả năng sinh xytokin bởi tế bào miễn dịch T. Các thử nghiệm thường được sử dụng cho các đánh giá này gồm, nhưng không giới hạn ở, thử nghiệm trung hòa virus, ELISA kháng nguyên kháng virus, ELISA interferon-gamma xytokin, ELISPOT interferon-gamma, nhuộm đa xytokin nội bào (ICS), và thử nghiệm độc tính tế bào giải phóng $^{51}\text{Crom}$. Các mẫu thử thách động vật cũng có thể được sử dụng để xác định lượng hữu hiệu về mặt miễn dịch của chất sinh miễn dịch.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "virus có khiếm khuyết trong sao chép có điều kiện" dùng để chỉ các hạt virus mà có thể sao chép trong một môi trường nhất định nhưng không sao chép được trong các môi trường khác. Theo phương án ưu tiên, một virus được tạo thành virus có khiếm khuyết trong sao chép có điều kiện bằng cách khử ổn định một hoặc nhiều protein cần thiết cho sự sao chép của virus. Các axit nucleic mã hóa protein thiết yếu tự nhiên, không bị khử ổn định là không còn có mặt trong virus có khiếm khuyết trong sao chép có điều kiện. Ở các điều kiện trong đó một hoặc nhiều protein thiết yếu bị khử ổn định, sự sao chép virus bị giảm xuống tốt hơn là nhiều hơn 50%, 75%, 90%, 95%, 99%, hoặc 100% so với virus không có protein thiết yếu bị khử ổn định. Tuy nhiên, ở các điều kiện làm ổn định protein thiết yếu bị khử ổn định, sự sao chép virus có thể xảy ra tốt hơn là ở ít nhất 75%, 80%, 90%, 95%, 99% hoặc 100% lượng sao chép của CMV không chứa protein thiết yếu bị khử ổn định. Theo phương án ưu tiên hơn, một hoặc nhiều protein thiết yếu bị khử ổn định bằng cách dung hợp với protein khử ổn định như FKBP hoặc dẫn xuất của nó. Các protein dung hợp này có thể được làm ổn định bởi sự có mặt của chất làm ổn định như Shield-1. Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "rdCMV" dùng để chỉ cytomegalovirus có khiếm khuyết trong việc sao chép có điều kiện.

Theo phương án ưu tiên, đáp ứng miễn dịch được gây ra bởi virus có khiếm khuyết trong sao chép so với bản sao virus sống của nó là giống hoặc gần như là tương tự về mức độ và/hoặc độ rộng. Theo phương án ưu tiên khác, hình thái học của virus có khiếm khuyết trong sao chép khi phân tích bằng kính hiển vi điện tử là không phân biệt được hoặc gần như là tương tự với bản sao virus sống của nó.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "FKBP" dùng để chỉ protein khử ổn định có SEQ ID NO:11. Protein dung hợp chứa FKBP bị phân hủy bởi bộ máy của tế bào chủ. Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "dẫn xuất FKBP" dùng để chỉ protein FKBP hoặc phần của nó được biến đổi bởi một hoặc nhiều phần thế, xóa và/hoặc bổ sung axit amin. Dẫn xuất FKBP giữ lại gần như là tất cả các đặc tính khử ổn định của FKBP khi dung hợp với protein và cũng giữ lại gần như là tất cả các khả năng FKBP được làm ổn định bởi Shield-1. Các dẫn xuất FKBP được ưu tiên có một hoặc nhiều phần thế sau đây ở các vị trí axit amin được chỉ rõ F15S, V24A, H25R, F36V, E60G, M66T, R71G, D100G, D100N, E102G, K105I và L106P. Dẫn xuất FKBP có các phần thế F36V và L106P (SEQ ID NO:12) được đặc biệt ưu tiên. Theo phương án ưu tiên, axit nucleic mã hóa FKBP hoặc dẫn xuất FKBP chứa ít nhất một vài codon mà không thường xuyên được sử dụng ở người đối với FKBP nội sinh. Điều này làm giảm khả năng rằng FKBP hoặc dẫn xuất FKBP của protein dung hợp sẽ sắp xếp lại hoặc tổ hợp với bản sao của nó trong bộ gen người. Trình tự axit nucleic được nêu trong SEQ ID NO:13 mã hóa SEQ ID NO:12 bằng cách sử dụng các codon này.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "Shield-1" hoặc "Shld1" dùng để chỉ phân tử nhỏ tổng hợp liên kết với FKBP kiểu đại và dẫn xuất của nó và hoạt động như là chất làm ổn định. Liên kết với dẫn xuất F36V chặt hơn khoảng 1000 lần so với FKBP kiểu đại (Clackson et al., 1998, PNAS 95:10437-42). Shield-1 có thể được tổng hợp (về cơ bản như được mô tả trong Holt et al., 1993, J. Am. Chem. Soc. 115:9925-38 và Yang et al., 2000, J. Med. Chem. 43:1135-42 và Grimley et al., 2008, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 18:759) hoặc có bán trên thị trường từ Cheminpharma LLC (Farmington, CT) hoặc Clontech Laboratories, INC. (Mountain View, CA). Muối của Shield-1 cũng có thể được sử dụng trong các phương pháp theo sáng chế. Shield-1 có cấu trúc dưới đây:



Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "được dung hợp" hoặc "protein dung hợp" dùng để chỉ hai polypeptit được sắp xếp trong khung làm một phần của cùng một trình tự liên kết của các axit amin. Sự dung hợp có thể là trực tiếp, nghĩa là không có các gốc axit amin khác giữa các polypeptit hoặc gián tiếp, nghĩa là có phần tử liên kết axit amin nhỏ để cải thiện tính năng hoặc bổ sung chức năng. Theo phương án ưu tiên, sự dung hợp là trực tiếp.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "phức gH pentame" hoặc "phức gH" dùng để chỉ phức có 5 protein virus trên bề mặt của hạt virus CMV. Phức này được tạo nên từ các protein được mã hóa bởi UL128, UL130, và UL131 tập hợp trên giá đỡ gH/gL (Wang and Shenk, 2005 Proc Natl Acad Sci USA. 102:1815; Ryckman et al, 2008 J. Virol. 82:60). Các trình tự của protein phức từ CMV chủng AD169 được thể hiện ở số nộ lưu GenBank NP_783797.1 (UL128), NP_040067 (UL130), CAA35294.1 (UL131), NP_040009 (gH, còn được biết là UL75) và NP_783793 (gL, còn được biết là UL115). Một số chủng CMV đã được giảm độc lực có một hoặc nhiều đột biến ở UL131 sao cho protein không được biểu hiện và do đó phức gH không được tạo thành. Trong các trường hợp này, UL131 cần được sửa chữa (sử dụng các phương pháp như được nêu trong Wang and Shenk, 2005 J. Virol. 79:10330) để phức gH được biểu hiện trong rdCMV theo sáng chế. Các virus theo sáng chế biểu hiện năm protein của virus mà tạo nên phức gH pentame và tập hợp phức gH pentame trên vỏ ngoài của virus.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "protein thiết yếu" dùng để chỉ protein của virus mà cần cho sự sao chép *in vivo* của virus và trong nuôi cấy mô. Ví dụ

về các protein thiết yếu trong CMV gồm, nhưng không giới hạn ở, IE1/2, UL37x1, UL44, UL51, UL52, UL53, UL56, UL77, UL79, UL84, UL87 và UL105.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "protein thiết yếu bị khử ổn định" dùng để chỉ protein thiết yếu được biểu hiện và thực hiện chức năng của nó trong việc sao chép của virus và bị phân hủy khi không có mặt chất làm ổn định. Theo phương án ưu tiên, protein thiết yếu được dung hợp với protein khử ổn định như FKBP hoặc dẫn xuất của nó. Ở các điều kiện sinh trưởng bình thường (tức là, không có mặt chất làm ổn định) protein dung hợp được biểu hiện nhưng bị phân hủy bởi bộ máy của tế bào chủ. Sự phân hủy này không cho phép protein thiết yếu thực hiện chức năng sao chép của virus do đó protein thiết yếu bị làm mất chức năng. Ở các điều kiện trong đó có mặt chất làm ổn định như Shield-1, protein dung hợp được làm ổn định và có thể thực hiện chức năng của nó ở mức độ có thể duy trì sự sao chép của virus tốt hơn là bằng ít nhất 75%, 80%, 90%, 95%, 99% hoặc 100% lượng sao chép của CMV không chứa protein thiết yếu bị khử ổn định.

CMV có khiếm khuyết trong sao chép

Các phương pháp theo sáng chế sử dụng CMV có khiếm khuyết trong sao chép (rdCMV) biểu hiện phức gH pentame. Virus CMV đã được giảm độc lực bất kỳ mà biểu hiện phức gH pentame có thể được làm cho có khiếm khuyết trong sao chép theo các phương pháp theo sáng chế. Theo một phương án, CMV được giảm độc lực là AD169 có sự biểu hiện phức gH được khôi phục do sự sửa chữa đột biến ở gen UL131 (xem Ví dụ 1).

Virus có khiếm khuyết trong sao chép có điều kiện là các thể đột biến trong đó một hoặc nhiều protein thiết yếu của virus được thay thế bởi bản sao bị khử ổn định của các protein thiết yếu này. Bản sao bị khử ổn định được mã hóa bởi axit nucleic mà mã hóa protein dung hợp giữa protein thiết yếu và protein khử ổn định. Protein thiết yếu bị khử ổn định có thể chỉ mang chức năng hỗ trợ sự sao chép của virus khi có mặt chất làm ổn định. Theo phương án ưu tiên, các phương pháp được mô tả trong đơn sáng chế Mỹ số 2009/0215169 được sử dụng để làm cho CMV biểu hiện phức gH pentame mang kiểu hình có khiếm khuyết trong sao chép có điều kiện. Nói tóm lại, một hoặc nhiều protein thiết yếu để sao chép CMV được dung hợp với protein khử ổn

định, FKBP hoặc dẫn xuất FKBP. Các axit nucleic mã hóa cho protein thiết yếu tự nhiên không còn có mặt trong rdCMV. Khi có mặt chất làm ổn định phân tử nhỏ thấm qua tế bào được bổ sung ngoại sinh, Shield-1 (Shld-1), protein dung hợp được làm ổn định và protein thiết yếu có thể mang chức năng hỗ trợ sự sao chép của virus. Sự sao chép của rdCMV khi có mặt chất làm ổn định tốt hơn là bằng ít nhất 75%, 80%, 90%, 95%, 99% hoặc 100% lượng sao chép của CMV không chứa protein dung hợp khử ổn định (ví dụ, CMV bố mẹ đã được giảm độc lực được sử dụng để cấu tạo nên rdCMV). Khi không có mặt Shield-1, protein khử ổn định của protein dung hợp làm cho protein dung hợp bị phân hủy về cơ bản bởi bộ máy của tế bào chủ. Khi protein thiết yếu không có mặt hoặc có mặt với lượng nhỏ nhất của, CMV không thể sao chép ở lượng có thể gây ra hoặc duy trì tình trạng nhiễm CMV ở bệnh nhân. Sự sao chép rdCMV khi không có mặt chất làm ổn định không xảy ra hoặc bị làm giảm tốt hơn là nhiều hơn 50%, 75%, 90%, 95%, hoặc 99% so với CMV không chứa protein dung hợp khử ổn định (ví dụ, CMV bố mẹ đã được giảm độc lực được sử dụng để cấu tạo nên rdCMV).

Bằng cách sử dụng các phương pháp tái tổ hợp ADN đã biết trong lĩnh vực, axit nucleic mã hóa protein thiết yếu để sao chép CMV và/hoặc thiết lập/duy trì tình trạng nhiễm CMV được gắn với axit nucleic mã hóa FKBP hoặc dẫn xuất của nó. Protein dung hợp được mã hóa chứa FKBP hoặc dẫn xuất FKBP được dung hợp trong khung với protein thiết yếu. Protein dung hợp đã được mã hóa là ổn định khi có mặt Shield-1. Tuy nhiên, protein dung hợp đã được mã hóa này bị khử ổn định khi không có mặt Shield-1 và được nhắm phân hủy. Theo phương án ưu tiên, FKBP là SEQ ID NO:11. Theo phương án ưu tiên khác, dẫn xuất FKBP là FKBP chứa một hoặc nhiều phần thể axit amin được chọn từ nhóm gồm: F15S, V24A, H25R, F36V, E60G, M66T, R71G, D100G, D100N, E102G, K105I và L106P. Theo phương án ưu tiên hơn, dẫn xuất FKBP chứa các phần thể F36V và/hoặc L106P (SEQ ID NO:12). Theo phương án ưu tiên hơn, dẫn xuất FKBP được mã hóa bởi SEQ ID NO:13.

Protein thiết yếu được nhắm khử ổn định bằng cách dung hợp với FKBP hoặc dẫn xuất của nó 1) là cần thiết yếu cho sự sao chép của virus; 2) có thể điều tiết sự dung hợp của protein khử ổn định mà không phá vỡ về cơ bản chức năng của protein thiết yếu; và 3) có thể điều tiết việc chèn axit nucleic mã hóa cho FKBP hoặc dẫn xuất

của nó ở đầu 5' hoặc 3' của ORF của virus mã hóa protein thiết yếu mà không phá vỡ về cơ bản các ORF của các gen virus xung quanh. Theo phương án ưu tiên, các protein thiết yếu được nhắm khử ổn định bằng cách dung hợp với FBBP hoặc dẫn xuất của nó mã hóa protein phi cấu trúc và, như vậy, có khả năng được bọc vào các hạt virus CMV tái tổ hợp giảm. Bảng 1 thể hiện gen CMV đáp ứng các tiêu chuẩn nêu trên.

Bảng 1: Các gen của virus được chọn để tạo cấu trúc cho thể dung hợp FKBP

Gen virus	Chức năng*	Giai đoạn động lực học	Thể dung hợp FKBP	Trình tự của protein dung hợp
IE1/2 (UL123/122)	chất điều biến phiên mã của virus	Sớm ngay tức thì	Đầu tận N	SEQ ID NO:1-2
UL37x1	Điều hòa gen của virus	Sớm ngay tức thì	Đầu tận N	-
UL51	Gói ADN	Muộn	Đầu tận N	SEQ ID NO:3-4
UL52	Gói và phân cắt ADN	Muộn	Đầu tận N	SEQ ID NO:5-6
UL53	Lối ra lớp vỏ protein; lối ra của nhân	Sớm	Đầu tận C	-
UL77	Gói ADN	Sớm	Đầu tận C	-
UL79	Chưa biết	Muộn	Đầu tận N	SEQ ID NO:7-8
UL84	Sao chép ADN	Sớm - Muộn	Đầu tận C	SEQ ID NO:9-10
UL87	Chưa biết	?	Đầu tận N	-

* Theo Mocarski, Shenk and Pass, Cytomegalovirus, in Field Virology, 2701-2772, Editor: Knipes and Howley, 2007

Sáng chế bao gồm rdCMV chứa protein dung hợp có protein thiết yếu hoặc dẫn xuất của nó dung hợp với protein khử ổn định. Các dẫn xuất protein thiết yếu chứa một hoặc nhiều phần thể, phần thêm và/hoặc phần xóa axit amin so với protein thiết yếu tự nhiên vẫn có thể tạo ra hoạt tính của protein thiết yếu ít nhất là đủ tốt để hỗ trợ việc sao chép của virus khi có mặt Shield-1. Ví dụ về việc đo hoạt tính virus được đưa ra trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây. Các phương pháp đã biết trong lĩnh vực

có thể được sử dụng để xác định mức độ sai khác giữa protein thiết yếu CMV quan tâm và dẫn xuất. Theo một phương án, độ đồng nhất trình tự được sử dụng để xác định mối liên quan. Dẫn xuất theo sáng chế sẽ tốt hơn nếu đồng nhất ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 97%, ít nhất 99% với trình tự bazơ. Phần trăm đồng nhất được định nghĩa là số lượng các gốc giống nhau chia cho tổng số lượng các gốc và nhân với 100. Nếu trình tự trong sự sắp thẳng có các chiều dài khác nhau (do khoảng trống hoặc phần kéo dài), chiều dài của trình tự dài nhất sẽ được sử dụng để tính toán, biểu thị giá trị của tổng chiều dài.

Theo một số phương án, một hoặc nhiều protein của virus cần thiết cho sự sao chép của virus được nhắm khử ổn định được chọn từ nhóm gồm IE1/2, UL51, UL52, UL84, UL79, UL87, UL37x 1, UL77 và UL53 hoặc các dẫn xuất của chúng. Theo phương án cụ thể, một hoặc nhiều protein của virus cần thiết cho sự sao chép của virus được nhắm khử ổn định được chọn từ nhóm gồm IE1/2, UL51, UL52, UL84, UL79, UL87. Theo phương án cụ thể hơn, một hoặc nhiều protein của virus cần thiết cho sự sao chép của virus được nhắm khử ổn định được chọn từ nhóm gồm IE1/2, UL51, UL52, UL79 và UL84.

Nhiều hơn một protein thiết yếu có thể bị khử ổn định bằng cách dung hợp với FKBP hoặc dẫn xuất của nó. Theo một số phương án, protein thiết yếu thực hiện chức năng ở các giai đoạn khác nhau của quá trình sao chép CMV và/hoặc gây nhiễm CMV (bao gồm nhưng không giới hạn bởi, giai đoạn sớm ngay tức thì, giai đoạn sớm hoặc giai đoạn muộn). Theo phương án ưu tiên, sự kết hợp của các protein virus cần cho sự sao chép của virus được nhắm khử ổn định được chọn từ nhóm gồm IE1/2 và UL51, IE1/2 và UL52, IE1/2 và UL79, IE1/2 và UL84, UL84 và UL51 và UL84 và UL52. Theo phương án ưu tiên hơn, IE1/2 và UL51 được nhắm khử ổn định trong cùng CMV tái tổ hợp. Theo phương án ưu tiên nhất, protein dung hợp chứa IE1/2 là SEQ ID NO:1 và protein dung hợp chứa UL51 là SEQ ID NO:3. Các SEQ ID NO:1 và 3 có thể được mã hóa lần lượt bởi SEQ ID No:2 và 4. Bộ gen của rdCMV với IE1/2 và UL51 bị khử ổn định được thể hiện trong SEQ ID NO:14.

FKBP hoặc dẫn xuất của nó có thể dung hợp với protein thiết yếu, hoặc trực tiếp hoặc gián tiếp. Theo phương án ưu tiên, FKBP hoặc dẫn xuất của nó được dung hợp trực tiếp với protein thiết yếu.

FKBP hoặc dẫn xuất của nó có thể dung hợp với protein thiết yếu ở đầu tận N hoặc đầu tận C của protein thiết yếu. Theo phương án ưu tiên, FKBP được dung hợp với đầu tận N của protein thiết yếu.

Nhiều hơn một FKBP hoặc dẫn xuất của nó có thể dung hợp với protein thiết yếu. Theo các phương án trong đó có nhiều hơn một FKBP hoặc dẫn xuất của nó dung hợp với protein thiết yếu, mỗi trong số từng FKBP hoặc dẫn xuất của nó có thể giống hoặc khác nhau. Theo phương án ưu tiên, có một FKBP hoặc dẫn xuất của nó được dung hợp với protein thiết yếu.

Các phương pháp làm bất hoạt khác

Theo một số phương án, rdCMV được mô tả trên đây được làm bất hoạt thêm sử dụng phương pháp làm bất hoạt bằng hóa học hoặc vật lý. Ví dụ về phương pháp làm bất hoạt gồm xử lý nhiệt, ủ với formaldehyt, β -Propiolacton (BPL), hoặc etylenimin đôi (binary etyleneimine (BEI)), hoặc bức xạ gamma. Các phương pháp ưu tiên không phá vỡ hoặc gần như là không phá vỡ tính sinh miễn dịch, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, tính sinh miễn dịch được gây ra bởi phức gH pentame. Như vậy, sự đáp ứng miễn dịch được gây ra bởi CMV mà được làm bất hoạt thêm được bảo toàn hoặc gần như là được bảo toàn so với rdCMV không có bước xử lý làm bất hoạt thêm. Theo phương án ưu tiên, khả năng tạo ra các kháng thể trung hòa của CMV bị làm bất hoạt thêm có thể so sánh với các kháng thể trung hòa được tạo ra bởi rdCMV không có bước xử lý làm bất hoạt thêm. Chế độ làm bất hoạt bằng một phương pháp hoặc kết hợp của nhiều phương pháp hóa học hoặc vật lý được xác định bằng kinh nghiệm để đảm bảo tính sinh miễn dịch của CMV, bao gồm phức gH pentame.

Đánh giá sự sao chép của virus

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể sử dụng các thử nghiệm sao chép virus để xác định tính hữu dụng của protein thiết yếu cụ thể dung hợp với FKBP hoặc dẫn xuất của nó. Do chức năng biểu hiện gen/sản phẩm được mã

hóa gần như không bị tác động bởi sự gắn của FKBP hoặc dẫn xuất của nó với protein thiết yếu khi có mặt Shield-1, rdCMV cần phải sao chép ở tỷ lệ có thể so sánh được với CMV bố mẹ khi có mặt Shield-1 (tốt hơn là bằng ít nhất 75%, 80%, 90%, 95%, 99% hoặc 100% lượng virus bố mẹ). Sự sao chép của rdCMV về cơ bản là thay đổi so với CMV bố mẹ khi không có mặt Shield-1 (giảm tốt hơn là hơn 50%, 75%, 90%, 95%, 99% hoặc 100% so với CMV không chứa protein dung hợp khử ổn định).

Theo phương án ưu tiên, rdCMV khi có mặt Shield-1 ở nồng độ ít nhất $2\mu\text{M}$ sao chép tốt hơn là ít nhất 90%, tốt hơn nữa là ít nhất 95%, tốt nhất là ít nhất 99% lượng không phải rdCMV sao chép.

Theo một phương án, chế phẩm chứa rdCMV theo sáng chế có hiệu giá virus là ít nhất 10^5 pfu/ml, tốt hơn nữa là ít nhất 10^7 pfu/ml, khi có mặt Shield-1 ở nồng độ ít nhất $2\mu\text{M}$.

Ngược lại, rdCMV về cơ bản không sao chép khi không có mặt Shield-1. Chất lượng của cơ chế khiếm khuyết sao chép được đánh giá bởi mức độ nghiêm ngặt của việc kiểm soát ở các điều kiện không cho phép sao chép virus, tức là, hiệu giá gây nhiễm của các hạt virus đòi hỏi ở các điều kiện này. rdCMV theo sáng chế gần như là không thể sao chép (hoặc trong môi trường nuôi cấy tế bào hoặc bên trong bệnh nhân) khi không có mặt Shield-1. Sự sao chép của nó trong tế bào ARPE-19 và các kiểu tế bào sơ cấp khác của người là có điều kiện, và nồng độ mol của Shield-1 lớn hơn $0,1\mu\text{M}$, tốt hơn là ít nhất là $2\mu\text{M}$, trong môi trường nuôi cấy là cần để duy trì sự sao chép của virus.

Theo một phương án, chế phẩm chứa rdCMV theo sáng chế có hiệu giá virus nhỏ hơn 2 pfu/ml, tốt hơn là nhỏ hơn 1 pfu/ml, khi không có mặt Shield-1.

Các phương pháp để đánh giá sự sao chép CMV có thể được sử dụng để đánh giá sự sao chép rdCMV khi không có mặt hoặc có mặt Shield-1. Tuy nhiên, theo phương án ưu tiên, TCID₅₀ được sử dụng.

Theo phương án khác, hiệu giá rdCMV được xác định bởi thử nghiệm liều gây nhiễm 50% tế bào (50% Tissue Culture Infective Dose - TCID₅₀). Một cách vắn tắt, thử nghiệm pha loãng này định lượng lượng virus cần để giết 50% vật chủ bị gây

nhiễm. Tế bào chủ (ví dụ, tế bào ARPE-19) được cấy lên đĩa và các phân pha loãng liên tiếp của virus được bổ sung. Sau khi nuôi, phần trăm chết tế bào (tức là tế bào bị gây nhiễm) được quan sát và ghi lại với mỗi phân pha loãng virus. Các kết quả được sử dụng để tính TCID₅₀ bằng phương pháp toán học.

Theo phương án khác, hiệu giá rdCMV được xác định sử dụng thử nghiệm tạo vết. Thử nghiệm tạo vết virus xác định số đơn vị hình thành vết (plaque forming units (pfu)) trong mẫu virus. Một cách vắn tắt, lớp đơn hợp dòng của tế bào chủ (ví dụ, tế bào ARPE-19) được gây nhiễm rdCMV ở các nồng độ pha loãng thay đổi và được phủ môi trường bán rắn, như thạch aga hoặc carboxymethyl xenluloza, để ngăn chặn việc nhiễm virus lan tràn bừa bãi. Vết của virus được tạo thành khi virus gây nhiễm tế bào bên trong lớp đơn tế bào cố định. Tế bào nhiễm virus này sẽ phân giải và lan nhiễm đến các tế bào liền kề ở đó chu trình nhiễm-phân giải được lặp lại. Khu vực tế bào bị gây nhiễm sẽ tạo nên vết (khu vực nhiễm được bao quanh bởi tế bào chưa bị gây nhiễm) mà có thể nhìn được bằng mắt thường hoặc bằng kính hiển vi quang học. Các vết được đếm và các kết quả, kết hợp với hệ số pha loãng được sử dụng để chuẩn bị đĩa cấy, được dùng để tính toán số đơn vị hình thành vết với mỗi thể tích đơn vị mẫu (pfu/mL). Kết quả pfu/mL biểu thị số hạt gây nhiễm bên trong mẫu và được dựa trên giả sử rằng mỗi vết tạo thành biểu thị một hạt virus gây nhiễm.

Theo phương án khác, mẫu chuột nhắt hu-SCID được sử dụng để đánh giá khả năng sao chép *in vivo* của rdCMV. Một cách vắn tắt, các mẫu mô phổi người (như tuyến ức và gan) được cấy ghép bằng phẫu thuật vào các vỏ bao thận của chuột SCID. rdCMV được cấy 2-3 tháng sau đó khi mô của người được tạo mạch. Hiệu giá virus được đánh giá 3-4 tuần sau khi cấy trong thử nghiệm tạo vết. Các thử nghiệm ở động vật có thể được thực hiện khi không có mặt hoặc có mặt Shield-1.

Đánh giá đáp ứng miễn dịch

Việc đưa rdCMV theo sáng chế vào bệnh nhân gây ra đáp ứng miễn dịch với CMV, tốt hơn nếu là đáp ứng miễn dịch bảo vệ, mà có thể điều trị và/hoặc làm giảm khả năng nhiễm CMV hoặc bệnh đi kèm nhiễm CMV ở bệnh nhân. Đáp ứng miễn dịch này, ít nhất một phần, là với phức gH pentame.

Đáp ứng miễn dịch được gây ra bởi rdCMV có thể được đánh giá bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực.

Các mẫu động vật đã biết trong lĩnh vực có thể được sử dụng để đánh giá tác dụng bảo vệ của việc đưa rdCMV vào. Theo một phương án, huyết thanh miễn dịch từ các cá thể được đưa rdCMV vào có thể được thử nghiệm về khả năng trung hòa, bao gồm nhưng không giới hạn ở, chặn sự gắn của virus hoặc sự đi vào tế bào chủ. Theo phương án khác, tế bào T từ các cá thể được đưa rdCMV vào có thể được thử nghiệm về khả năng sản xuất xytokin bao gồm, nhưng không giới hạn ở, interferon gamma, khi có mặt kháng nguyên quan tâm. Các mẫu thử thách động vật cũng có thể được sử dụng để xác định lượng hữu hiệu về mặt miễn dịch của chất sinh miễn dịch.

Sự trung hòa virus chỉ các kháng thể đặc hiệu virus có khả năng chặn sự đi vào và/hoặc sao chép của virus trong các môi trường nuôi cấy. Thử nghiệm thông thường để đo hoạt tính trung hòa là thử nghiệm giảm vết virus. Các thử nghiệm trung hòa trong sáng chế đề cập đến các phép chuẩn độ huyết thanh mà có thể chặn virus đi vào tế bào. Hiệu giá NT50 được xác định là các phần pha loãng huyết thanh tương hỗ để chặn 50% sự đi vào của virus trong các thử nghiệm trung hòa virus. Hiệu giá NT50 thu được từ phương pháp làm khớp đường cong bốn thông số logit phi tuyến tính.

Sản xuất CMV có khiếm khuyết trong sao chép

Sáng chế đề xuất các phương pháp tạo ra rdCMV. rdCMV theo sáng chế được nhân giống khi có mặt chất làm ổn định như Shield-1 trên tế bào biểu mô, tốt hơn là tế bào biểu mô của người, và tốt hơn nữa là tế bào biểu mô sắc tố võng mạc của người. Theo các phương án bổ sung, tế bào biểu mô sắc tố võng mạc của người là tế bào ARPE-19 được gửi vào American Type Cultures Collection (ATCC) dưới số nộp lưu CRL-2302. Theo một số phương án, Shield-1 có mặt ở nồng độ ít nhất là 0,5 μ M trong môi trường nuôi cấy mô. Theo phương án ưu tiên, Shield-1 có mặt ở nồng độ ít nhất là 2,0 μ M trong môi trường nuôi cấy mô.

Theo một số phương án, tế bào được sử dụng để nhân rdCMV được cho phát triển trên vi chất mang. Vi chất mang là chất nền hỗ trợ cho phép các tế bào kết dính phát triển trong bình tam giác xoay hoặc bình phản ứng sinh học (như bình phản ứng sinh học vi trọng lực thành quay và bình phản ứng sinh học đệm tầng sôi). Vi chất

mang thường là các hạt cầu 125 - 250 μM có mật độ cho phép chúng được duy trì trong dịch huyền phù khi khuấy nhẹ. Các vi chất mang có thể được tạo thành từ nhiều vật liệu khác nhau bao gồm, nhưng không giới hạn ở, DEAE-dextran, thủy tinh, nhựa polystyren, acrylamit, và collagen. Các vi chất mang này có thể có hóa học bề mặt khác nhau bao gồm, nhưng không giới hạn ở, protein chất nền ngoại bào, protein tái tổ hợp, peptit và phân tử mang điện tích. Các hệ thống nuôi cấy tế bào mật độ cao khác, như hệ thống Corning HyperFlask® và HyperStack® cũng có thể được sử dụng.

Môi trường nuôi cấy mô không chứa tế bào có thể được tập hợp và rdCMV có thể được tinh sạch từ đó. Các hạt virus CMV có đường kính vào khoảng 200nm và có thể được tách khỏi các protein khác có mặt trong môi trường thu hoạch sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực bao gồm, nhưng không giới hạn ở, siêu ly tâm qua gradien mật độ hoặc đệm Sorbitol 20%. Khối lượng protein của vacxin có thể được xác định bằng thử nghiệm Bradford.

Shield-1 có thể được sử dụng để kiểm soát sự sao chép của rdCMV kết hợp với FKBP. Sau khi đạt được lượng virus nhân lên mong muốn trong tế bào nuôi cấy mô, khả năng sao chép không còn được mong đợi nữa. Shield-1 được rút khỏi rdCMV để làm cho virus bị khiếm khuyết sao chép (ví dụ, để đưa vào bệnh nhân). Theo một phương án, rdCMV được làm tinh sạch Shield-1 bằng cách rửa một hoặc nhiều lần. Theo phương án khác, rdCMV được làm tinh sạch Shield-1 bằng siêu ly tâm. Theo phương án khác, rdCMV được làm tinh sạch Shield-1 bằng lọc pha loãng (diafiltration). Lọc pha loãng thường được sử dụng để tinh sạch các hạt virus. Theo một phương án, các bộ lọc được sử dụng có kích cỡ lỗ xấp xỉ 750 kilodalton sẽ chỉ cho Shield-1 đi qua các lỗ này.

Sau khi tinh sạch rdCMV khỏi Shield-1, có thể có lượng nhỏ Shield-1 còn sót lại trong chế phẩm rdCMV. Theo một phương án, hàm lượng Shld-1 trong chế phẩm CMV sau khi tinh sạch là thấp hơn ít nhất 100 lần so với lượng cần để duy trì sự sao chép trong môi trường nuôi cấy mô. Theo phương án khác, hàm lượng Shield-1 trong chế phẩm rdCMV sau khi tinh sạch là 0,1 μM hoặc thấp hơn. Theo phương án khác, hàm lượng Shield-1 trong chế phẩm rdCMV sau khi tinh sạch không phát hiện được.

Việc xác định hàm lượng Shield-1 trong chế phẩm có thể được phát hiện sử dụng các phân tích LC/MS (sắc ký lỏng-quang phổ khối) hoặc HPLC/MS (sắc ký lỏng hiệu năng cao-quang phổ khối). Các kỹ thuật này kết hợp các khả năng phân tách vật lý của LC hoặc HPLC với các khả năng phân tích khối lượng của và có thể phát hiện các hóa chất quan tâm trong hỗn hợp phức.

Tá dược

Tá dược là các chất có thể hỗ trợ chất sinh miễn dịch trong việc sinh ra đáp ứng miễn dịch. Tá dược có thể thực hiện chức năng bởi các cơ chế khác nhau như một hoặc nhiều cơ chế sau: làm tăng chu kỳ bán rã sinh học hoặc miễn dịch của kháng nguyên; cải thiện sự phân phối kháng nguyên đến tế bào trình diện kháng nguyên; cải thiện việc xử lý và trình diện kháng nguyên bởi tế bào trình diện kháng nguyên; nhận được sự giảm liều lượng, và, cảm ứng quá trình sản xuất xytokin điều biến miễn dịch (Vogel, 2000, Clin Infect Dis 30:S266). Theo một số phương án, chế phẩm theo sáng chế chứa rdCMV và tá dược.

Nhiều loại tá dược khác nhau có thể được sử dụng để hỗ trợ việc sinh đáp ứng miễn dịch. Các ví dụ về tá dược cụ thể gồm nhôm hydroxit; nhôm phosphat, nhôm hydroxyphosphat, tá dược nhôm hydroxyphosphat sulfat vô định hình (AAHSA) hoặc các muối nhôm khác; canxi phosphat; các motif ADN CpG; monophosphoryl lipid A; độc tố bệnh tả; độc tố không bền nhiệt E. coli; độc tố ho gà; muramyl dipeptit; tá dược chưa hoàn thiện Freund; MF59; SAF; phức chất kích thích miễn dịch; liposom; vi cầu có thể phân hủy sinh học; saponin; copolyme khối phi ion; các chất tương tự muramyl peptit; polyphosphazene; polynucleotit tổng hợp; IFN- γ ; IL-2; IL-12; và ISCOMS. (Vogel, 2000, Clin Infect Dis 30:S266; Klein et al., 2000, J Pharm Sci 89:311; Rimmelzwaan et al., 2001, Vaccine 19:1180; Kersten, 2003, Vaccine 21:915; O'Hagen, 2001, Curr. Drug Target Infect. Disord. 1:273.)

Theo một số phương án, tá dược gốc dầu bao gồm, nhưng không giới hạn ở, tá dược chưa hoàn thiện Freund và MF59, không được sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế.

Theo các phương án khác, tá dược hạt bao gồm, nhưng không giới hạn ở, tá dược ISCOMATRIX® và/hoặc tá dược nhôm phosphat được sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế.

Dược phẩm

Một phương án khác theo sáng chế là sử dụng CMV tái tổ hợp được mô tả trong bản mô tả trong chế phẩm, tốt hơn là chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin, để điều trị cho bệnh nhân nhiễm CMV và/hoặc làm giảm khả năng nhiễm CMV. Tốt hơn là, chế phẩm này chứa chất mang được dụng.

"Chất mang được dụng" được dùng để chỉ chất độn dạng lỏng, chất pha loãng hoặc chất bao mà có thể được sử dụng an toàn khi đưa vào theo đường toàn thân. Phụ thuộc vào con đường đưa vào cụ thể, nhiều loại chất mang được dụng đã biết trong lĩnh vực có thể được sử dụng. Các chất mang này có thể được chọn từ nhóm bao gồm đường, tinh bột, xenluloza và các dẫn xuất của nó, mạch nha, gelatin, bột talc, canxi sulfat, dầu thực vật, dầu tổng hợp, polyol, axit alginic, dung dịch đệm phosphat bao gồm nước muối đệm phosphat, chất nhũ hóa, nước muối đẳng trương, và nước không chứa pyrogen. Cụ thể, các chất mang được dụng có thể chứa các thành phần khác nhau như chất đệm, nước vô trùng để tiêm, nước muối thông thường hoặc nước muối đệm phosphat, sucroza, histidin, muối và polysorbat. Các thuật ngữ như "chấp nhận được về mặt sinh lý học", "chất pha loãng" hoặc "tá dược" có thể được sử dụng thay thế lẫn nhau.

Các quy trình tạo chế phẩm vaccin được bộc lộ, ví dụ, trong New Generation Vaccines (1997, Levine et al., Marcel Dekker, Inc. New York, Basel, Hong Kong), được kết hợp vào bản mô tả bằng cách viện dẫn.

Chế phẩm

Theo một số phương án, rdCMV theo sáng chế được đưa vào bệnh nhân để gây ra đáp ứng miễn dịch. Được mong đợi là có thể giảm thiểu hoặc tránh được sự mất hiệu lực của chế phẩm rdCMV trong quá trình bảo quản chế phẩm sinh miễn dịch này. Các điều kiện để hỗ trợ mục đích này gồm nhưng không giới hạn ở (1) tính ổn định bảo quản được duy trì, (2) chống lại chu trình đóng băng-tan băng chịu áp lực, (3) ổn

định ở nhiệt độ môi trường trong thời gian lên đến một tuần, (4) duy trì tính sinh miễn dịch, (5) tương thích với chiến lược dùng tá dược. Các điều kiện tác động đến tính ổn định của rdCMV gồm, nhưng không giới hạn ở, độ pH của đệm, nồng độ ion đệm, có mặt/không có mặt tá dược cụ thể và nhiệt độ. Chế phẩm này chứa các chất đệm để làm tăng độ ổn định của các hạt virus rdCMV được tinh sạch thích hợp dùng làm chế phẩm vaccin.

Việc bảo toàn tính nguyên vẹn của các hạt virus có thể được đánh giá bằng thử nghiệm tính sinh miễn dịch ở chuột nhắt và/hoặc thử nghiệm xâm nhập của virus. Hoạt động xâm nhập của virus phụ thuộc vào tính nguyên vẹn và chức năng của glycoprotein virus, bao gồm phức gH pentame. Phức gH pentame còn tạo ra tính sinh miễn dịch về cơ bản của rdCMV, do đó hai tính chất này được liên kết với nhau.

Theo một số phương án, rdCMV được bảo quản trong chất đệm chứa Histidin 15-35 mM và NaCl 100-200 mM ở pH nằm trong khoảng từ 5 đến 7. Theo phương án cụ thể, chất đệm chứa Histidin 25mM và NaCl 150mM ở pH = 6.

Theo phương án khác, đường có thể được bổ sung để tạo ra tính ổn định hơn nữa, như các polyol (bao gồm, nhưng không giới hạn ở, mannitol và sorbitol); các monosacarit (bao gồm, nhưng không giới hạn ở, glucoza, mannoza, galactoza và fructoza); các disacarit (bao gồm, nhưng không giới hạn ở, lactoza, maltoza, sucroza, lactuloza và trehaloza) và các trisacarit (bao gồm, nhưng không giới hạn ở, rafinoza và melezitoza). Theo phương án cụ thể hơn, đường là sucroza. Theo phương án cụ thể hơn nữa, sucroza nằm trong khoảng từ 5 đến 15%.

Theo phương án ưu tiên, rdCMV được bảo quản trong chất đệm chứa Histidin 25mM, NaCl 150mM, Sucroza 9% ở pH = 6.

Sử dụng

rdCMV được mô tả trong bản mô tả có thể được bào chế theo công thức và được đưa vào bệnh nhân sử dụng hướng dẫn được cung cấp trong bản mô tả cùng với các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực. Các hướng dẫn để sử dụng trong được nói chung được cung cấp trong, ví dụ, Vaccines Eds. Plotkin and Orenstein, W.B. Sanders Company, 1999; Remington's Pharmaceutical Sciences 20th Edition, Ed. Gennaro,

Mack Publishing, 2000; và Modern Pharmaceutics 2nd Edition, Eds. Banker and Rhodes, Marcel Dekker, Inc., 1990.

Các vaccin có thể được đưa vào bằng các con đường khác nhau như dưới da, trong cơ, trong tĩnh mạch, qua niêm mạc, ngoài đường tiêu hóa, qua da hoặc trong da. Việc đưa vào dưới da và trong cơ có thể được thực hiện sử dụng, ví dụ, kim tiêm hoặc dụng cụ phun tia. Theo một phương án, vaccin theo sáng chế được đưa vào trong cơ. Sự phân phối qua da hoặc trong da có thể được thực hiện bằng kim tiêm xylan trong da, hoặc các thiết bị khả thi như các kim vi cỡ hoặc miếng dán vi màng.

Chế phẩm được mô tả trong bản mô tả có thể được sử dụng theo cách tương thích với chế phẩm liều lượng, và ở lượng hữu hiệu về mặt miễn dịch để điều trị và/hoặc làm giảm khả năng nhiễm CMV (bao gồm nhiễm lần đầu, nhiễm tái phát và/hoặc siêu nhiễm). Liều được sử dụng cho bệnh nhân, theo sáng chế, cần đủ để đem lại đáp ứng có lợi ở bệnh nhân theo thời gian như làm giảm mức độ nhiễm CMV, làm nhẹ triệu chứng của bệnh đi kèm nhiễm CMV và/hoặc làm ngắn lại thời gian và/hoặc mức độ nghiêm trọng của tình trạng nhiễm CMV, hoặc làm giảm khả năng nhiễm CMV (bao gồm nhiễm lần đầu, nhiễm tái phát và/hoặc siêu nhiễm).

Chế độ liều thích hợp có thể được xác định dễ dàng bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này và tốt hơn là được xác định có tính đến các yếu tố đã biết trong lĩnh vực bao gồm tuổi tác, cân nặng, giới tính và bệnh trạng của bệnh nhân; con đường sử dụng; tác dụng mong muốn; và chế phẩm cụ thể được sử dụng. Để xác định lượng hiệu quả của rdCMV được sử dụng trong điều trị hoặc phòng tránh kháng lại CMV, bác sĩ có thể đánh giá lượng huyết tương tuần hoàn của virus, tiến triển của bệnh, và/hoặc việc sản xuất ra các kháng thể kháng CMV. Liều cho chế phẩm vaccin gồm khoảng từ 10^3 đến 10^{12} đơn vị hình thành vết (pfu). Theo các phương án khác, khoảng liều lượng nằm trong khoảng từ 10^4 đến 10^{10} pfu, từ 10^5 đến 10^9 pfu, từ 10^6 đến 10^8 pfu, hoặc là liều bất kỳ nằm trong khoảng quy định này. Khi nhiều hơn một vaccin được sử dụng (tức là, các vaccin kết hợp), lượng mỗi vaccin nằm trong khoảng được mô tả của chúng.

Chế phẩm vaccin có thể được sử dụng ở dạng liều đơn hoặc liều đa. Các vaccin có thể được bào chế với tá dược hàng giờ hoặc hàng ngày trước khi sử dụng, tùy thuộc

vào nhận diện chất đậm làm ổn định và chế phẩm tá dược thích hợp. Các vacxin có thể được sử dụng ở lượng thường được thực hiện, nằm trong khoảng từ 0,1mL đến 0,5mL.

Thời điểm sử dụng liều phụ thuộc vào các yếu tố đã biết trong lĩnh vực. Sau lần sử dụng ban đầu, một hoặc nhiều liều bổ sung có thể được đưa vào để duy trì và/hoặc tăng cường hiệu giá kháng thể và tính miễn dịch tế bào T. Các tăng cường bổ sung có thể được yêu cầu để duy trì mức độ đáp ứng miễn dịch bảo vệ, được phản ánh ở hiệu giá kháng thể và tính miễn dịch tế bào T như ELISPOT. Các mức độ đáp ứng miễn dịch được đưa qua các kiểm tra lâm sàng.

Đối với việc dùng vacxin kết hợp, mỗi trong số các chất sinh miễn dịch có thể được sử dụng cùng nhau trong một chế phẩm hoặc riêng rẽ trong các chế phẩm khác nhau. rdCMV được mô tả trong bản mô tả được sử dụng đồng thời với một hoặc nhiều chất sinh miễn dịch mong muốn. Thuật ngữ "đồng thời" không giới hạn ở việc sử dụng chất trị liệu ở chính xác cùng một thời điểm, mà nó có nghĩa là rdCMV được mô tả trong bản mô tả và các chất sinh miễn dịch mong muốn khác được sử dụng cho đối tượng theo một trình tự và trong khoảng thời gian sao cho chúng có thể tác dụng cùng nhau để tạo ra lợi ích tăng cường so với khi chúng được sử dụng theo cách khác. Ví dụ, mỗi chất trị liệu có thể được sử dụng ở cùng thời điểm hoặc lần lượt theo thứ tự bất kỳ ở các thời điểm khác nhau; tuy nhiên, nếu không được sử dụng cùng một lúc, chúng cần được sử dụng đủ gần nhau về thời gian để tạo ra tác dụng trị liệu mong muốn. Mỗi chất trị liệu có thể được sử dụng riêng rẽ, ở dạng thích hợp bất kỳ và bằng con đường thích hợp bất kỳ.

Quần thể bệnh nhân

"Bệnh nhân" dùng để chỉ động vật có vú có khả năng bị nhiễm CMV. Theo phương án ưu tiên, bệnh nhân là người. Bệnh nhân có thể được điều trị theo hướng phòng ngừa hoặc trị liệu. Điều trị phòng ngừa tạo ra tính miễn dịch bảo vệ đủ để làm giảm khả năng hoặc mức độ nghiêm trọng của sự nhiễm CMV, bao gồm nhiễm lần đầu, nhiễm tái phát (tức là, các lần nhiễm nhận được từ việc tái hoạt hóa CMV ẩn) và siêu nhiễm (tức là, các lần nhiễm nhận được từ sự nhiễm các chủng khác của CMV so với các chủng bệnh nhân đã bị nhiễm trước đó). Điều trị trị liệu có thể được thực hiện

để làm giảm mức độ nghiêm trọng của sự nhiễm CMV hoặc làm giảm khả năng/mức độ nghiêm trọng của nhiễm tái phát hoặc siêu nhiễm.

Việc điều trị có thể được thực hiện sử dụng dược phẩm chứa rdCMV như được mô tả trong bản mô tả. Dược phẩm có thể được sử dụng cho một quần thể chung, đặc biệt là cho những người có nguy cơ nhiễm CMV tăng (nhiễm lần đầu, nhiễm tái phát hoặc siêu nhiễm) hoặc với những người mà sự nhiễm CMV đặc biệt khó giải quyết (như các cá thể bị tổn thương hệ miễn dịch, bệnh nhân cấy ghép hoặc phụ nữ mang thai). Theo một phương án, phụ nữ ở độ tuổi sinh đẻ, đặc biệt là nữ ở độ tuổi thiếu niên, được tiêm chủng để làm giảm khả năng nhiễm CMV (nhiễm lần đầu, nhiễm tái phát hoặc siêu nhiễm) trong quá trình mang thai.

Những đối tượng cần điều trị gồm đối tượng đã bị nhiễm, cũng như là đối tượng dễ bị nhiễm hoặc trong đó sự giảm khả năng nhiễm là mong muốn. Việc điều trị có thể làm nhẹ các triệu chứng bệnh có liên quan đến sự nhiễm CMV và/hoặc làm ngắn thời gian và/hoặc mức độ nghiêm trọng của sự nhiễm CMV, bao gồm sự nhiễm do tái hoạt hóa CMV ẩn.

Những người có nguy cơ nhiễm CMV tăng (nhiễm lần đầu, nhiễm tái phát hoặc siêu nhiễm) gồm các bệnh nhân có tính miễn dịch bị suy giảm hoặc bệnh nhân đang điều trị dẫn đến tính miễn dịch bị suy giảm (ví dụ, đang được hóa trị hoặc xạ trị đối với bệnh ung thư hoặc đang uống thuốc ức chế miễn dịch). Như được sử dụng trong bản mô tả, “tính miễn dịch bị suy giảm” chỉ hệ thống miễn dịch ít có khả năng chống lại sự nhiễm do đáp ứng miễn dịch không mang chức năng phù hợp hoặc không mang chức năng ở mức độ của một người trưởng thành khỏe mạnh bình thường. Ví dụ về bệnh nhân có tính miễn dịch bị suy giảm là các bệnh nhân là trẻ sơ sinh, trẻ em, người già, người mang thai hoặc bệnh nhân bị bệnh ảnh hưởng đến chức năng của hệ thống miễn dịch như nhiễm HIV hoặc AIDS.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ được đưa ra dưới đây để minh họa thêm cho các phương án khác nhau của sáng chế. Các ví dụ này còn minh họa phương pháp hữu ích để thực hiện sáng chế. Các ví dụ này không giới hạn sáng chế được yêu cầu bảo hộ.

Ví dụ 1: Khôi phục phức gH pentame

Dòng nhiễm sắc thể nhân tạo của vi khuẩn ở CMV gây nhiễm được tạo cấu trúc sao cho các hạt virus được mã hóa biểu hiện phức gH pentame gồm UL128, UL130 và UL131 được tập hợp lên giá đỡ gH/gL.

CMV chủng AD169 được phân lập ban đầu từ các hạch của bé gái 7 tuổi (Elek and Stern, 1974, Lancet, 1:1). Virus này được cho đi qua 58 lần trong vài kiểu nguyên bào sợi của người để làm giảm độc lực virus (Neff et al, 1979, Proc Soc Exp Biol Med, 160:32, với 5 lần đi qua cuối cùng là ở trong nguyên bào sợi WI-38 của người. Biến thể đã cho đi qua của virus AD169 này, được đề cập đến trong nghiên cứu là Merck AD169 (MAD169), được sử dụng làm virus bố mẹ để tạo cấu trúc cho dòng BAC gây nhiễm. Cả virus AD169 bố mẹ lẫn virus biến thể đã cho đi qua MAD169 đều không biểu hiện UL131 hoặc phức gH pentame.

MAD169 được sử dụng làm virus bố mẹ để tạo cấu trúc cho dòng nhiễm sắc thể nhân tạo của vi khuẩn (bacterial artificial chromosome (BAC)) gây nhiễm. Vector BAC là dụng cụ phân tử cho phép có thể thao tác di truyền với một đoạn ADN kích thước lớn, như bộ gen CMV (~230Kb), trong *E. coli*. Yếu tố BAC cùng với gen đánh dấu GFP được chèn vào ngay sau codon kết thúc của khung đọc mở US28 (nằm giữa khung đọc mở US28 và US29 trong bộ gen virus) với vị trí LoxP được tạo ra ở cả hai đầu của đoạn này (FIG.1A). Tóm lại, đoạn ADN chứa catxet biểu hiện GFP được kẹp sườn bởi hai vị trí loxP và các trình tự US28-US29 của CMV được tổng hợp và được tách dòng vào vector pBeloBAC11. Vector BAC được làm thẳng ra bằng enzym giới hạn Pme I, và đồng gây nhiễm vào tế bào MRC-5 bằng ADN MAD169 được tách chiết từ các hạt virus đã được tinh sạch. Các biến thể tái tổ hợp, được nhận biết bằng biểu hiện phát huỳnh quang xanh lá cây, được tinh sạch vết. Sau một vòng khuếch đại, dạng tròn của bộ gen virus được tách khỏi tế bào đã được gây nhiễm, và dùng xung điện để đưa vào tế bào DH10 của *E.coli*. Các khuẩn lạc của vi khuẩn được sàng lọc bằng PCR đối với sự có mặt của các vùng US28 và US29. Các dòng ứng cử được kiểm tra thêm bằng các phân tích giới hạn EcoR I, EcoR V, Hind III, Spe I và Bam HI. Sau khi sàng lọc, một dòng, bMAD-GFP, thể hiện mẫu giới hạn giống với virus MAD169 bố mẹ.

Đột biến xê dịch khung trong exon đầu tiên của UL131 là cơ sở thiếu sót về tính hướng kích thích biểu mô trong MAD169 được sửa chữa về mặt di truyền trong E. coli (FIG.1B). Cụ thể, một adenin nucleotit (nt) từ đoạn kéo dài A có 7 nt trong gen UL131 bị xóa (FIG.1B). Phần xóa 1 nt là đủ để phóng thích tính hướng kích thích tế bào biểu mô và nội mô do UL131, và do đó phức gH pentamer được biểu hiện. Sự biểu hiện được xác nhận bằng kỹ thuật ELISA và thẩm tách western (số liệu không được thể hiện). Dòng này được cải biến thêm bằng cách loại bỏ đoạn BAC bằng sự tái tổ hợp LoxP/Cre. ADN BAC được gây nhiễm vào tế bào ARPE-19, tế bào biểu mô sắc tố võng mạc của người (ATCC Số nộp lưu CRL-2302), để khôi phục virus gây nhiễm (FIG.1C). Virus gây nhiễm nhận được, được gọi là virus MAD169 hướng kích thích biểu mô thu được từ BAC (beMAD), khác với MAD169 chỉ ở hai vị trí, (1) ORF UL131 trong đó một adenin nucleotit bị xóa và (2) vị trí 34bp LoxP được chèn vào giữa ORF US28 và US29 (xem Bảng 2).

Bộ gen của beMAD dòng BAC được lập trình tự hoàn chỉnh. Toàn bộ cấu trúc bộ gen của beMAD là giống với cấu trúc được báo cáo trong biến thể ATCC AD169 (GenBank Số nộp lưu X17403), mà gồm hai vùng đơn nhất, vùng dài (UL) và vùng ngắn (US). Mỗi vùng đơn nhất được đóng ngoặc đơn bởi hai trình tự lặp lại, trình tự dài lặp ở hai đầu (TRL)-trình tự dài lặp ở bên trong (IRL), trình tự ngắn lặp ở hai đầu (TRS)-trình tự ngắn lặp ở bên trong (IRS). Động học sinh trưởng của virus thu được từ biến thể được cho đi qua MAD169 và beMAD là không thể phân biệt được trong các tế bào MRC-5, dòng tế bào nguyên bào sợi của người (ATCC Số nộp lưu CCL-171) (số liệu không được thể hiện). Do phức gH không cần thiết cho sự sinh trưởng trên tế bào nguyên bào sợi, các khác biệt về mức biểu hiện phức gH giữa MAD169 và beMAD là không liên quan.

Bảng 2: Khác biệt về mặt phân tử của các virus CMV

ID Virus	Chế phẩm gen	Protein trong các hạt virus
AD169	ATCC chủng phòng thí nghiệm chứa đột biến xê dịch khung trong UL131 gây khiếm khuyết về tính hướng	

	kích thích biểu mô	
MAD169	Chứa đột biến xê dịch khung trong UL131 giống với ATCC AD169	Giống với AD169 từ ATCC
beMAD	Đột biến được sửa chữa xê dịch khung trong UL131; trình tự LoxP (34 bp) giữa ORF US28 và US29	Giống với MAD169, với sự bổ sung phức gh pentame

Ví dụ 2: Ảnh hưởng của các phương pháp làm bất hoạt thông thường đến phức gh

Ảnh hưởng của hai phương pháp làm bất hoạt virus thông thường, bức xạ γ và β -Propiolacton (BPL), đến CMV biểu hiện gh được kiểm tra.

Bức xạ γ được thực hiện trên các hạt virus được làm đông khô. Vacxin CMV tái tổ hợp ở nồng độ 0,15 mg/mL trong chế phẩm HNS (Histidin 25mM, NaCl 150mM, Sucroza 9% trọng lượng/thể tích, pH=6,0) được làm đông khô sử dụng chu trình làm đông khô bảo toàn (làm đông ở -50°C và làm khô sơ cấp ở nhiệt độ -35°C trong khoảng 30 giờ sau đó làm khô thứ cấp ở nhiệt độ 25°C trong 6 giờ) để thu được bột khô. Vacxin được làm đông khô trong lọ thủy tinh 3mL với 0,5ml được đổ vào mỗi lọ. Ở cuối giai đoạn làm đông khô, các lọ được làm dừng trong môi trường nitơ và các mẫu được lấy ra, dán nhãn, gấp mép và được bảo quản ở -70°C cho đến khi chiếu bức xạ gamma. Các lọ được chiếu bức xạ bằng máy chiếu bức xạ Co với liều lượng bức xạ mong muốn.

Để xử lý BPL, dung dịch BPL gốc được thêm vào chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy virus thô từ sự sinh trưởng trên các tế bào ARPE-19 để đạt đến nồng độ cuối là 0,01% hoặc 0,1% (thể tích/thể tích). Phản ứng được kết thúc bằng natri thiosulfat ở các thời điểm khác nhau. Sau đó, CMV biểu hiện gh đã xử lý BPL được tinh sạch bằng siêu ly tâm.

Động học bất hoạt đối với cả hai phương pháp được xác định bằng thử nghiệm tạo vết trong tế bào ARPE-19. Một cách vắn tắt, các phân pha loãng liên tiếp của các mẫu virus trong PBS được tạo ra và 0,1mL được sử dụng để cấy vào mỗi giếng của đĩa 6 giếng đã được gieo mầm tế bào ARPE-19. Các đĩa được ủ ở 37°C trong 1 giờ trước

khi bổ sung 6mL môi trường phủ chứa 0,5% agarosa vào mỗi giếng. Các đĩa được ủ trong 18 ngày ở 37°C. Để hiển thị các vết, khoảng 0,5mL dung dịch MTT ở 5 mg/mL (Thiazolyl blue tetrazoli bromua, Sigma M5655) được thêm vào mỗi giếng. Các đĩa được ủ ở 37°C trong từ 2 đến 4 giờ và các vết được đếm trong hộp đèn. (FIG.2A và 2C).

Tính sinh miễn dịch của CMV biểu hiện gH bị làm bất hoạt được thử nghiệm bằng cách xác định các hiệu giá kháng thể trung hòa được gây ra ở chuột nhắt. Một cách vắn tắt, chuột cái Balb/c (n=10) được gây miễn dịch với 2,5µg CMV mỗi liều ở các tuần 0 và 3. Huyết thanh được tập hợp lại ở tuần 4 và được đánh giá hoạt tính trung hòa kháng lại sự đi vào biểu mô của virut. Hiệu giá trung hòa (NT50) được xác định là sự pha loãng tương hỗ của huyết thanh làm giảm 50% khả năng đi vào biểu mô của virut so với đối chứng âm. Kết quả từ các nghiên cứu tính sinh miễn dịch ở chuột chỉ ra rằng cả hai phương pháp làm bất hoạt thông thường đều có ảnh hưởng tiêu cực đến hiệu giá kháng thể trung hòa được gây ra bởi CMV biểu hiện gH (FIG.2B và 2D). Việc giảm hiệu giá NT50 tương quan với thời gian xử lý bằng bức xạ γ hoặc BPL. Các xử lý kéo dài làm cho CMV biểu hiện phức gH pentame giống CMV AD169 bố mẹ hơn về tính sinh miễn dịch ở chuột nhắt. Các kết quả tương tự được quan sát ở thỏ và khỉ Rhesus khi các vacxin bị làm bất hoạt bằng bức xạ γ hoặc BPL được kiểm tra (số liệu không được thể hiện). Các quan sát này cho thấy rằng phức gH pentame là nhạy với cả hai phương pháp làm bất hoạt dưới các điều kiện làm bất hoạt chọn lọc.

Ví dụ 3: Tạo cấu trúc và sàng lọc thể dung hợp FKBP-protein thiết yếu

CMV được tạo cấu trúc bằng cách sử dụng phần chính của chủng AD169 đã được giảm độc lực mà khôi phục lại tính hướng kích thích biểu mô của nó mặc dù có khiếm khuyết trong sao chép có điều kiện. Các phương pháp được mô tả trong Ví dụ 1 được sử dụng để khôi phục tính hướng kích thích biểu mô.

Protein của virut cần được dung hợp với dẫn xuất FKBP được lựa chọn dựa trên hai tiêu chuẩn. Thứ nhất, protein quan tâm không bị phát hiện trong các hạt virut CMV bởi phân tích protein (Varnum et al., 2004, J. Virol. 78:10960), do đó, làm giảm khả năng protein dung hợp FKBP sẽ kết hợp vào virut. Thứ hai, protein quan tâm là cần thiết cho sự sao chép của virut trong việc nuôi cấy mô.

Bằng cách sử dụng beMAD làm virus bố mẹ, dẫn xuất FKBP (SEQ ID NO:12) được dung hợp với 12 protein virus thiết yếu một cách riêng rẽ, bao gồm IE1/2 (SEQ ID NO:1), pUL37x1, pUL44, pUL51 (SEQ ID NO:3), pUL52 (SEQ ID NO:5), pUL53, pUL56, pUL77, pUL79 (SEQ ID NO:7), pUL84 (SEQ ID NO:9), pUL87 và pUL105. Virus có hai protein thiết yếu khác nhau dung hợp với FKBP cũng được tạo cấu trúc để dung hợp mỗi trong số IE1/2 và UL51 với dẫn xuất FKBP (bộ gen của rdCMV với IE1/2 và UL51 bị khử ổn định được thể hiện trong SEQ ID NO:14). Sau khi tạo cấu trúc, tất cả các ADN BAC tái tổ hợp được gây nhiễm vào tế bào ARPE-19, và được nuôi cấy trong môi trường chứa Shld-1.

Sự phụ thuộc vào Shld-1 của quá trình phát triển virus được kiểm tra. Các virus thể dung hợp IE1/2, UL51, UL52, UL84, UL79 và UL87 được giải phóng dễ dàng trong Shld-1 2 μ M trong các thử nghiệm tạo vết (số liệu không được thể hiện). Các virus UL37x 1, UL77 và UL53 cũng tạo ra vết, nhưng các vết này nhỏ, và chúng phát triển tương đối chậm hơn so với beMAD bố mẹ. Việc tăng nồng độ Shld-1 đến 10 μ M không đẩy mạnh đáng kể sự phát triển virus (số liệu không được thể hiện). Các thể dung hợp UL56 và UL105 không được khôi phục, gợi ý rằng việc gắn thể các protein phá vỡ chức năng của các protein này, hoặc sự biểu hiện gen lân cận.

Các nồng độ thay đổi của Shld-1 được sử dụng trong các thử nghiệm khác để đánh giá thêm sự sao chép của virus khi có mặt hoặc không có mặt Shld-1. Tế bào ARPE-19 được gây nhiễm CMV biểu hiện gH mà còn chứa dẫn xuất FKBP dung hợp với protein thiết yếu ở MOI bằng 0,01 pfu/ml. Sau khi gây nhiễm 1 giờ, tế bào được rửa hai lần với môi trường mới để loại bỏ Shld-1 ra khỏi chất cấy. Sau đó, các chất cấy này được thêm vào các tế bào ARPE-19 được nuôi cấy trong môi trường chứa Shield-1 ở nồng độ 0,05, 0,1, 0,5 hoặc 2 μ M. Bảy ngày sau khi gây nhiễm, virus đời sau không chứa tế bào trong chất nổi bề mặt được tập hợp lại và được chuẩn độ trên tế bào ARPE-19 được bổ sung Shield-1 nồng độ 2mM. Các hiệu giá virus được xác định bằng thử nghiệm liều gây nhiễm 50% tế bào (50% Tissue Culture Infective Dose (TCID₅₀)). Một cách vắn tắt, thử nghiệm pha loãng này định lượng lượng virus cần để giết 50% vật chủ bị nhiễm. Tế bào ARPE-19 được cấy lên đĩa và các phân pha loãng liên tiếp của virus được bổ sung. Sau thời gian ủ, phần trăm chết tế bào (tức là tế bào bị

nhễm) được quan sát và ghi lại bằng tay với mỗi phần pha loãng virus. Các kết quả được sử dụng để tính toán toán học TCID₅₀.

Như được thể hiện trên FIG.3, sự sao chép hiệu quả của tất cả CMV chứa thể dung hợp FKBP phụ thuộc vào nồng độ Shield-1, dù mức độ thay đổi. Nồng độ thấp hơn của Shield-1 nói chung làm giảm hiệu giá của việc sản xuất virus đời sau. Trong số các virus có thể dung hợp đơn, chỉ UL51 và UL52 là tuyệt đối cần Shield-1 để sao chép. Các virus có thể dung hợp đơn khác, IE1/2, UL84, UL79, và UL87, có thể tạo ra virus đời sau phát hiện được khi không có mặt Shield-1. Sự điều chỉnh là chặt nhất khi dẫn xuất FKBP được dung hợp với UL51 hoặc UL52.

Động học sinh trưởng của virus có thể dung hợp IE1/2, UL51, IE1/2-UL51 được so sánh với virus beMAD bố mẹ khi có mặt hoặc không có mặt Shld-1 2 μ M. Như được thể hiện trên FIG.4, khi có mặt Shld-1, thể dung hợp đơn hoặc dung hợp kép có động học sinh trưởng có thể so sánh được với beMAD bố mẹ. Tuy nhiên, khi không có mặt Shld-1, chỉ IE1/2 có thể sao chép, mặc dù ở tốc độ thấp hơn và chậm hơn so với beMAD bố mẹ.

Sự chặt chẽ trong việc kiểm soát sự sao chép virus ở virus thể dung hợp kép còn được kiểm tra trong các loại tế bào khác nhau (FIG.5). Các tế bào này gồm tế bào tĩnh mạch rốn của người (HUVEC), nguyên bào sợi MRC-5, tế bào cơ trơn động mạch chủ (AoMC), tế bào cơ vân (SKMC) và u bào hình sao CCF-STTG1. Các tế bào này được gây nhiễm virus thể dung hợp IE1/2-UL51 ở MOI bằng 0,01 pfu/tế bào (ngoại trừ CCF-STTG1 được gây nhiễm với MOI = 5 pfu/tế bào), và sau đó được ủ trong môi trường có mặt hoặc không có mặt Shield-1. Tất cả các kiểu tế bào đều có thể hỗ trợ sự sao chép virus phân giải khi có mặt Shield-1. Không có sự sản xuất virus nào được phát hiện thấy khi không có mặt Shield-1.

Ví dụ 4: Tính sinh miễn dịch của virus thể dung hợp kép IE1/2-UL51 ở động vật

Tính sinh miễn dịch của virus thể dung hợp kép IE1/2-UL51 được đánh giá ở chuột nhắt, thỏ và khỉ Rhesus. Đáp ứng trung hòa phụ thuộc liều kháng lại virus thể dung hợp kép IE1/2-UL51 hoặc virus beMAD bố mẹ ở chuột nhắt trước tiên được so sánh (FIG.6A). Chuột nhắt BALB/c cái sáu tuần tuổi được gây miễn dịch ở các tuần 0 và 4 bằng beMAD hoặc virus thể dung hợp kép IE1/2-UL51 ở liều nằm trong khoảng

từ 0,12 μ g đến 10 μ g. Các mẫu huyết thanh từ tuần 6 được tập hợp và được phân tích bằng thử nghiệm trung hòa vi lượng CMV trên tế bào ARPE-19 như được mô tả trước đó (Tang et al, Vaccine, "A novel throughput neutralization assay for supporting clinical evaluations of human cytomegalovirus vaccines" được công bố điện tử ngày 30/8/2011 tại trang doi:10.1016/j.vaccine.2011.08.086). Các đáp ứng được so sánh ở các liều 0,12, 0,37, 1,1, 3,3 và 10 μ g. Ở khoảng liều lượng thấp (0,12 đến 1,1 μ g), beMAD gây miễn dịch nhiều hơn một chút với các kháng thể trung hòa được phát hiện phù hợp khi mức liều lượng lớn hơn 0,37 μ g. Ở khoảng liều lượng cao (3,3 và 10 μ g), các hiệu giá kháng thể trung hòa gây ra bởi hai virus là tương đương.

Tiếp theo, tính sinh miễn dịch của các virus khác nhau ở thỏ ở liều lượng 10 μ g được so sánh. Thỏ cái NZW được gây miễn dịch ở các tuần 0, 3 và 8 với 10 μ g beMAD hoặc các virus thể dung hợp được chỉ định. Huyết thanh tuần 10 được tập hợp và được phân tích bằng thử nghiệm trung hòa vi lượng CMV trên tế bào ARPE-19 (FIG.5B). beMAD, các virus thể dung hợp đơn IE1/2 hoặc UL51 và virus thể dung hợp kép IE1/2-UL51 có thể gây ra các hiệu giá kháng thể trung hòa cao hơn đáng kể so với MAD169, một virus tương tự với AD169 và không có phức gH pentamer. Điều này khẳng định rằng sự biểu hiện của phức gH bởi virus làm tăng đáng kể tính sinh miễn dịch của CMV tái tổ hợp.

Tiếp theo, tính sinh miễn dịch của 100 μ g virus thể dung hợp kép IE1/2-UL51 hoặc virus beMAD bố mẹ được kiểm tra ở các con khỉ *Rhesus macaques*. Huyết thanh tuần 12 được tập hợp lại và được phân tích bằng thử nghiệm trung hòa vi lượng CMV trên tế bào ARPE-19. Các hiệu giá NT50 GMT ở tuần 12 (sau liều 3) lần lượt là 11500 hoặc 15600. Các hiệu giá này tương đương với hiệu giá NT50 được thấy trong các cá thể nhiễm tự nhiên (FIG.5C).

Độ bền của đáp ứng miễn dịch do vacxin CMV virus thể dung hợp kép IE1/2-UL51 gây ra được chứng minh ở các con khỉ *Rhesus macaques*. Các con vật được cho dùng vacxin với 10 μ g/liều hoặc 100 μ g/liều virus thể dung hợp kép IE1/2-UL51 (theo tổng khối lượng protein). Các chế phẩm chứa 10 μ g/liều vacxin với tá dược nhôm hydroxylphosphat sulfat vô định hình (AAHS) hoặc ISCOMATRIX® cũng được bao gồm. Các vacxin được sử dụng ở các tuần 0, 8, và 24 ở các con khỉ *Rhesus macaques*

(n=5). Để so sánh, nhóm đối chứng nhận gB tái tổ hợp ở 30 µg/liều được bào chế theo công thức với tá dược MF59 ở các tuần 0, 4 và 24. Giá trị trung bình hình học đối với các hiệu giá NT50 tương hỗ (GMT) cho tất cả các nhóm được biểu diễn theo trục tung (FIG.7). Trước khi cho dùng vaccin, không có hiệu giá kháng thể trung hòa >40 nào phát hiện được với bất kỳ con khi nào. Hoạt tính trung hòa nhỏ nhất được phát hiện sau liều thứ nhất ở tuần 4 với tất cả các nhóm với các hiệu giá kháng thể trung hòa chạm đỉnh quanh tuần 12 và tuần 28 (bốn tuần sau lần dùng vaccin thứ hai và thứ ba, theo thứ tự). GMT đỉnh ở tuần 28 với nhóm 100 µg/liều là 14500 (cao hơn khoảng 3 lần so với hiệu giá 4660 của nhóm 10 µg/liều). Tá dược ISCOMATRIX®, chứ không phải AAHS, tạo ra lợi ích tá dược khi so sánh với nhóm 10 µg/liều. GMT ở tuần 28 với nhóm ISCOMATRIX® đo được là 15800 trong khi đó nhóm AAHS là 3000 và nhóm 10 µg/liều là 4660. Hoạt tính trung hòa nhỏ nhất được phát hiện với nhóm đối chứng (gB/MF59), có GMT đỉnh không lần nào vượt quá 200. Ở tuần nghiên cứu 72, gần 1 năm sau khi hoàn thành chế độ dùng vaccin ở các tuần 0, 8 và 24, GMT đối với nhóm 100 µg/liều và nhóm chế phẩm ISCOMATRIX® được duy trì lần lượt ở 1400 và 3000. Vào lúc này, GMT đối với nhóm 10 µg/liều và nhóm AAHS là khoảng 200.

Tế bào đơn nhân máu ngoại biên (PBMC) từ khỉ *Rhesus macaques* được tập hợp ở tuần 28 (4 tuần sau liều 3) của chế độ dùng vaccin và được đánh giá trong thử nghiệm IFN-γ ELISPOT. Các con khi được cho dùng vaccin với 100 µg/liều (FIG.8A) hoặc 10 µg/liều (FIG.8B-8D) virus thể dung hợp kép IE1/2-UL51. Ngoài ra, 10 µg/liều được bào chế theo công thức không có tá dược (FIG.8B) hoặc có tá dược AAHS (FIG.8C) hoặc tá dược ISCOMATRIX® (FIG.8D). Các kháng nguyên của các peptit chồng lên nhau đã gom biểu thị năm kháng nguyên HCMV được sử dụng để kích thích việc sản xuất IFN-γ *ex-vivo*. Các kháng nguyên HCMV được sử dụng là IE1 và IE2 (cả hai protein điều tiết của virus) và pp65, gB và pp150 (kháng nguyên cấu trúc của virus chiếm ưu thế). Chất lượng của các đáp ứng tế bào T được đánh giá bằng độ lớn (giá trị trung bình hình học) của các đáp ứng ELISPOT cũng như tỷ lệ bộ đáp ứng với kháng nguyên virus. Trước khi dùng vaccin, không có hiệu giá ELISPOT đặc hiệu kháng nguyên nào ở bất kỳ con khi nào (số liệu không được thể hiện).

Ở tuần 28, giá trị trung bình hình học trong đáp ứng ELISPOT với năm kháng nguyên HCMV (tức là, IE1, IE2, pp65, gB và pp150) là 186, 132, 253, 87, 257 tế bào hình thành vết (SFC)/ 10^6 PBMC với nhóm 100 μ g/liều so với 21, 24, 107, 111, 33 SFC/ 10^6 PBMC với nhóm 10 μ g/liều, theo thứ tự (FIG.8A và 8B). Bộ đáp ứng ở mỗi nhóm (n=5) được tính điểm dựa trên các tiêu chuẩn giới hạn là lớn hơn 55 SFC/ 10^6 PBMC và tăng hơn 3 lần trong các đáp ứng đặc hiệu kháng nguyên so với đáp ứng dimetyl sulfoxit (DMSO). Số các bộ đáp ứng với năm kháng nguyên HCMV (tức là, IE1, IE2, pp65, gB và pp150) là 4, 4, 5, 1, 3 đối với nhóm 100 μ g/liều so với 1, 1, 5, 4, 0 đối với nhóm 10 μ g/liều.

Ảnh hưởng của tá dược ISCOMATRIX® đến đáp ứng tế bào T với 10 μ g/liều virus thể dung hợp kép IE1/2-UL51 được thể hiện trên FIG.8D. Giá trị trung bình hình học của đáp ứng ELISPOT với năm kháng nguyên HCMV (tức là, IE1, IE2, pp65, gB và pp150) lần lượt là 114, 53, 491, 85, 113 SFC/ 10^6 PBMC và số các bộ đáp ứng trong nhóm này (n=5) lần lượt là 3, 2, 5, 3, 3. Độ lớn và độ rộng của đáp ứng tế bào T trong nhóm có tá dược ISCOMATRIX® là tương tự với độ lớn và độ rộng của đáp ứng tế bào T trong nhóm 100 μ g/liều.

PBMC từ các con vật được dùng vaccin với 10 μ g/liều hoặc 100 μ g/liều virus thể dung hợp kép IE1/2-UL51 (theo tổng khối lượng protein) với ISCOMATRIX® được phân tích thêm trong phương pháp nhuộm xytokin nội bào sau khi được kích thích bằng kháng nguyên HCMV (pp65, IE1, IE2 hoặc toàn bộ hạt virus HCMV). Đối chứng âm là khi chưa quen thí nghiệm không được dùng vaccin virus thể dung hợp kép IE1/2-UL51 trong khi đối chứng dương là nội độc tố *Staphalococcus B* (SEB). FIG.9 cho thấy rằng đối chứng âm thể hiện đáp ứng tối thiểu với tất cả các kích thích kháng nguyên nhưng đáp ứng với chất đối chứng dương nội độc tố *Staphalococcus B* (SEB) như được mong đợi. Tất cả mười con khi được cho dùng vaccin từ cả hai nhóm đáp ứng với kháng nguyên đặc hiệu HCMV với độ lớn và kiểu tương tự. Giá trị trung bình hình học với mỗi kháng nguyên được tính với cả mười con khi. Cả mười con khi thể hiện đáp ứng tế bào T CD8+ (FIG.9A) và CD4+ (FIG.9B) tương đương khi các PBMC của chúng được kích thích bằng nhóm peptit kháng nguyên CMV (tức là, pp65, IE1 và IE2) nhưng ưu tiên thể hiện đáp ứng tế bào T CD4+ khi được kích thích với

toàn bộ hạt virus HCMV. Điều này là không mong muốn vì toàn bộ các hạt virus là kháng nguyên protein và có thể được xử lý như là kháng nguyên ngoại sinh và được trình diện với tế bào T CD4⁺ bởi các phân tử MHC lớp II. Virus thể dung hợp kép IE1/2-UL51 có thể gây ra đáp ứng tế bào T của cả hai kiểu hình CD4⁺ và CD8⁺, tương tự với đáp ứng thường được thấy ở các đối tượng khỏe mạnh bị nhiễm HCMV.

Các chế phẩm khác nhau của virus thể dung hợp kép IE1/2-UL51 với các muối nhôm được so sánh khả năng tạo ra các kháng thể trung hòa ở các con khỉ *Rhesus macaques* (FIG.10). 30 µg/liều virus thể dung hợp kép IE1/2-UL51 được bào chế theo công thức với HNS (chất đệm bazơ), nhôm hydroxylphosphat sulfat vô định hình (AAHS) hoặc tá dược nhôm phosphat Merck (MAPA) và được sử dụng ở các tuần 0 và 8. Các mẫu huyết thanh được tập hợp ở tuần 12 cho thấy rằng mặc dù MAPA làm tăng cường sự tạo ra kháng thể trung hòa, sự tăng cường này không có ý nghĩa về mặt thống kê (kiểm định t hai phía không ghép cặp).

Ví dụ 5: Nhận biết chất đệm để bảo quản

Virus CMV trong dung dịch muối cân bằng Hank (HBSS) và được bảo quản ở nhiệt độ -70°C cho đến khi sử dụng được pha loãng khoảng 10 lần bằng chất đệm thích hợp. Các thành phần còn lại của chất đệm HBSS trong mỗi mẫu bao gồm kali clorua 0,533mM, kali phosphat monobazơ 0,044mM, natri phosphat dibazơ 0,034mM, natri clorua 13,79mM, natri bicacbonat 0,417mM và glucoza 0,1% trọng lượng/thể tích. Các mẫu này sau đó được bảo quản ở nhiệt độ trong phòng hoặc ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C trong 4 ngày hoặc được làm tan băng. Đối với chu trình đóng băng-tan băng, mẫu được bảo quản ở nhiệt độ -70°C trong ít nhất 1 giờ và được làm tan băng ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút trong một hoặc ba chu trình. Độ ổn định của các mẫu được kiểm tra vào ngày 4 bằng cách sử dụng thử nghiệm xâm nhập của virus. Một cách vắn tắt, thử nghiệm được thực hiện sử dụng một vài mẫu pha loãng khác nhau để nhận được đường cong đáp ứng và giá trị EC50 (µg/mL) được nhận từ các kết quả thử nghiệm xâm nhập của virus bằng việc làm khớp đường cong phi tuyến tính. Giá trị EC50 thấp hơn biểu thị độ ổn định tốt hơn. Giá trị EC50 về tính ổn định của các mẫu được so sánh dựa trên mẫu đối chứng đông lạnh ở nhiệt độ -70°C.

Thử nghiệm xâm nhập của virus xác định khả năng của CMV trong việc gây nhiễm tế bào ARPE-19 và biểu hiện IE1 (protein 1 sớm ngay tức thì). Thử nghiệm này được thực hiện trong đĩa trong suốt 96 giếng. Các kháng thể sơ cấp đặc hiệu IE1 và các kháng thể thứ cấp được biotin hóa được sử dụng để phát hiện protein đích trong các tế bào đã được cố định và tín hiệu phát huỳnh quang từ mỗi giếng được định lượng sử dụng thuốc nhuộm IR Dye 800CW Streptavidin cùng với Sapphire 700/DRAQ5 (để chuẩn hóa đầu vào tế bào). Các kết quả được vẽ đồ thị theo tỷ lệ mật độ tích hợp (Integ. Ratio) 800/700 với nồng độ CMV (protein tổng, $\mu\text{g/mL}$). Giá trị EC50 cũng thu được từ các kết quả thử nghiệm tính gây nhiễm sử dụng phép làm khớp đường cong phi tuyến tính. Vì sự nhiễm virus của tế bào ARPE-19 dựa trên tính nguyên vẹn của kháng nguyên glycoprotein virus, cụ thể là phức hợp pentamer, giá trị EC50 phản ánh các hạt virus được bảo toàn tốt như thế nào dưới các điều kiện này.

Như được thể hiện trên FIG.11, CMV mất tính gây nhiễm khi được bảo quản trong bốn ngày trong HBSS ở nhiệt độ trong phòng. Hơn nữa, 3 chu trình đông băng-tan băng trong HBSS dẫn đến làm mất hoàn toàn tính gây nhiễm khi được đánh giá bằng thử nghiệm xâm nhập của virus. Do đó, HBSS không phải là chất đệm tối ưu để bảo quản CMV.

Ảnh hưởng của độ pH đến tính ổn định CMV ở nhiệt độ trong phòng được kiểm tra bằng cách sử dụng khoảng pH từ 3 đến 8. Các chất đệm sau đây được sử dụng: đệm xitrat (25mM), pH = 3,0; đệm axetat (25mM), pH = 4; đệm axetat (25mM), pH = 5; đệm histidin (25mM), pH = 6; đệm HEPES (25mM), pH = 7; Dung dịch muối cân bằng Hank (HBSS), pH = 7,5 và đệm Tris (25mM), pH = 8.

Các mẫu được điều chế bằng cách pha loãng khối virus 10 lần bằng chất đệm thích hợp. Các mẫu được bảo quản ở nhiệt độ trong phòng (25°C) trong 4 ngày. Vào ngày 4, độ ổn định của các mẫu được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm xâm nhập của virus. CMV trong HBSS được bảo quản đông lạnh ở -70°C được xử lý như là đối chứng. Phổ UV-Vis với mỗi trong số các mẫu thu được ở thời điểm 0 và vào ngày 4 để kiểm tra các thay đổi về cấu trúc và kết tụ xảy ra trong quá trình bảo quản.

Như được thể hiện trên FIG.12, đệm Histidin 25mM ở pH = 6 tạo ra tính ổn định tốt hơn đối với CMV bằng cách giữ được tính gây nhiễm ở nhiệt độ trong phòng

so cao hơn với các pH được kiểm tra khác. Dẫn xuất thứ hai của phổ UV chỉ ra profin cấu tạo tương tự của virus ở tất cả các độ pH (số liệu không được thể hiện). Không có sự kết tụ đáng kể nào quan sát được ở độ pH bất kỳ được kiểm tra như được đo bởi mật độ quang ở bước sóng 350nm (số liệu không được thể hiện).

Ảnh hưởng của ure một mình nó hoặc kết hợp với natri clorua đến tính ổn định virus CMV được kiểm tra trong đệm Histidin 25mM, pH = 6. Việc bổ sung chỉ ure 2% không tác động đến tính ổn định CMV. Tuy nhiên, ure 2% kết hợp với NaCl 150mM cải thiện tính ổn định của CMV ở nhiệt độ trong phòng (FIG.13).

Ảnh hưởng của nồng độ ion đến tính ổn định CMV được kiểm tra ở pH = 6. Các nồng độ tăng dần của NaCl (NaCl 0mM, 75mM, 150mM và 320mM) được thêm vào đệm Histidin 25mM ở pH = 6. Tính ổn định CMV phụ thuộc vào nồng độ ion trong đó nồng độ ion cao hơn dẫn đến tính ổn định tốt hơn (FIG.14). Việc có mặt ure không có hoặc có rất ít ảnh hưởng đến tính ổn định CMV (số liệu không được thể hiện).

Ngoài ra, một số tá dược khác (sucroza, sorbitol, glyxerol, và prolin) được sàng lọc ảnh hưởng của chúng đến tính ổn định CMV biểu hiện GH ở nhiệt độ trong phòng. Các tá dược cần được kiểm tra được bổ sung vào CMV trong đệm Histidin 25mM, pH = 6 ở nhiệt độ trong phòng trong 4 ngày trước khi tính ổn định virus CMV được xác định sử dụng thử nghiệm xâm nhập của virus. Giá trị EC_{50} được tính toán cho các mẫu. Trong tất cả các tá dược được kiểm tra, NaCl 150mM một mình hoặc kết hợp với sucroza 9% trọng lượng/thể tích tạo ra tính ổn định tốt hơn ở pH = 6 (số liệu không được thể hiện). Do đó, chất đệm được khuyến nghị để bảo quản CMV ở nhiệt độ trong phòng là Histidin 25mM (pH = 6) với NaCl 150mM có hoặc không có sucroza 9% trọng lượng/thể tích.

Ảnh hưởng của chất bảo quản đông lạnh đến tính ổn định CMV trong quá trình đóng băng-tan băng được kiểm tra. Như được chỉ ra trước đó (FIG.11), CMV trong HBSS mất hoàn toàn tính gây nhiễm của nó khi được đưa qua ba chu trình đóng băng-tan băng. Một số chất bảo quản đông lạnh (bao gồm sucroza, sorbitol, glyxerol) được sàng lọc cho khả năng loại bỏ sức ép đóng băng-tan băng lên CMV. Với mỗi chu trình đóng băng-tan băng, các mẫu được đóng băng ở -70°C trong ít nhất 1 giờ và tan băng

ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Việc bổ sung chất bảo quản đông lạnh dẫn đến tính ổn định của virus răng. Hơn nữa, sucroza 9% trọng lượng/thể tích kết hợp với natri clorua 150mM dẫn đến tính ổn định của virus tăng đáng kể so với các chất bảo quản đông lạnh được kiểm tra khác (FIG.15). Do đó, chế phẩm đậm được khuyến nghị để bảo quản CMV ở -70°C hoặc lên đến 3 chu trình đóng băng-tan băng là Histidin 25mM, NaCl 150mM và sucroza 9% (chất đậm HNS).

Chất đậm HNS được so sánh với chất đậm HBSS để bảo vệ tính ổn định CMV trong ba chu trình đóng băng-tan băng, làm lạnh ($2-8^{\circ}\text{C}$) và nhiệt độ trong phòng (RT) (25°C). Chất đậm HNS tạo ra tính ổn định tốt hơn đối với virus sống CMV ở tất cả các điều kiện bảo quản được kiểm tra (số liệu không được thể hiện).

Ví dụ 6: Tính ổn định CMV trong chất đậm HNS

Virus CMV thể dung hợp kép IE1/2-UL51 gốc được cung cấp trong chất đậm HNS và được bảo quản ở -70°C cho đến khi sử dụng. Nghiên cứu tính ổn định được thực hiện ở nồng độ 100 $\mu\text{g/mL}$ (theo hàm lượng protein tổng được đo bằng thử nghiệm Bradford). Khối virus được pha loãng bằng chất đậm HNS để thu được nồng độ virus cuối. Sau đó, các mẫu được bảo quản ở nhiệt độ thích hợp và được kiểm tra như được mô tả trong thời gian lên đến 3 tháng. Để đóng băng-tan băng, các mẫu được đóng băng ở -70°C trong ít nhất 1 giờ và được làm tan băng ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Các mẫu này được hút ở các thời điểm khác nhau và được giữ bảo quản đông lạnh ở -70°C cho đến khi được phân tích.

Hàm lượng protein tổng của các mẫu được đo bằng cách sử dụng thử nghiệm Bradford. Hàm lượng protein tổng của các mẫu không thay đổi trong khoảng thời gian 3 tháng (số liệu không được thể hiện).

Kích cỡ hạt của CMV trong các mẫu theo thời gian được giám sát bằng cách xác định đường kính thủy động lực học của mẫu sử dụng phương pháp DLS. Phương pháp này giám sát sự kết tụ hoặc phá vỡ bất kỳ của các hạt virus theo thời gian và ở các nhiệt độ bảo quản khác nhau. Không có xu hướng thực sự được quan sát với các thay đổi ngẫu nhiên về kích cỡ hạt của các mẫu nhất định (số liệu không được thể hiện). Các kết quả chỉ ra rằng các hạt virus là nguyên vẹn và không bị kết tụ ở nhiệt độ

tăng.

Ví dụ 7: Ảnh hưởng của các điều kiện bảo quản đến sự xâm nhập và tính sinh miễn dịch của virus

Các thay đổi đáng kể về các hiệu giá xâm nhập của virus (giá trị EC50) được quan sát bằng cách đưa các mẫu CMV qua các nhiệt độ bảo quản khác nhau (số liệu không được thể hiện). Bảo quản ở -20°C thu được hiệu giá xâm nhập của virus thấp hơn so với ở nhiệt độ từ 2 đến 8°C và 25°C. Hiệu giá của các mẫu 2-8°C được thấy là hiệu giá xâm nhập của virus thấp hơn so với bảo quản ở 25°C. Dựa trên giá trị EC50, nhiệt độ bảo quản được xếp bậc theo thứ tự sau (từ ổn định nhất đến ít ổn định nhất): 25°C > 2-8°C > -20°C lên đến thời điểm 1 tháng. Các hiệu giá xâm nhập của virus không phát hiện được ở thời điểm 3 tháng đối với các mẫu được bảo quản ở -20°C, 2-8°C và 25°C.

Nghiên cứu tính sinh miễn dịch ở chuột được bắt đầu ở cuối nghiên cứu tính ổn định để xác định ảnh hưởng của nhiệt độ bảo quản đến khả năng gây ra các kháng thể trung hòa CMV của CMV. Chuột nhất được gây miễn dịch bằng 2,5 µg/liều vaccin i.m. vào ngày 0 và được tăng cường vào ngày 21 sau đó lấy máu vào ngày 28. Huyết thanh chuột được kiểm tra các kháng thể trung hòa kháng lại CMV biểu hiện gH sử dụng tế bào ARPE 19 và các hiệu giá NT50 thu được bằng phép làm khớp đường cong phi tuyến tính.

Ảnh hưởng của việc bảo quản ở các nhiệt độ khác nhau trong 3 tháng đến tính sinh miễn dịch của CMV thể dung hợp kép IE1/2-UL51 được đánh giá. Các hiệu giá NT50 phụ thuộc vào nhiệt độ bảo quản, với nhiệt độ cao hơn dẫn đến các hiệu giá giảm so với đối chứng lạnh đông ở -70°C mặc dù không đáng kể ($p=0,2584$, ANOVA một chiều) (FIG.16A). Hiệu giá NT50 với các chế phẩm được bảo quản ở -20°C là thấp hơn 2 lần, nhưng các hiệu giá thử nghiệm xâm nhập của virus cho các mẫu này có ảnh hưởng đáng kể so với đối chứng lạnh đông ở -70°C. Xu hướng của các hiệu giá NT50 đối với các mẫu tính ổn định -20°C, 2-8°C và 25°C theo các chuẩn độ ELISA khối lượng CMV thu được cho các mẫu này.

Ảnh hưởng của việc bảo quản ở các nhiệt độ khác nhau trong 8 giờ sau khi tan băng đến tính sinh miễn dịch CMV dung hợp kép IE1/2-UL51 được đánh giá. Các

hiệu giá NT50 của chế phẩm được so sánh với đối chứng lạnh đông ở -70°C . Các hiệu giá NT50 không bị ảnh hưởng ($p=0,5865$, ANOVA một yếu tố) bằng cách bảo quản các mẫu trong 8 giờ ở nhiệt độ được kiểm tra bất kỳ (FIG.16B).

Ảnh hưởng của việc bảo quản CMV thể dung hợp kép IE1/2-UL51 ở 25°C ở các thời điểm khác nhau sau khi làm tan băng các mẫu được đánh giá trong nghiên cứu tính sinh miễn dịch của chuột nhắt. Các hiệu giá NT50 của các chế phẩm này được so sánh với đối chứng lạnh đông ở -70°C . Các hiệu giá NT50 không bị ảnh hưởng ($p=0,1848$, kiểm định t hai phía không ghép cặp) bằng cách bảo quản các mẫu ở 25°C trong thời gian lên đến một tuần. Tại thời điểm 3 tháng, các hiệu giá NT50 giảm hơn 2 lần một chút chỉ ra các vấn đề tính ổn định có thể có của chế phẩm ở 25°C trong thời gian dài hơn (số liệu không được thể hiện).

Ảnh hưởng của 3 chu trình đóng băng-tan băng đến CMV thể dung hợp kép IE1/2-UL51 được tạo chế phẩm trong chất đệm HNS được đánh giá bằng tính sinh miễn dịch của chuột. 3 chu trình đóng băng-tan băng (F/T) của chế phẩm CMV thể dung hợp kép không ảnh hưởng đến tính sinh miễn dịch ($p=0,2103$, kiểm định t hai phía không ghép cặp) so với đối chứng lạnh đông ở -70°C (số liệu không được thể hiện).

Các phương án khác nằm trong các yêu cầu bảo hộ dưới đây. Mặc dù một số phương án đã được chỉ ra và được mô tả, các cải biến khác có thể được thực hiện mà không nằm ngoài tinh thần và phạm vi của sáng chế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm gây miễn dịch chứa lượng hữu hiệu về mặt miễn dịch của cytomegalovirut (CMV) có khiếm khuyết trong sao chép có điều kiện và chất mang được dụng, trong đó CMV có khiếm khuyết trong sao chép có điều kiện chứa:

(a) phức gH pentame gồm UL128, UL130, UL131, gH và gL; và

(b) axit nucleic mã hóa protein dung hợp thứ nhất giữa IE1/2 và protein khử ổn định và protein dung hợp thứ hai giữa UL51 và protein khử ổn định, trong đó protein khử ổn định là dẫn xuất protein liên kết FK506 (FKBP) chứa các phần thể axit amin F36V và L106P; trong đó IE1/2 và UL51 kiểu đại không còn có mặt và trong đó CMV là chủng được giảm độc lực đã khôi phục sự biểu hiện phức gH do việc sửa chữa đột biến trong gen UL131.

2. Chế phẩm gây miễn dịch theo điểm 1, trong đó:

(a) protein dung hợp thứ nhất là SEQ ID NO:1 hoặc trình tự axit amin giống ít nhất 95% với SEQ ID NO:1; và

(b) protein dung hợp thứ hai là SEQ ID NO:3 hoặc trình tự axit amin giống ít nhất 95% với SEQ ID NO:3.

3. Chế phẩm gây miễn dịch theo điểm 2, trong đó:

(a) protein dung hợp thứ nhất được mã hóa bởi SEQ ID NO:2 hoặc trình tự axit nucleic giống ít nhất 95% với SEQ ID NO:2; và

(b) protein dung hợp thứ hai được mã hóa bởi SEQ ID NO:4 hoặc trình tự axit nucleic giống ít nhất 95% với SEQ ID NO:4.

4. Chế phẩm gây miễn dịch theo điểm 3, trong đó protein dung hợp thứ nhất được mã hóa bởi SEQ ID NO:2 và protein dung hợp thứ hai được mã hóa bởi SEQ ID NO:4.

5. Chế phẩm gây miễn dịch theo điểm 1, trong đó chế phẩm này còn chứa tá dược.

6. Chế phẩm gây miễn dịch theo điểm 1, trong đó CMV là AD169 đã khôi phục sự biểu hiện phức gH do việc sửa chữa đột biến trong gen UL131.

7. Chế phẩm gây miễn dịch theo điểm 6, trong đó chế phẩm này còn chứa tá dược.

8. Chế phẩm gây miễn dịch chứa lượng hữu hiệu về mặt miễn dịch của cytomegalovirut (CMV) có khiếm khuyết trong sao chép có điều kiện và chất mang được dụng, trong đó CMV có khiếm khuyết trong sao chép có điều kiện chứa:

(a) phức gH pentame gồm UL128, UL130, UL131, gH và gL; và

(b) axit nucleic mã hóa protein dung hợp thứ nhất giữa protein thiết yếu và protein khử ổn định và protein dung hợp thứ hai giữa protein thiết yếu và protein khử ổn định, trong đó protein dung hợp thứ nhất chứa SEQ ID NO:1 và protein dung hợp thứ hai chứa SEQ ID NO:3, trong đó IE1/2 và UL51 kiểu đại không còn có mặt; và trong đó CMV là chủng được giảm độc lực đã khôi phục sự biểu hiện phức gH do việc sửa chữa đột biến trong gen UL131.

9. Chế phẩm gây miễn dịch theo điểm 8, trong đó chế phẩm này còn chứa tá dược.

10. Chế phẩm gây miễn dịch theo điểm 8, trong đó CMV là AD169 đã khôi phục sự biểu hiện phức gH do việc sửa chữa đột biến trong gen UL131.

11. Chế phẩm gây miễn dịch theo điểm 10, trong đó chế phẩm này còn chứa tá dược.

12. Chế phẩm gây miễn dịch theo điểm 8, trong đó CMV có khiếm khuyết trong sao chép có điều kiện có bộ gen như được thể hiện trong SEQ ID NO:14.

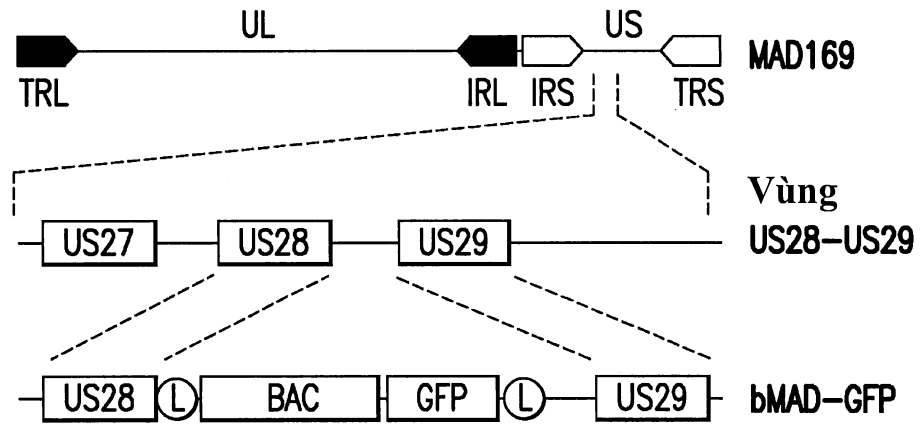


FIG. 1A

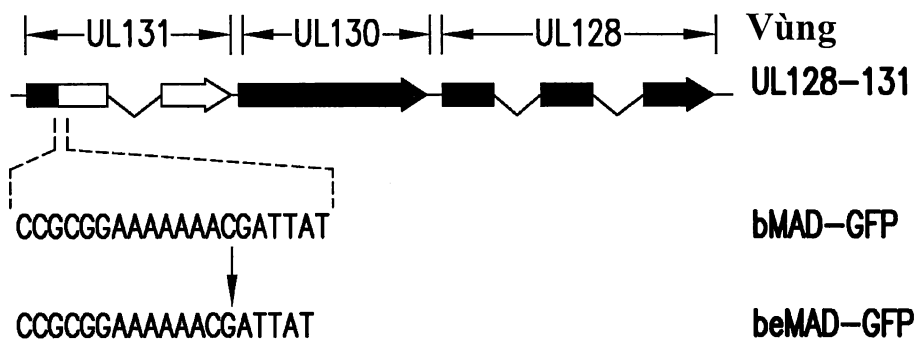


FIG. 1B

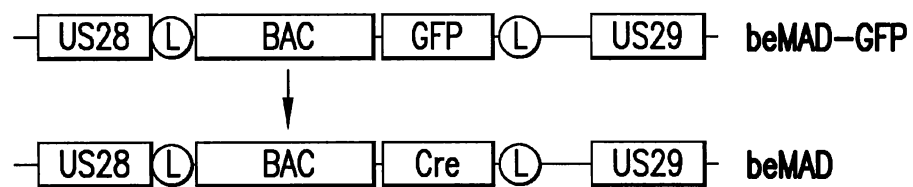


FIG. 1C

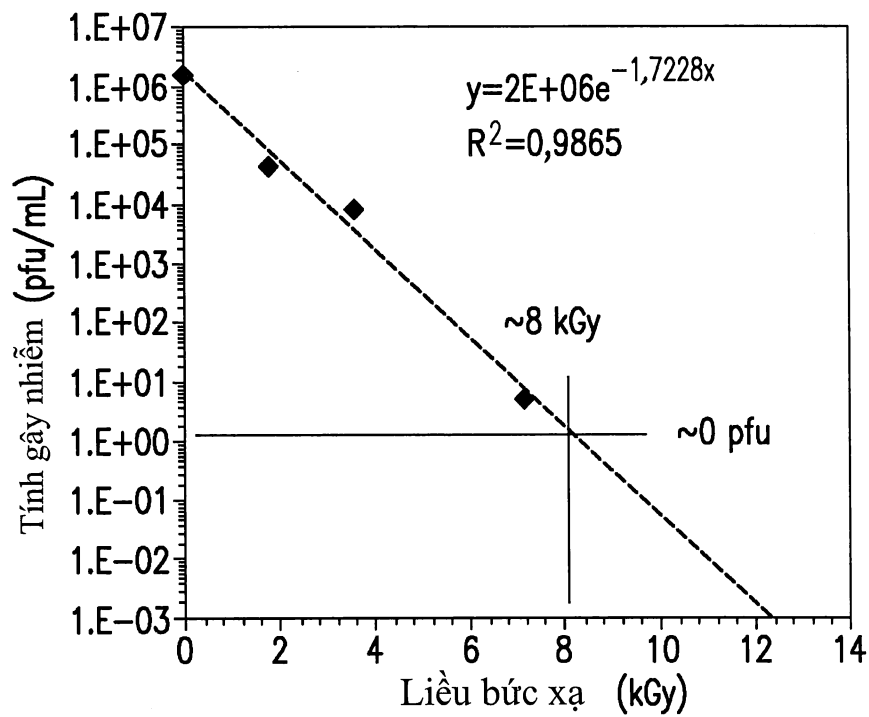


FIG.2A

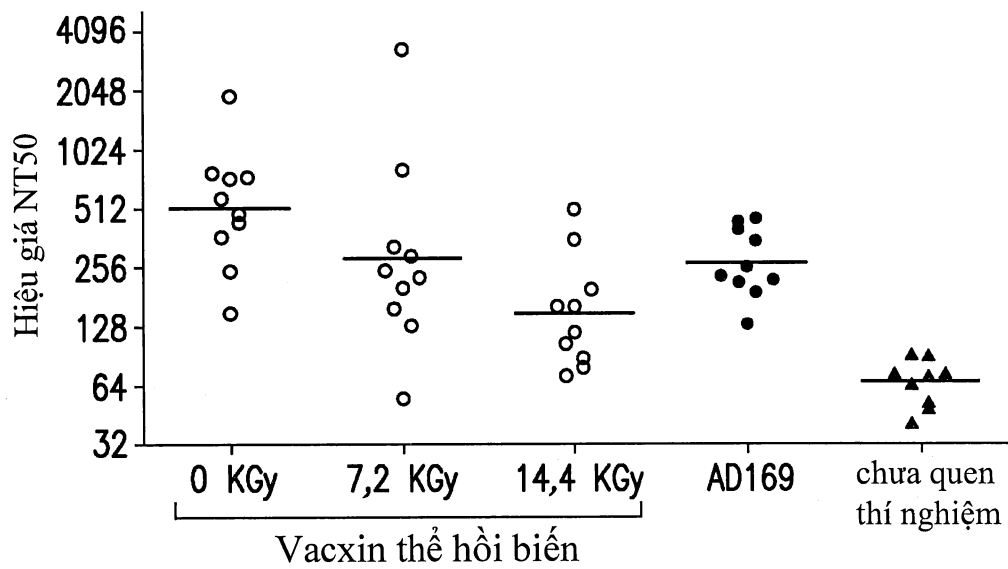


FIG.2B

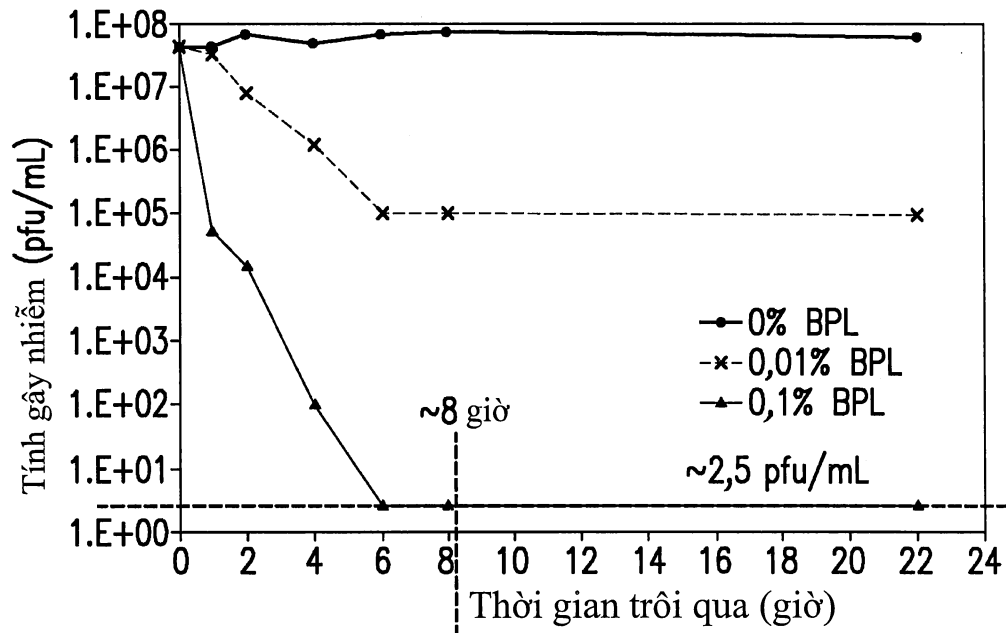


FIG. 2C

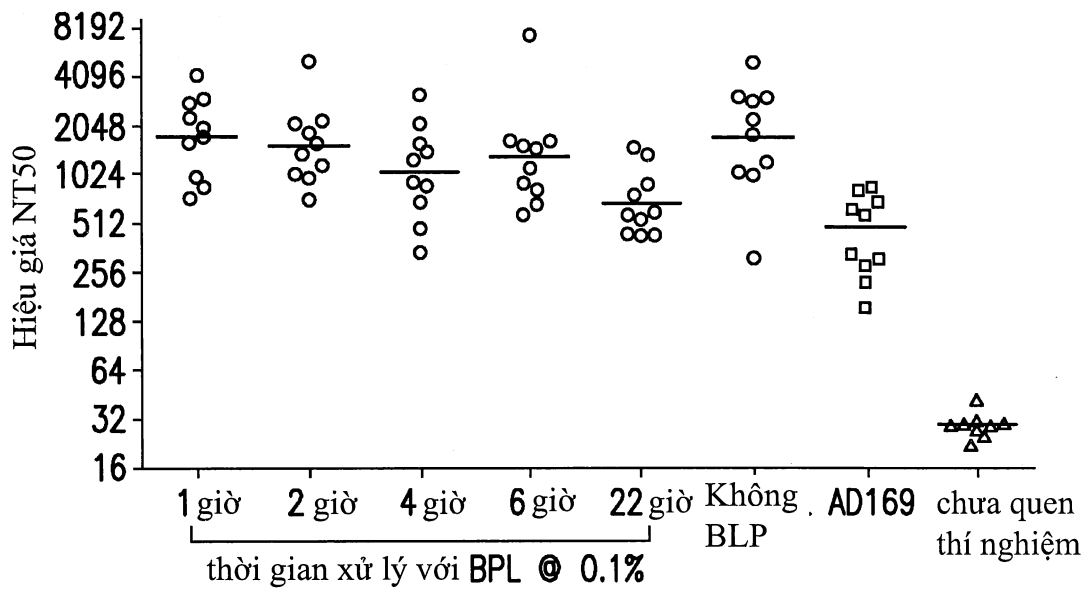


FIG. 2D

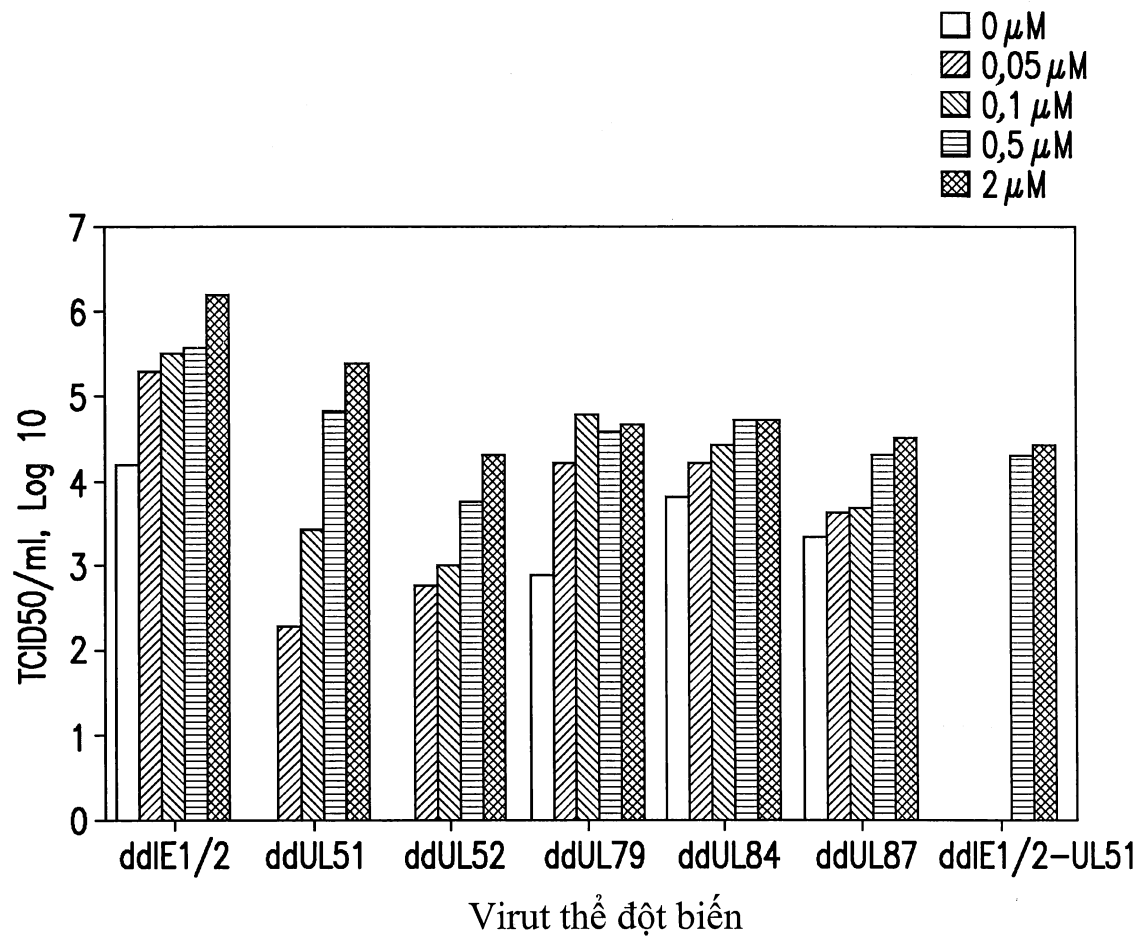


FIG.3

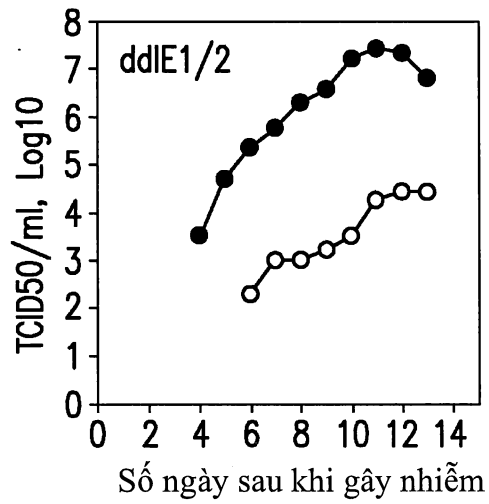


FIG. 4A

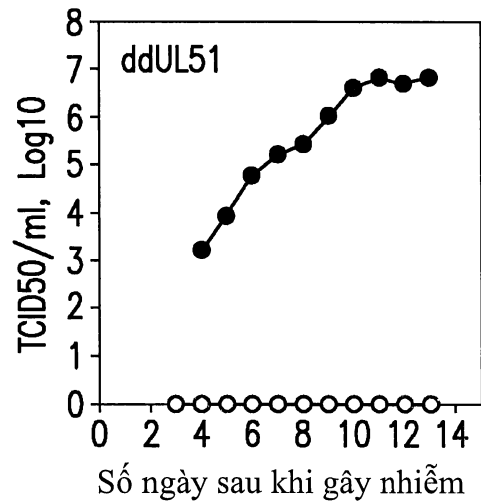


FIG. 4B

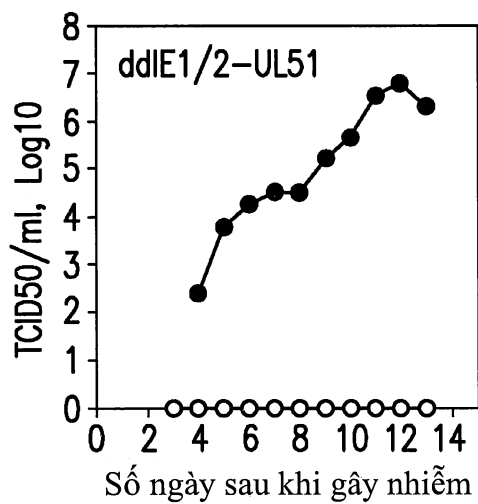


FIG. 4C

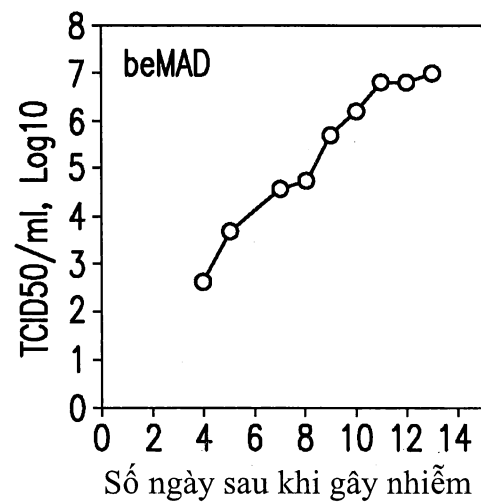


FIG. 4D

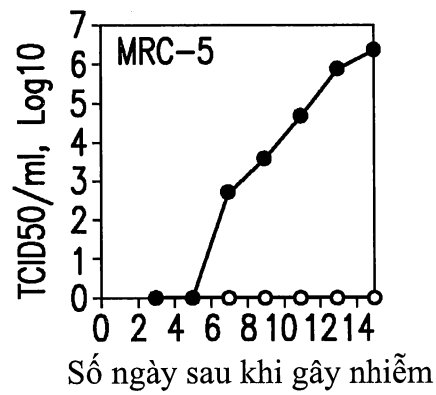


FIG. 5A

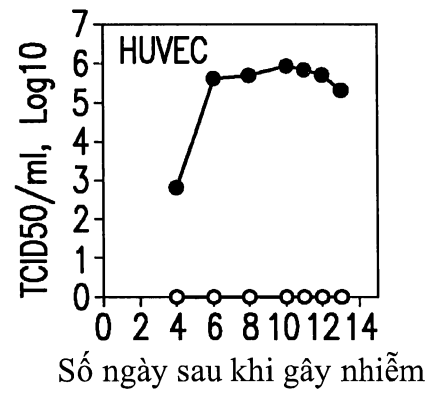


FIG. 5B

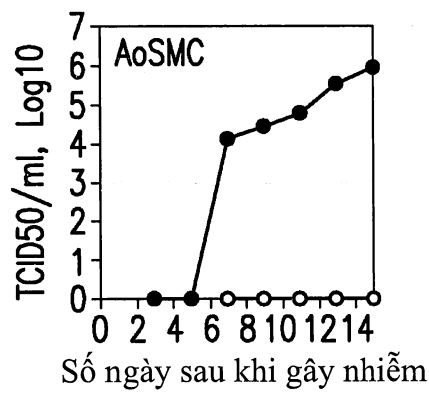


FIG. 5C

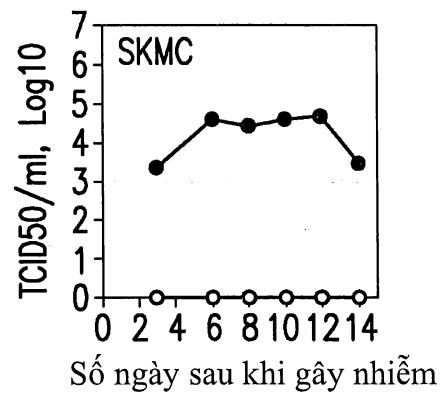


FIG. 5D

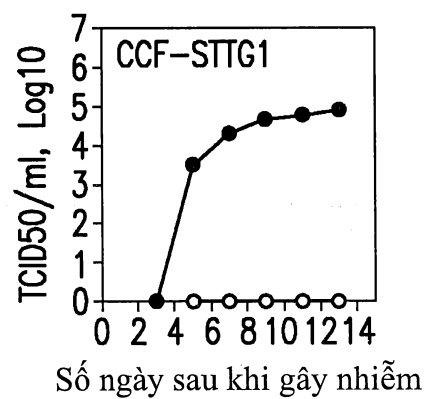


FIG. 5E

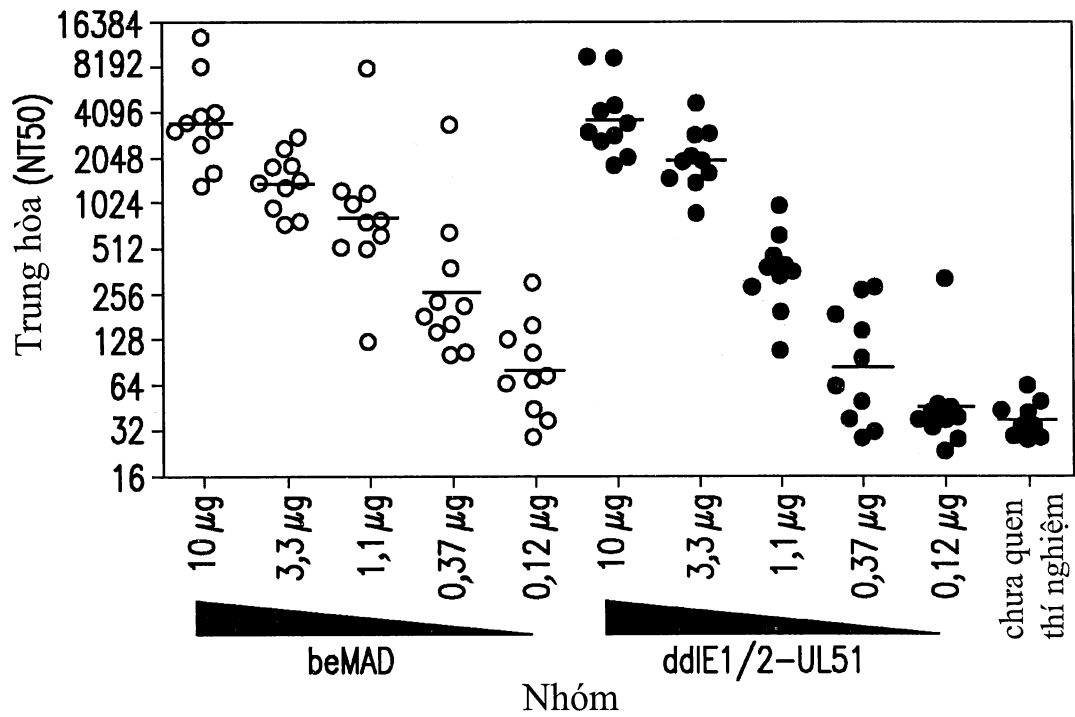


FIG.6A

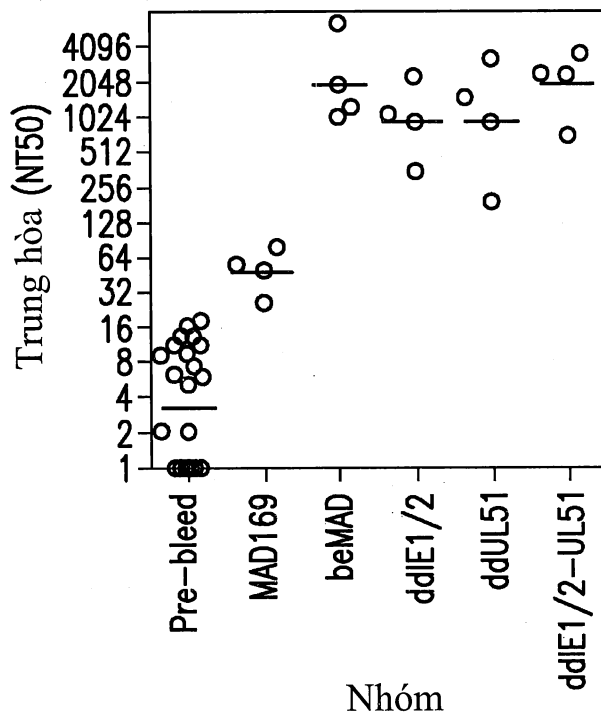


FIG.6B

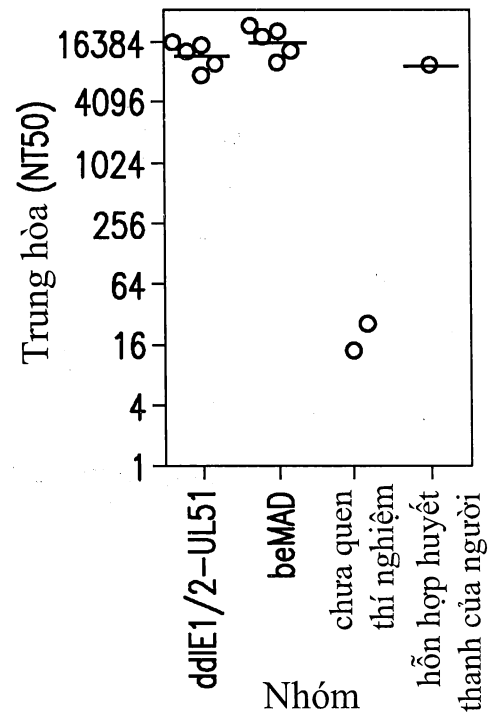


FIG.6C

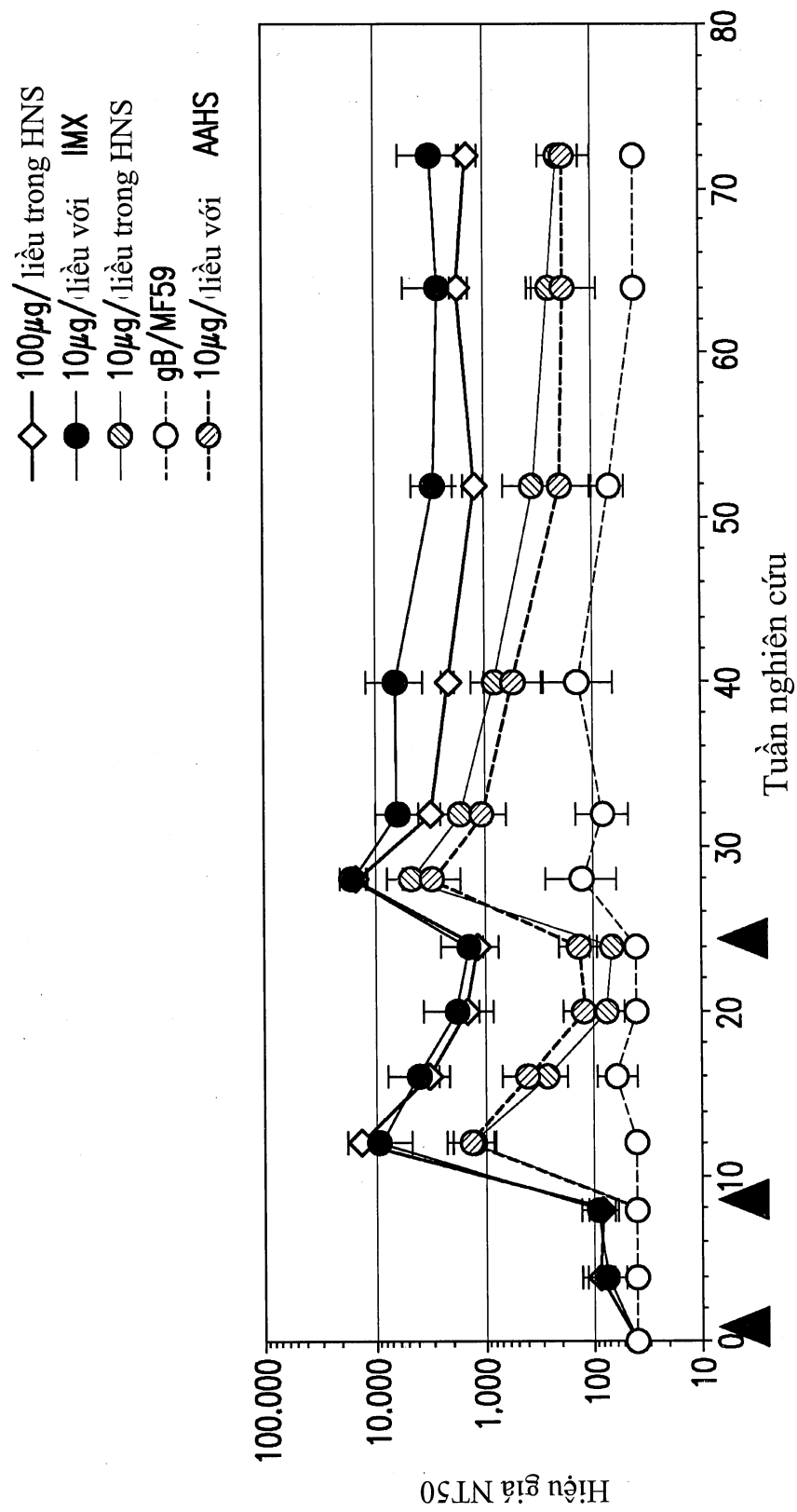


FIG.7

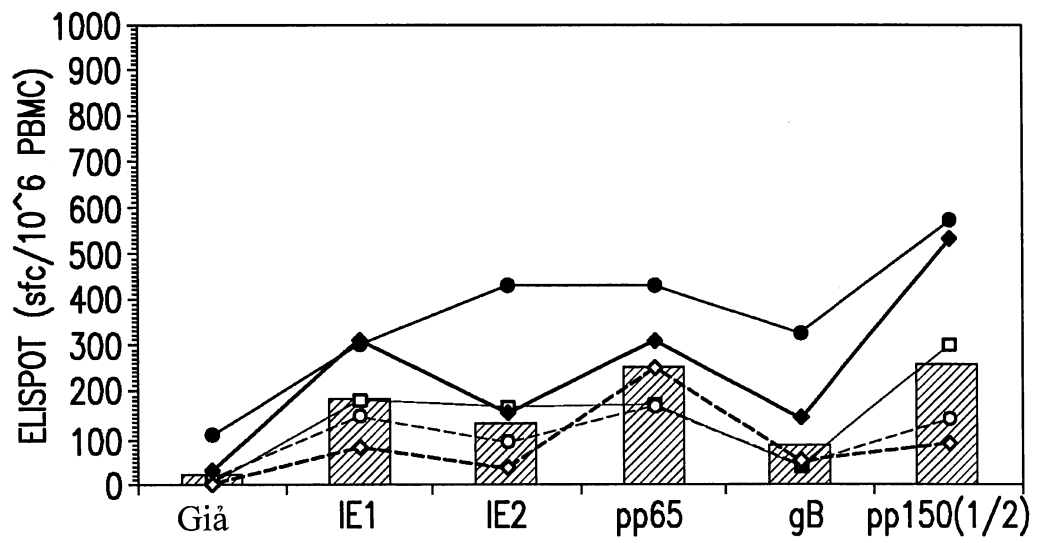


FIG.8A

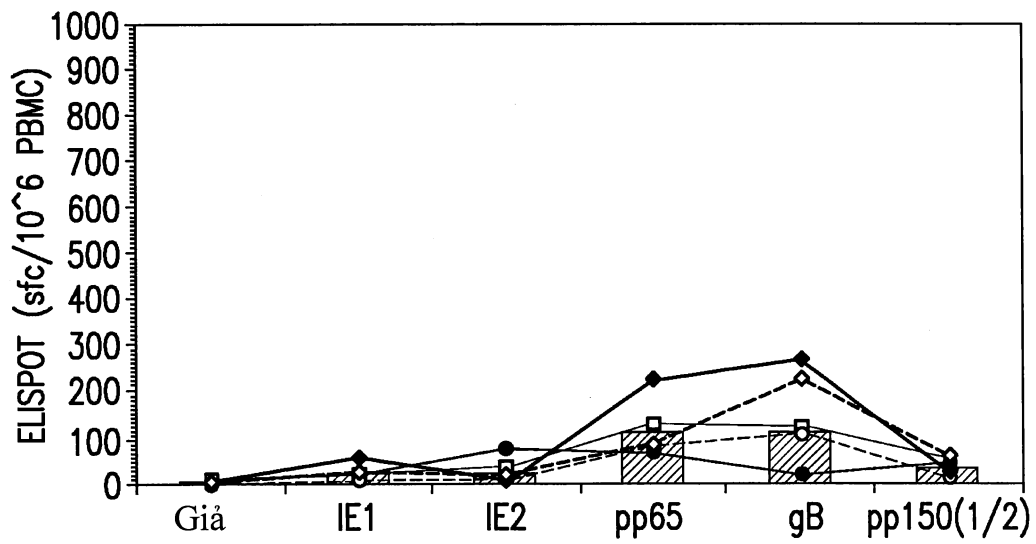


FIG.8B

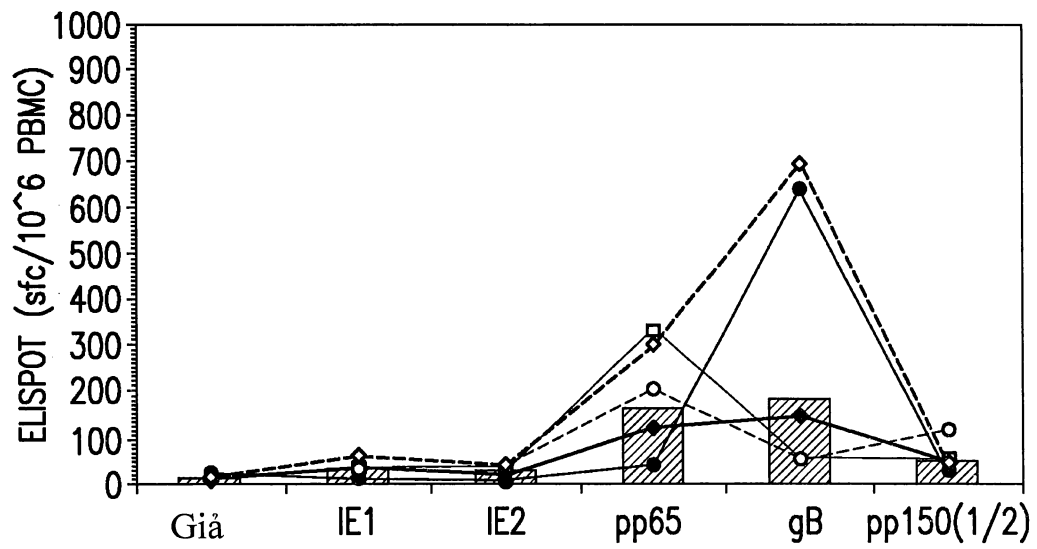


FIG.8C

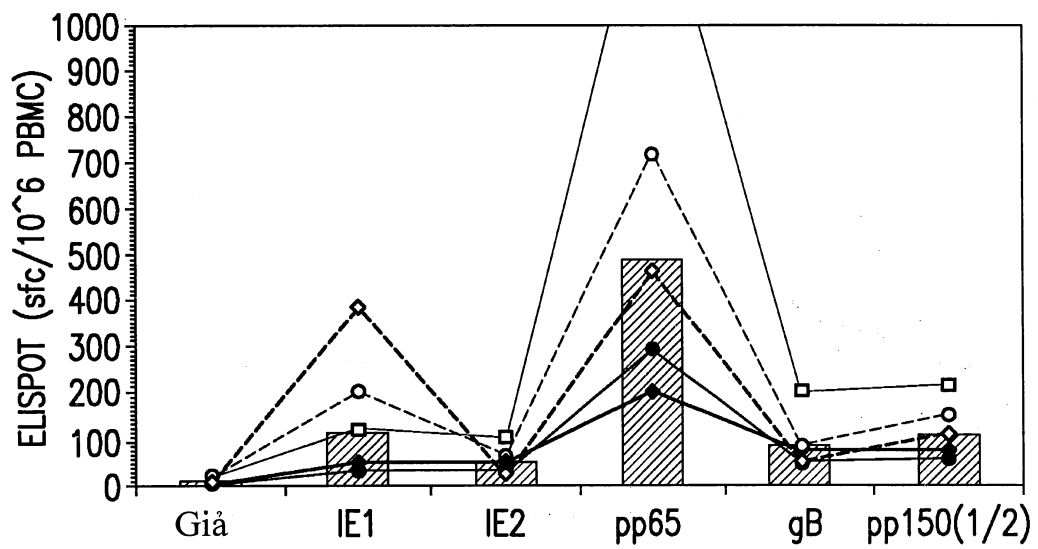


FIG.8D

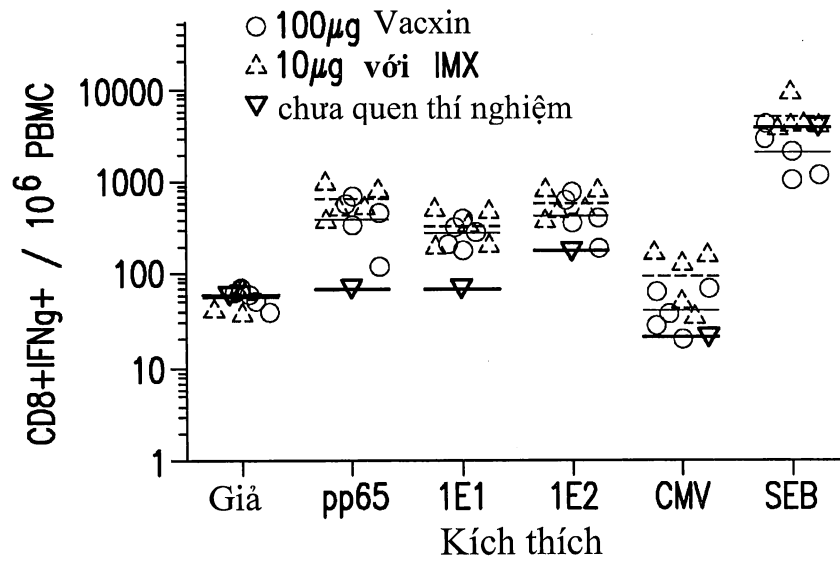


FIG.9A

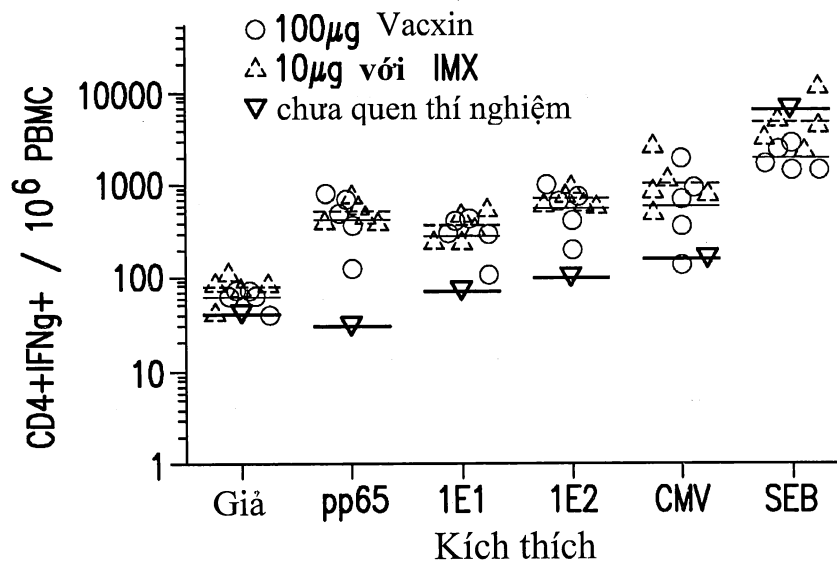


FIG.9B

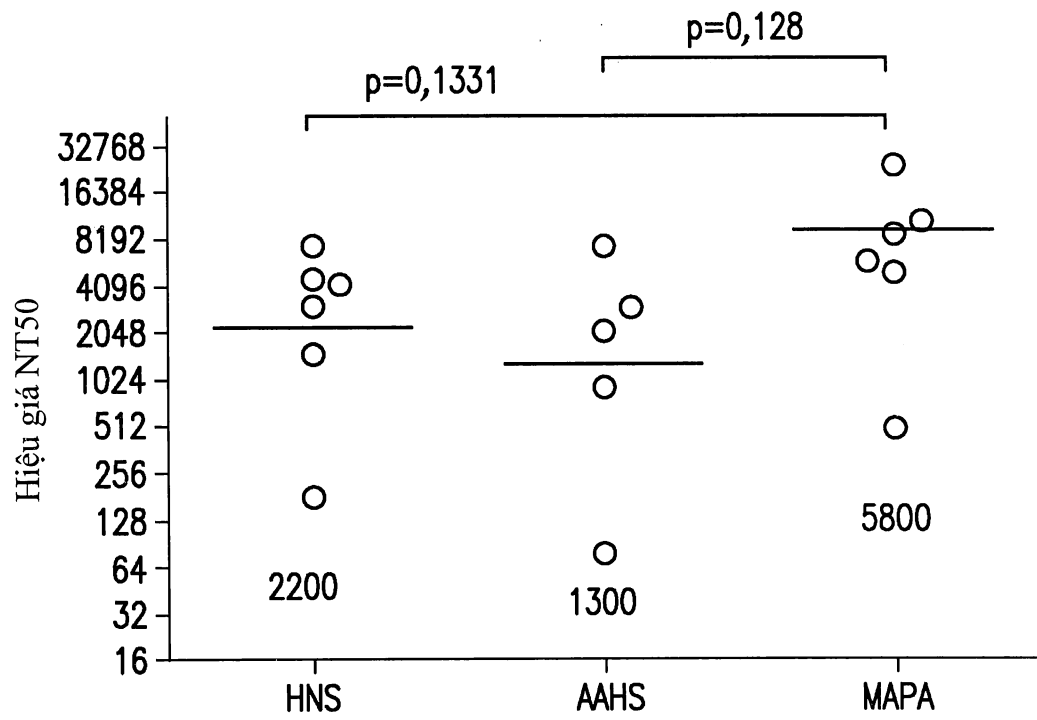


FIG.10

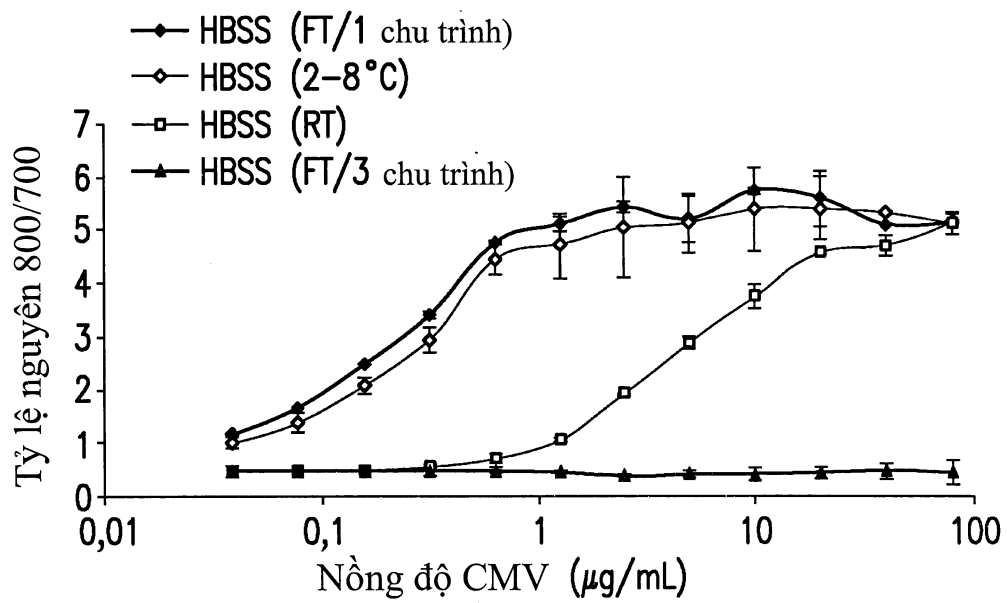


FIG.11A

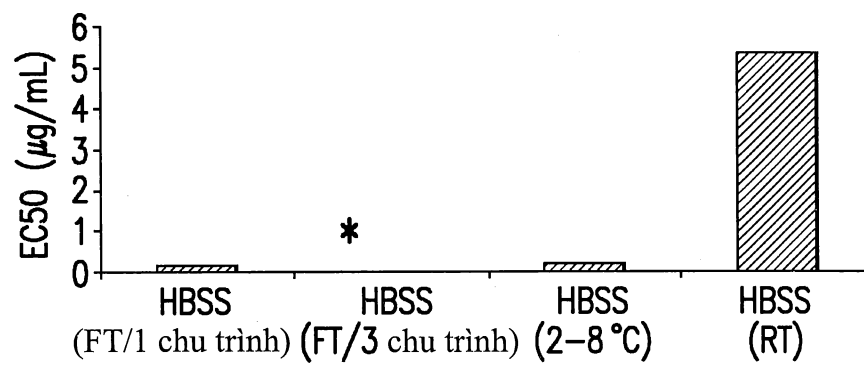


FIG.11B

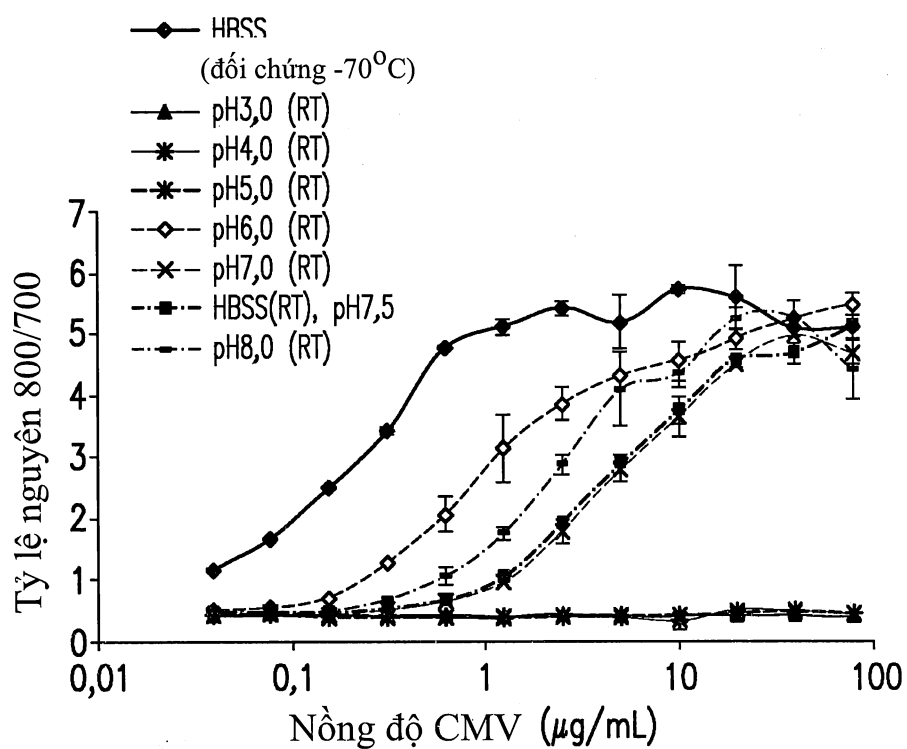


FIG.12A

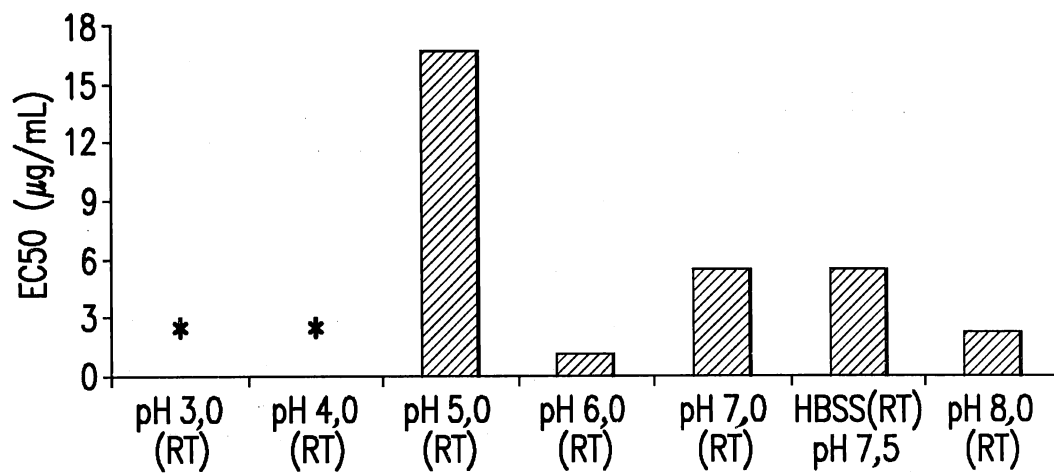


FIG.12B

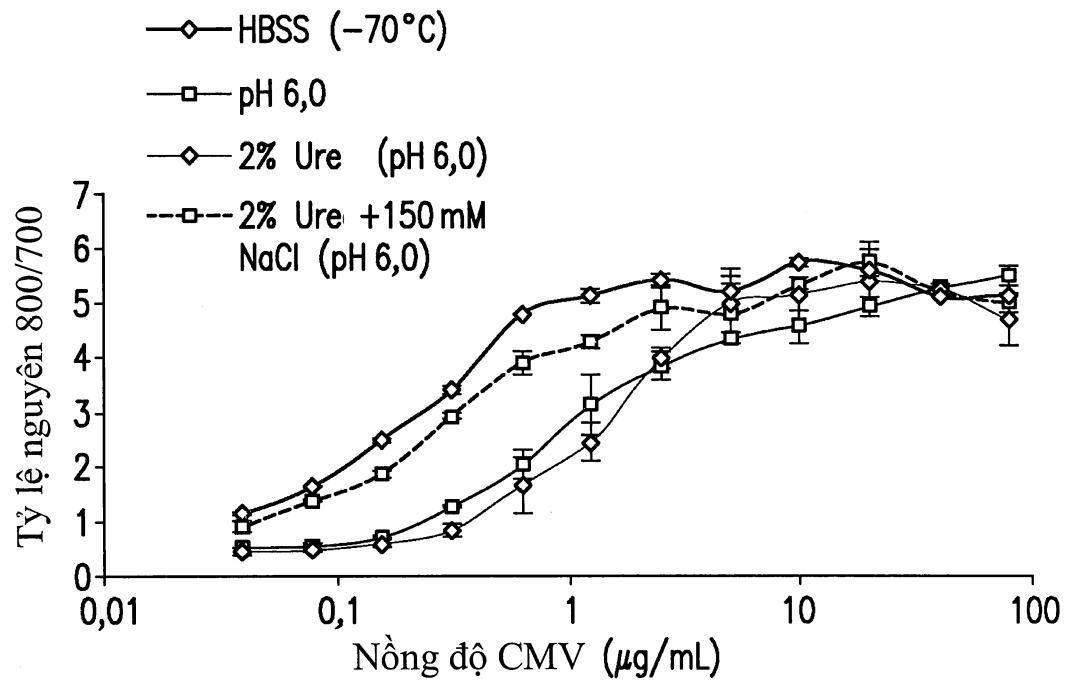


FIG.13A

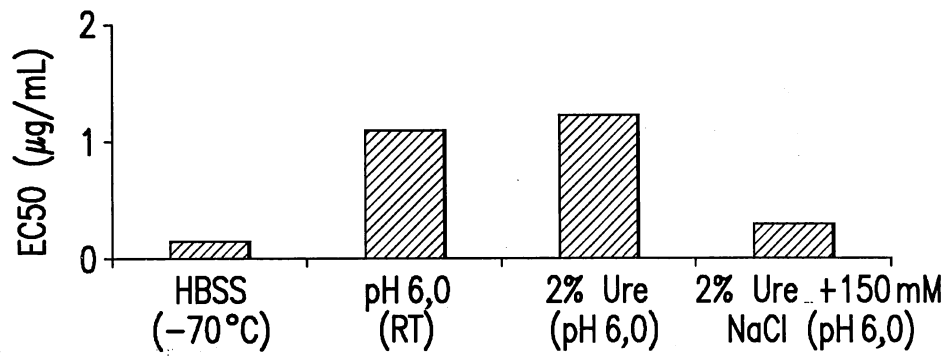


FIG.13B

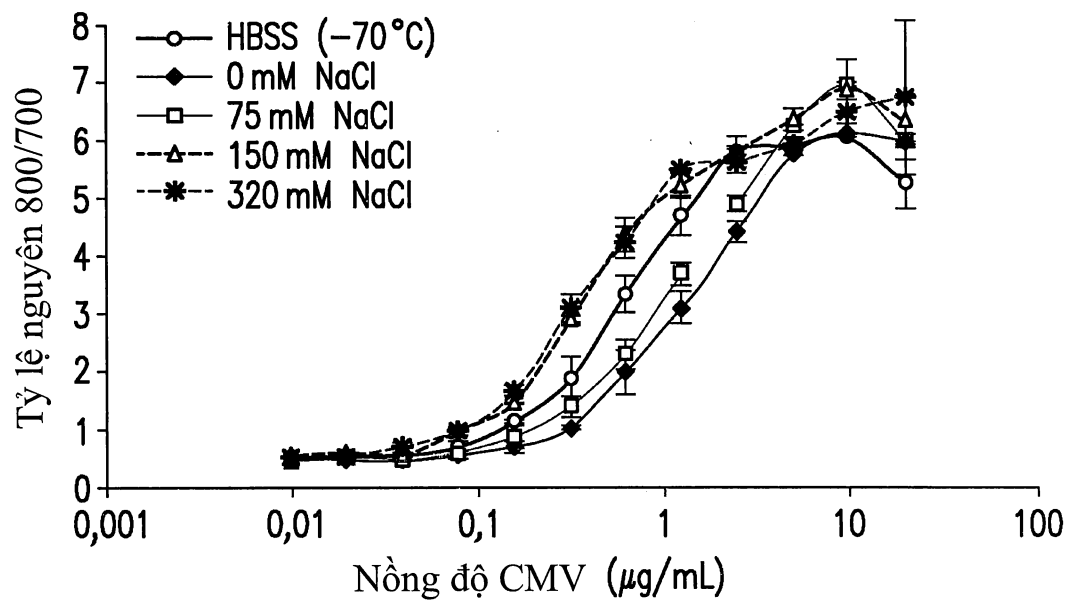


FIG.14A

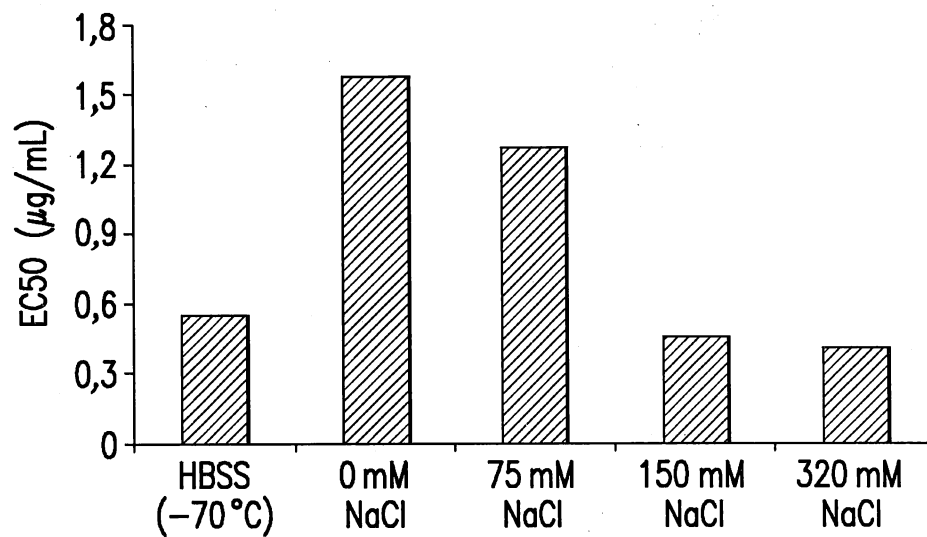


FIG.14B

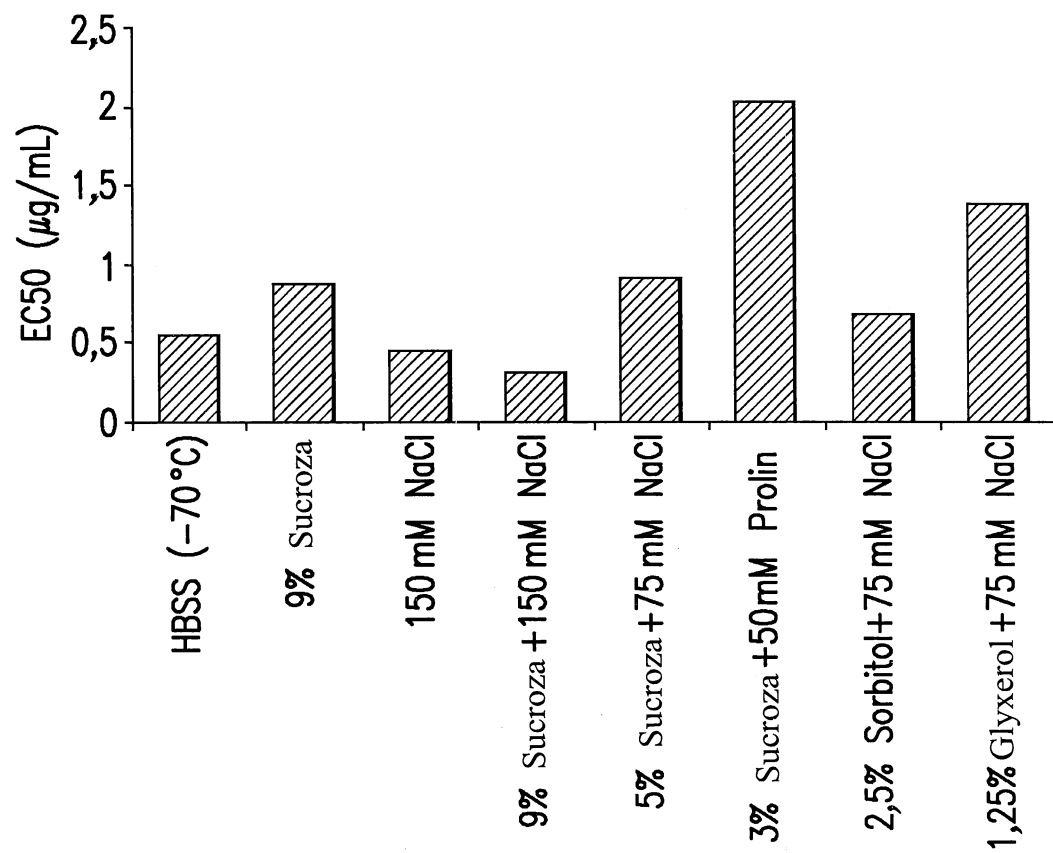


FIG. 15

