



(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)



1-0024870

(51)⁷ C12N 15/33; C12N 15/63; A61P 37/00; (13) B
C12N 15/10

(21) 1-2010-02215

(22) 23/01/2009

(86) PCT/US2009/000458 23/01/2009

(87) WO2009/131604 29/10/2009

(30) 61/062,229 24/01/2008 US

(45) 25/08/2020 389

(43) 27/12/2010 273A

(73) THE BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM (US)
201 West Seventh Street Austin, TX 78701, U.S.A

(72) WEAVER, Scott, C. (US); FROLOV, Ilya, V. (US); FROLOVA, Elena (US).

(74) Công ty TNHH Trường Xuân (AGELESS CO.,LTD.)

(54) ALPHAVIRUT TÁI TỔ HỢP CÓ ĐỘC LỰC GIẢM, PHƯƠNG PHÁP TẠO RA
ALPHAVIRUT VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA ALPHAVIRUT NÀY

(57) Sáng chế đề cập tới alphavirus tái tổ hợp có độc lực giảm không có khả năng sao chép trong tế bào của muỗi và truyền nhiễm bằng vật chủ trung gian là muỗi. Các alphavirus có độc lực giảm này có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, virus viêm não ngựa Venezuela (VEEV), virus viêm não ngựa miền Đông (EEEV), virus viêm não ngựa miền Tây (WEEV) hoặc virus Chikungunya (CHIK). Sáng chế cũng bộc lộ phương pháp tạo ra alphavirus và phương pháp sử dụng virus này làm dược phẩm.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực sinh học phân tử, virus học và miễn dịch học của alphavirus. Sáng chế đề cập đến các alphavirus tái tổ hợp có độc lực giảm, vector bao gồm trình tự nucleotit mã hóa alphavirus tái tổ hợp có độc lực giảm, tế bào chủ chứa và biểu hiện vector, dược phẩm chứa alphavirus tái tổ hợp có độc lực giảm, dược phẩm để dùng trong phương pháp bảo vệ đối tượng khỏi nhiễm bệnh do phơi nhiễm với alphavirus, việc sử dụng dược phẩm này và phương pháp tạo alphavirus tái tổ hợp có độc lực giảm.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Chi *Alphavirus* thuộc họ *Togaviridae* chứa một số tác nhân gây bệnh đáng kể ở con người và động vật. Các loại virus này phân bố rộng khắp ở tất cả các lục địa ngoại trừ vùng Nam cực và đang là mối đe dọa đáng kể cho sức khỏe cộng đồng (18, 39). Ở điều kiện tự nhiên, hầu hết các alphavirus bị lây truyền bởi muỗi, trong đó chúng gây ra sự nhiễm bệnh dai dẳng, kéo dài suốt đời, mà ít ảnh hưởng tới các chức năng sinh học của vật chủ trung gian. Ở động vật có xương sống bị nhiễm bệnh do muỗi đốt, alphavirus gây ra nhiễm cấp tính, được đặc trưng bởi virus-huyết có hiệu giá cao là điều kiện quyết định của sự lây nhiễm đối với loại muỗi mới và sự lan truyền của nó trong tự nhiên.

Virus viêm não ngựa Venezuela (Venezuelan equine encephalitis virus-VEEV) là một trong các tác nhân gây bệnh chính của chi alphavirus. Nó liên tục lây lan sang Bắc, Trung, Nam Mỹ và là nguyên nhân gây ra các dịch bệnh và bệnh dịch động vật rải rác liên quan tới con người, ngựa và các vật nuôi khác. Trong những đại dịch lớn bùng phát gần đây ở Venezuela và Colombia (năm 1995) liên quan tới phân loại IC của VEEV, xuất hiện khoảng 100.000 trường hợp lây nhiễm cho con người, ước tính có hơn 300 trường hợp viêm não gây tử vong (37). Trong dịch bệnh động vật VEEV, tỷ lệ tử vong ở ngựa do viêm não lên tới 83%, và trong khi tỷ lệ tử vong chung là thấp ở người (dưới 1%), có tới 14% người bị lây nhiễm virus mắc phải bệnh liên quan tới thần kinh bao gồm bệnh mất định hướng, mất điều hòa, trầm cảm, chứng co giật, đặc biệt là trẻ em (21). Bệnh ở người do VEEV gây ra có triệu chứng như sốt kèm theo cảm giác

ớn lạnh, đau đầu dữ dội, đau cơ, buồn ngủ, viêm họng. Người già và trẻ em phát bệnh nhiễm trùng võng mạc với sự suy giảm bạch huyết nghiêm trọng, sau đó bị viêm não. Kết quả của sự nhiễm trùng hệ thần kinh trung ương (CNS - central nervous system) là viêm màng não cấp tính làm cho các tế bào thần kinh bị chết. Triệu chứng thần kinh xuất hiện trong vòng 4-10 ngày kể từ khi khởi phát bệnh bao gồm như co giật, chứng liệt nhẹ, thay đổi hành vi, và hôn mê.

Mặc dù, đại dịch do VEEV liên tục đe dọa, nhưng vẫn chưa có một loại vaccin nào an toàn và hữu hiệu được tạo ra chống lại virus này. Chủng TC-83 có độc lực giảm của VEEV đã được phát triển hơn bốn thập kỷ trước đây bằng hàng loạt thể hệ chủng virus gây bệnh cho lừa Trinidad có độc lực cao (Trinidad donkey - TRD) thuộc nhóm VEEV trong các tế bào tim chuột lang (4). Hiện nay, TC-83 là vaccin duy nhất hiện có được sử dụng cho nhân viên phòng thí nghiệm và quân nhân. Trên 8000 người đã được tiêm vaccin (2, 8, 34) và dữ liệu tích lũy thể hiện rõ ràng rằng gần 40% của tất cả các loại vaccin phát bệnh với các triệu chứng đặc trưng của VEE tự nhiên như sốt, đau mang tính hệ thống và tác dụng phụ khác (2). Chủng TC-83 này làm chết phổ biến chuột sơ sinh, nhưng không làm chết chuột trưởng thành sau khi được tiêm nhiễm vào trong não (intracerebral-i.c.) và dưới da (subcutaneous-s.c.) (31), và do đó, chủng này là nguyên liệu khởi đầu tốt cho quá trình làm suy yếu và nghiên cứu ảnh hưởng của các đột biến trên tác nhân gây bệnh do virus.

Hệ gen của VEEV dài khoảng 12 kb, phân tử ARN sợi đơn dương tính tương tự cấu trúc mARN tế bào. ARN hệ gen chứa cả mũ methylguanylat 5' và đuôi polyadenylat 3' (24), các đặc tính này cho phép dịch mã các protein virus nhờ bộ máy tế bào chủ ngay sau khi giải phóng các ARN hệ gen từ nucleocapsit. 2/3 hệ gen đầu 5' được dịch mã thành các protein phi cấu trúc (nonstructural Protein - nsP) bao gồm các thành phần virus của phức hợp enzym sao chép cần thiết cho sự sao chép của hệ gen virus và sự phiên mã của ARN hệ gen phụ. ARN hệ gen phụ tương ứng với 1/3 hệ gen đầu 3'. Nó được tổng hợp từ vùng khởi động hệ gen phụ và được dịch mã thành protein cấu trúc của virus. Kiểu hình có độc lực giảm của chủng TC-83 thuộc VEEV là kết quả của hai đột biến trong hệ gen của chủng TRD: đột biến thứ nhất là thay thế axit amin ở vị trí 120 trong glycoprotein E2, và đột biến thứ hai là thay đổi nucleotit thứ 3 trong 5' UTR (11, 23, 24, 43). Vì vậy, do tỷ lệ đột biến cao của alphavirus nên sự hồi biến của chủng TC-83 thành kiểu hình sinh bệnh vẫn còn là một mối quan tâm lớn trong điều

kiện chọn lựa thích hợp chẳng hạn như chuyển tiếp virus trong cơ thể sống. Hơn nữa, chủng TC-83 của VEEV có khả năng sao chép trong tế bào của muỗi, và lây nhiễm vào muỗi sau khi tiêm (32); do đó, lây truyền từ muỗi là có thể.

Thực tế, các chủng vacxin arbovirus sống không thể truyền được thông qua vật chủ trung gian là động vật chân đốt do sự lan truyền giữa các vật chủ chứa có thể dẫn đến các sự thay đổi không lường được mà điều này có thể bao gồm tăng độc lực. Điều này đặc biệt đúng đối với các chủng có độc lực giảm, được tạo ra từ các virus kiểu đại dựa vào số ít các đột biến có độc lực giảm, có thể hồi biến được, hoặc đối với các chủng biến đổi gen có thể phát triển theo cách không dự đoán được nếu chúng trải qua sự lan truyền qua vật chủ trung gian. Các hiểm họa được đặc biệt chú ý khi phát hiện ra chủng vacxin TC-83 của VEEV ở muỗi được thu thập ở Louisiana trong năm 1971 (32), khu vực cách ly vùng dịch được giới hạn tới Texas.

Sự phát triển của cADN lây nhiễm cho alphavirus đã mở ra cơ hội để tìm ra thể có độc lực giảm của virus bằng cách biến đổi hệ gen virus, phương pháp giảm thiểu hoặc loại bỏ sự hồi biến của kiểu hình sinh bệnh, và kiểu đại. Hơn nữa, hệ gen của alphavirus như vậy có thể được thiết kế để chứa thành phần ARN có chức năng chỉ trong tế bào có nguồn gốc động vật có xương sống, mà không phải là côn trùng. Do vậy, đột biến toàn phần như thế có thể ngăn chặn sự lây truyền virus biến đổi gen bằng vật chủ trung gian là muỗi.

Mặc dù tầm quan trọng của nó như là yếu tố gây bệnh ở người và động vật mới phát sinh, tiềm năng của nó như làm vũ khí sinh học và mối quan tâm về ứng dụng của alphavirus có độc lực giảm, kỹ thuật trước thiếu phương pháp tạo ra chủng alphavirus có độc lực giảm mà có khả năng sao chép chỉ ở tế bào động vật có xương sống. Sáng chế này đáp ứng được nhu cầu và mong muốn lâu dài trong lĩnh vực này.

Đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2007/016682 đề cập đến axit nucleic tái tổ hợp chứa trình tự axit nucleic thứ nhất mã hóa trình tự 5' nhận biết sự sao chép của alphavirus, ít nhất một trình tự axit nucleic thứ hai mã hóa protein phi cấu trúc của alphavirus, ít nhất một vùng khởi động hệ gen phụ của alphavirus, ít nhất một yếu tố vị trí tiếp nhận ribosom nội tại (internal ribosomal entry site – IRES), ít nhất một axit nucleic khác loại, và axit nucleic thứ ba mã hóa trình tự 3' nhận biết sự sao chép của alphavirus.

Đơn đăng ký patent Canada 2 327 189 đề cập đến sự phát triển của vectơ biểu hiện ở động vật có vú, trong đó sự biểu hiện gen cấu trúc của virus gây bệnh viêm não ở ngựa miền Tây đặt dưới sự kiểm soát của vùng khởi động ở tế bào nhân chuẩn.

Moriette C và cộng sự (Moriette, C. et al., J. Virol. Vol. 80, no. 8, 4089-4098) báo cáo về sự hồi phục của alphavirus salmonit tái tổ hợp mà được có độc lực giảm hoàn toàn và bảo vệ cho cá hồi cầu vồng.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các vấn đề của sáng chế được giải quyết bằng đối tượng của các điểm yêu cầu bảo hộ độc lập đi kèm. Các phương án được ưu tiên có thể được tạo ra từ các điểm yêu cầu bảo hộ độc lập đi kèm.

Cụ thể hơn, vấn đề của sáng chế được giải quyết theo khía cạnh thứ nhất là nhờ alphavirus tái tổ hợp có độc lực giảm bao gồm: axit nucleic alphavirus, có (i) phần chèn vào của vị trí tiếp nhận ribosom nội tại của virus encephalomyocarditis (encephalomyocarditis virus internal ribosomal entry site-EMCV IRES) có chức năng chỉ ở tế bào có nguồn gốc động vật có xương sống, mà không có chức năng ở tế bào có nguồn gốc côn trùng, giữa đầu cuối của trình tự mã hóa protein phi cấu trúc 4 (nonstructural protein 4-nsP4) và AUG mở đầu của trình tự mã hóa ARN hệ gen phụ của alphavirus, và (ii) vùng khởi động hệ gen phụ bị bất hoạt, trong đó alphavirus không có khả năng sao chép ở muỗi và tế bào muỗi.

Theo phương án của khía cạnh thứ nhất, 5' UTR của ARN hệ gen phụ giữa đầu cuối của trình tự mã hóa protein phi cấu trúc 4 (nsP4) và AUG mở đầu của trình tự mã hóa ARN hệ gen phụ của axit nucleic của alphavirus bị loại bỏ.

Theo phương án của khía cạnh thứ nhất, vùng khởi động hệ gen phụ bị bất hoạt bằng các đột biến điểm phân cụm trong axit nucleic của alphavirus được xác định vị trí ở 5'UTR của ARN hệ gen phụ.

Theo phương án của khía cạnh thứ nhất, các đột biến điểm phân cụm bao gồm hai hoặc nhiều đột biến ở các vị trí 5, 8, 11, 12, 14, 17, 20, 22, 24, 25, 26, 27, 28, 29 và 30 của trình tự SEQ ID NO : 1.

Theo phương án của khía cạnh thứ nhất, đột biến của vùng khởi động hệ gen phụ không làm cải biến trình tự axit amin của đầu carboxy của nsP4.

Theo phương án của khía cạnh thứ nhất, alphavirus có độc lực giảm còn bao gồm các đột biến thích ứng trong trình tự axit nucleic mã hóa protein phi cấu trúc 2 (non-structural protein 2-nsP2) có hiệu quả làm tăng sự sao chép virus, giải phóng, và hiệu giá virus.

Theo phương án của khía cạnh thứ nhất, các đột biến thích ứng là các đột biến axit nucleic mà dẫn đến một hoặc nhiều sự thay đổi axit amin tương ứng với $Y_{370} \rightarrow C$, $K_{371} \rightarrow Q$, $P_{349} \rightarrow T$, $D_{418} \rightarrow A$, $K_{423} \rightarrow T$ trong protein nsP2 của virus TC-83 hoặc sự kết hợp của các đột biến này.

Theo phương án của khía cạnh thứ nhất, alphavirus được chọn từ nhóm bao gồm virus Chikungunya, virus gây viêm não ngựa miền đông, virus gây viêm não ngựa Venezuela và virus gây viêm não ngựa miền tây.

Cụ thể hơn, vấn đề của sáng chế được giải quyết bằng khía cạnh thứ hai là vector chứa trình tự nucleotit mã hóa alphavirus tái tổ hợp có độc lực giảm theo khía cạnh thứ nhất.

Cụ thể hơn, vấn đề của sáng chế được giải quyết bằng khía cạnh thứ ba bằng cách tế bào chủ chứa và biểu hiện vector theo khía cạnh thứ hai.

Cụ thể hơn, vấn đề của sáng chế được giải quyết bằng khía cạnh thứ tư là được phẩm bao gồm alphavirus tái tổ hợp có độc lực giảm theo khía cạnh thứ nhất và chất mang được dụng.

Cụ thể hơn, vấn đề của sáng chế được giải quyết bằng khía cạnh thứ năm bằng được phẩm theo khía cạnh thứ tư, dùng cho phương pháp để đối tượng chống lại sự nhiễm bệnh do phơi nhiễm alphavirus.

Cụ thể hơn, vấn đề của sáng chế được giải quyết bằng khía cạnh thứ sáu là sử dụng được phẩm theo khía cạnh thứ tư để sản xuất vắc xin bảo vệ đối tượng khỏi nhiễm bệnh do phơi nhiễm alphavirus.

Theo khía cạnh thứ năm và khía cạnh thứ sáu, đối tượng là người, ngựa hoặc vật nuôi.

Cụ thể hơn, vấn đề của sáng chế được giải quyết bằng khía cạnh thứ bảy bằng phương pháp tạo alphavirus tái tổ hợp có độc lực giảm không có khả năng sao chép trong muỗi hoặc tế bào muỗi, bao gồm các bước: tách dòng vị trí tiếp nhận ribosom

nội tại của virus encephalomyelocarditis (EMCV IRES) có chức năng chỉ ở tế bào có nguồn gốc động vật có xương sống, mà không có chức năng ở tế bào có nguồn gốc côn trùng, và các gen capsit phía sau các gen glycoprotein vỏ ngoài với gen capsit ở đầu 3' của vùng hệ gen phụ ở phía trước 3' UTR, trong đó capsit được biểu hiện theo cách không phụ thuộc mũ và các gen protein vỏ ngoài được dịch mã theo cách phụ thuộc mũ nhưng protein capsit được dịch mã theo cách phụ thuộc IRES.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp tạo alphavirus tái tổ hợp có độc lực giảm. Phương pháp này bao gồm quá trình tách dòng vị trí tiếp nhận ribosom nội tại của virus encephalomyocarditis (Internal ribosomal entry site of Encephalomyocarditis virus - EMCV IRES) giữa đầu cuối của trình tự mã hóa protein phi cấu trúc thứ 4 (non-structural protein 4 - nsP4) và AUG mở đầu của trình tự mã hóa ARN hệ gen phụ của alphavirus thay cho 5' UTR tự nhiên của ARN hệ gen phụ. Theo phương án liên quan khác, sáng chế đề xuất alphavirus tái tổ hợp có độc lực giảm được tạo ra bằng phương pháp được thảo luận ở trên.

Theo phương án liên quan, sáng chế đề xuất chế phẩm miễn dịch. Chế phẩm miễn dịch này bao gồm alphavirus tái tổ hợp có độc lực giảm như được mô tả ở đây.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1A-1D thể hiện sự sao chép của các virus có nguồn gốc từ chủng TC-83 của VEEV, mã hóa EMCV IRES, tái tổ hợp trong tế bào BHK-21. Fig.1A là biểu đồ thể hiện hệ gen virus được thiết kế, khả năng gây nhiễm của ARN được tổng hợp trong ống nghiệm trong thí nghiệm tâm gây nhiễm, hiệu giá virus tại thời điểm 24 giờ sau biến nạp của 1mg ARN được tổng hợp trong ống nghiệm vào trong các tế bào BHK-21, và kích thước của vết được tạo ra từ virus được chỉ định trong tế bào BHK-21 tại thời điểm 48 giờ sau biến nạp. Mũi tên chỉ ra các vùng khởi động hệ gen phụ chức năng. Các ô được bôi đen thể hiện EMCV IRES. Fig.1B thể hiện sự sắp xếp thẳng hàng đoạn chứa vùng khởi động hệ gen phụ của hệ gen VEEV TC-83 và đoạn tương ứng của VEEV/mutSG/IRES. Vị trí của vùng khởi động được biểu diễn bởi ô mở. Điểm mở đầu của ARN hệ gen phụ trong hệ gen VEEV TC-83 và điểm mở đầu của EMCV IRES được biểu diễn bởi mũi tên. Sự đột biến trong hệ gen VEEV/mutSG/IRES được biểu diễn ở các chữ cái thường. Fig.1C thể hiện vết virus tạo thành trong tế bào BHK-21 được thu tại thời điểm 24 giờ sau biến nạp. Fig.1D thể hiện

sự sao chép của virus sau khi biến nạp 1mg ARN được tổng hợp trong ống nghiệm vào tế bào BHK-21;

Fig.2A-2C thể hiện các đột biến được tìm thấy trong các thể biến dị VEEV/mutSG/IRES được tinh sạch vết virus đã chứng minh rằng sự sao chép hiệu quả hơn trong các tế bào BHK-21, và sự ảnh hưởng của các đột biến thích ứng đã xác định trên VEEV TC-83 và sự sao chép của VEEV/mutSG/IRES. Fig.2A thể hiện danh sách các đột biến được tìm thấy trong hệ gen của các vết virus phân lập so với trình tự đã được công bố của VEEV TC-83 (24). Fig.2B là biểu đồ thể hiện các hệ gen VEEV TC-83 và VEEV/mutSG/IRES, có một hoặc cả hai đột biến đã xác định, và tính lây nhiễm các ARN virus được tổng hợp trong ống nghiệm trong thí nghiệm tâm gây nhiễm. Các vùng khởi động hệ gen phụ chức năng được biểu diễn bằng các mũi tên, và EMCV IRES được thể hiện bằng các ô được bôi đen. Fig.2C thể hiện sự sao chép của virus được thiết kế trong các tế bào BHK-21 sau khi biến nạp 1 mg hệ gen virus được tổng hợp trong ống nghiệm;

Fig.3A-3B thể hiện các đột biến được nhận ra trong protein nsP2 của các biến thể VEEV/mutSG/IRES chứng minh kiểu hình vết rộng. Fig.3A thể hiện danh sách các đột biến được nhận ra trong hệ gen của vết đã tinh sạch phân lập từ virus giống, được thu tại thời điểm 24 giờ sau biến nạp ARN được tổng hợp trong ống nghiệm, và trong các hệ gen phân lập từ virus giống đã được chuyển tiếp ba lần trong các tế bào Vero. Fig.3B thể hiện vị trí của các đột biến được đã xác định trong VEEV nsP2. Các vị trí của vùng chức năng được biết gần đây trong nsP2 alphavirus (38, 39) được chỉ ra.

Fig.4A-4B thể hiện kết quả phân tích protein và ARN tổng hợp trong các tế bào BHK-21 được biến nạp với ARN virus tái tổ hợp được tổng hợp trong ống nghiệm. Các tế bào được xung điện với 4 mg ARN được chỉ thị và được cấy trong các đĩa có kích thước 35mm. Trong Fig.4A, trong vòng 4 tiếng rưỡi sau biến nạp, môi trường trong lỗ được thay thế bằng 1ml aMEM bổ sung 10% FBS, ActD (1mg/ml) và [³H] uridin (20 mCi/ml). Sau 4 giờ ủ ở 37°C, ARN được phân lập và phân tích bằng phương pháp điện di trên gel agarosa. Vị trí của RNA hệ gen và ARN hệ gen phụ của virus được biểu diễn lần lượt bằng G và SG. ARN hệ gen phụ đặc hiệu VEEV/IRES tạo thành dải nhiều khuếch tán hơn so với loại khác, bởi vì virus sản xuất ARN hệ gen phụ cùng di chuyển với ARN ribosom 28S trên gel. Trong Fig.4B, tại thời điểm 12 giờ sau biến nạp, protein được đánh dấu chuyển hóa với [³⁵S] methionin và được phân tích

trên gel natri dodecyl sunphat 10% polyacrylamit. Các vị trí của các chỉ thị khối lượng phân tử (kDa) được biểu diễn ở phía bên trái của gel. Các vị trí của protein cấu trúc virus: C, E1, và p62 (tiền chất của E2) được thể hiện ở phía bên phải của gel. Các dấu hoa thị biểu diễn các vị trí của các protein tế bào (các protein sốc nhiệt), được cảm ứng bởi sự sao chép của các virus mã hóa IRES.

Fig.5A-5C thể hiện sự chuyển tiếp của các thể biến dị VEEV chứa EMCV IRES tái tổ hợp trong các tế bào C₇10. Fig.5A là biểu đồ thể hiện các hệ gen virus. Mũi tên chỉ ra vị trí của vùng khởi động hệ gen phụ chức năng. Các ô được bôi đen thể hiện vị trí của EMCV IRES. Fig.5B thể hiện hiệu giá của các virus tái tổ hợp sau khi chuyển tiếp trong tế bào C₇10. Các tế bào trong các đĩa có kích thước 35mm bị gây nhiễm 400 ml mẫu virus thu được tại thời điểm 24 giờ sau biến nạp vào tế bào BHK-21 với ARN tổng hợp trong ống nghiệm (P1) hoặc 48 giờ sau gây nhiễm các tế bào C₇10. Đường đứt nét chỉ ra giới hạn phát hiện. Fig.5C thể hiện sự mất đoạn của trình tự chứa IRES được xác định trong các thể biến dị VEEV/IRES đã tinh sạch vết, và thể hiện sự sao chép hiệu quả trong tế bào C₇10. Trình tự đặc hiệu EMCV IRES còn lại được chỉ ra bằng các chữ cái thường;

Fig.6 thể hiện sự sao chép của VEEV/mutSG/IRES/1 và VEEV TC-83 trong tế bào NIH 3T3. Tế bào này bị gây nhiễm tại MOI của 10 PFU/tế bào. Môi trường được thay thế tại các thời điểm đã được chỉ định, và hiệu giá virus được đo bằng thí nghiệm tạo vết trên tế bào BHK-21. Các mẫu giống nhau được sử dụng để đo mức giải phóng IFN-a/b trong thí nghiệm sinh học. Mật độ IFN-a/b được giải phóng được thể hiện bằng đơn vị quốc tế IU/ml;

Fig.7 thể hiện tỉ lệ sống của chuột bị gây nhiễm virus VEEV TC-83 và VEEV/mutSG/IRES/1. Chuột Thụy sĩ NIH 6 ngày tuổi được tiêm chủng vào trong não với liều lượng xấp xỉ 10^6 PFU (là đơn vị tạo thành vết virus PFU- plaque forming units). Các cá thể chuột này được theo dõi trong 2 tháng. Sau 9 ngày gây nhiễm, không có cá thể chuột nào bị chết trong bất cứ thí nghiệm nào;

Fig.8 thể hiện tỉ lệ sống của chuột sau khi tiêm chủng và thử thách của chuột trưởng thành. Các cá thể chuột cái Thụy sĩ NIH từ 5 đến 6 tuần tuổi được gây miễn dịch dưới da với chủng TC-83 của VEEV hoặc virus tái tổ hợp với liều lượng xấp xỉ

10^6 PFU. Sau 3 tuần miễn dịch, các cá thể chuột được thử thách dưới da với liều lượng xấp xỉ 10^4 PFU của chủng 3908 VEEV, đã có con bị chết.

Fig.9 thể hiện phương pháp tạo ra alphavirus tái tổ hợp có độc lực giảm không có khả năng lây nhiễm cho muỗi.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế vạch ra chiến lược mới đối với sự phát triển chủng alphavirus có độc lực giảm. Alphavirus có độc lực giảm có khả năng sao chép chỉ trong tế bào của động vật có xương sống. Kiểu hình này có được bằng cách dịch mã protein cấu trúc virus và sau cùng, sự sao chép virus phụ thuộc vào các vị trí tiếp nhận ribosom nội tại của virus encephalomyocarditis (EMCV IRES). Virus có độc lực giảm như vậy có thể sống được và bộc lộ kiểu hình có độc lực giảm cao trong chuột sơ sinh, cảm ứng phản ứng miễn dịch bảo vệ chống lại sự lây nhiễm VEEV. Hơn nữa, vaccin bất hoạt bằng formalin có giá thành cao và không hiệu quả. Thêm vào đó, các vaccin này cần phải tiêm nhắc lại nhiều lần. Ngoài ra, chỉ vaccin virus sống có độc lực giảm chống lại sự lây nhiễm VEEV là rất có khả năng gây phản ứng bất lợi và lây nhiễm cho muỗi khi hút máu ngựa đã được tiêm vaccin. Alphavirus có độc lực giảm được thảo luận ở đây có lợi ích quan trọng so với các loại vaccin hiện nay bởi vì kiểu hình có độc lực giảm không thể hồi biến. Ngoài ra, các alphavirus biến đổi gen không thể sao chép trong các tế bào của muỗi, do đó, đề xuất cách tiếp cận mới để tạo ra virus tái tổ hợp mới còn sống không có khả năng sao chép trong muỗi và do đó, không có khả năng lan truyền trong tự nhiên.

Sự phát triển các dòng cADN gây nhiễm của virus Sindbis và alphavirus khác (12, 25, 36) mở ra cơ hội không chỉ cho các thí nghiệm di truyền hồi biến nhằm mục đích nghiên cứu ở các lĩnh vực khác nhau của ngành sinh học virus và sinh bệnh học, mà còn là cơ hội cho sự phát triển của vaccin tái tổ hợp mới. Sự có độc lực giảm của các virus bằng cách chuyển tiếp chúng vào môi trường mô hoặc phôi thai của gà (29) nhìn chung là do sự tích lũy số lượng nhỏ các đột biến điểm trong gen cấu trúc và phi cấu trúc và yếu tố điều hòa cis của hệ gen virus. Ví dụ, sự có độc lực giảm của chủng vaccin TC-83 VEEV chỉ phụ thuộc vào hai đột biến điểm, và khả năng gây phản ứng bất lợi cao của chủng này có lẽ phản ánh tính chất không ổn định của cơ chế có độc lực giảm này. Điều này làm tăng mối lo ngại về khả năng hồi biến về kiểu dại, kiểu

hình gây bệnh trong suốt quá trình sao chép virus của các cá thể được tiêm vaccin. Số lượng đột biến có thể được tăng thêm nhờ tác nhân gây đột biến hóa học (28), nhưng phương pháp này cũng không tạo ra các biến đổi không có khả năng hồi biến như đã đề cập. Các thao tác về gen kết hợp với các dòng cADN gây nhiễm của virus ARN⁺ mở ra khả năng to lớn trong việc biến đổi mạnh mẽ hệ gen virus, và mang đến cơ hội để tạo ra, các đột biến mất đoạn hoàn toàn không có khả năng hồi biến trình tự hệ gen kiểu dại (5, 6, 10, 19), hoặc vật liệu gen bổ sung có thể thúc đẩy khả năng miễn dịch của các biến thể.

Vẫn có mối lo ngại rằng arbovirus biến đổi về gen có thể được lan truyền trong tự nhiên, thông qua vật chủ trung gian là muỗi, và thể hiện sự tiến hóa hơn nữa trong quá trình sao chép lâu dài, trong muỗi hoặc trong quá trình phát triển virus huyết ở vật chủ là động vật có xương sống. Một ví dụ cho điều này là sử dụng VEEV TC-83 với khả năng tạo ra các mức độ của dịch virus huyết hiệu quả lây nhiễm cho muỗi. Việc phân lập TC-83 từ muỗi bị lây nhiễm tự nhiên được thu thập tại Louisiana (32) trong suốt đại dịch ở Texas năm 1971 nhấn mạnh đến mối nguy hiểm về sự lây truyền các alphavirus có độc lực giảm. Do đó, khi tạo ra thể hệ chủng vaccin mới là virus sống, người ta đã thận trọng tạo ra arbovirus không chỉ có độc lực giảm mạnh mà còn chỉ có khả năng sao chép trong các tế bào của động vật có xương sống. Mục đích này có thể đạt được bằng cách tách dòng yếu tố ARN đặc hiệu tế bào vào hệ gen virus. Trái với IRES của virus bại liệt ở dế (20), yếu tố đặc hiệu EMCV được chờ đợi có tác dụng kém hiệu quả trong tế bào động vật chân đốt.

Theo sáng chế, EMCV IRES được tách dòng trong hệ gen VEEV TC-83 để dịch mã các gen cấu trúc virus phụ thuộc IRES. Một trong số các hệ gen chứa vùng khởi động hệ gen phụ chức năng, và IRES trong 5'UTR của ARN hệ gen phụ. Loại virus này có thể sống được, nhưng khả năng tạo ra ARN hệ gen phụ thúc đẩy sự tiến hóa hơn nữa, dẫn đến sự mất đoạn IRES và có thể hồi biến trở lại sự dịch mã phụ thuộc mũ tiêu chuẩn của các protein cấu trúc. Các đột biến mất đoạn sau này giúp virus có khả năng sao chép trong các tế bào của muỗi. Thể biến dị thứ hai với đa đột biến trong vùng khởi động hệ gen phụ ổn định trên phương diện không có khả năng hồi biến trở lại dịch mã phụ thuộc mũ. Do sự hồi biến như thế không chỉ đòi hỏi sự mất đoạn IRES, mà còn đòi hỏi sự khôi phục vùng khởi động hệ gen phụ đã bị bất hoạt bằng 13 đột biến, dẫn đến sự hồi biến của các đa đột biến này có thể mang các rủi ro

không đáng kể. Tuy nhiên, thể biến dị này đã phát triển một phương pháp thú vị để tiến hóa thành kiểu hình sao chép hiệu quả hơn bằng cách tích lũy các đột biến thích ứng, bổ sung trong gen nsP2. Các đột biến này không làm thay đổi đáng kể mức độ sao chép ARN của virus, sự tổng hợp protein cấu trúc của virus hoặc sự phân chia trong tế bào. Các đột biến đã tìm thấy cũng không tạo ra tín hiệu bổ sung nào có thể tăng hiệu quả đóng gói hệ gen. Do vậy, cơ cấu chức năng của các đột biến này vẫn chưa được xác định. Tuy nhiên, dữ liệu đã công bố thu thập được đề xuất rằng sự đóng gói hệ gen của virus ARN⁺ phụ thuộc chính vào tổ hợp sao chép, và các hệ gen cần được biểu hiện bằng nsPs chức năng thành protein cấu trúc để tạo thành hạt virus (22, 30). Giả thuyết hoạt động ở đây là miền helicaza của nsP2 có thể liên quan tới sự biểu hiện của hệ gen virus cho sự đóng gói của nó thành nucleocapsit, và do đó, các đột biến đã xác định có thể có ảnh hưởng tích cực đối với hiệu quả của quá trình này.

Chú ý rằng mục đích của sáng chế là phát triển các thể biến dị VEEV không có khả năng sao chép trong vật chủ trung gian là động vật chân đốt và thể hiện kiểu hình có độc lực giảm nhiều hơn và bền vững. Sự phát triển chậm hơn của thể biến dị VEEV/mutSG/IRES/1 trong cả tế bào BHK-21 thiếu tín hiệu IFN và tế bào khả biến IFN alpha/beta, các thể biến dị có khả năng cảm ứng các mức IFN alpha/beta cao hơn trong môi trường nuôi cấy mô, nó giảm mạnh khả năng làm chết chuột sơ sinh sau khi tiêm vào trong não, và không có khả năng sao chép trong các tế bào của muỗi đề xuất rằng thể biến dị này có thể đáp ứng các yêu cầu này. Khả năng miễn dịch của thể biến dị này sẽ được khảo sát thêm ở các mô hình động vật khác nhau. Ngoài ra, người ta tin rằng alphavirus gây bệnh viêm não khác có thể được có độc lực giảm bằng cách sử dụng phương pháp tương tự dựa trên EMCV IRES có thể được áp dụng khi kết hợp với các phương pháp khác đã được phát triển trong các năm gần đây (1, 13-15, 31).

Tóm lại, mục đích của sáng chế là phát triển các alphavirus có độc lực giảm và ứng dụng của chúng như một loại vắc xin mới chống lại virus gây viêm não bao gồm VEEV, EEEV và WEEV và các alphavirus khác như virus Chikungunya gây bệnh cho con người và gia súc. Sự sao chép của alphavirus này phụ thuộc vào EMCV IRES làm chúng không có khả năng sao chép trong tế bào của muỗi hoặc vật chủ trung gian là muỗi. Quan trọng hơn, kiểu hình này không thể bị hồi biến bởi vì sự biến đổi toàn bộ xảy ra trong hệ gen virus. Do đó, các thể biến dị mới này có thể được sử dụng để tiêm

chúng mà không phải lo lắng về khả năng lây truyền của chúng qua vật chủ trung gian tự nhiên là muỗi.

Sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra alphavirus tái tổ hợp có độc lực giảm, bao gồm các bước như sau: tách dòng vị trí tiếp nhận ribosom nội tại của virus encephalomyocarditi (EMCV IRES) giữa đầu cuối của trình tự mã hóa protein phi cấu trúc (nsP4) và AUG mở đầu của trình tự mã hóa ARN hệ gen phụ của alphavirus thay thế cho 5'UTR tự nhiên. Phương pháp này còn bao gồm bước bất hoạt vùng khởi động hệ gen phụ của alphavirus bởi các đột biến điểm phân cụm và đột biến mất đoạn 5'UTR tự nhiên trong ARN hệ gen phụ. Hơn nữa, sự bất hoạt của vùng khởi động hệ gen phụ có thể không cần cải biến đầu carboxy của protein phi cấu trúc 4. Ngoài ra, phương pháp có thể còn bao gồm bước tạo ra đột biến thích ứng trong protein phi cấu trúc 2 (nsP2) có hiệu quả làm tăng khả năng sao chép, giải phóng, hiệu giá virus. Các ví dụ về các đột biến thích ứng trong protein phi cấu trúc 2 có thể bao gồm nhưng không hạn chế $Y_{370} \rightarrow C$, $K_{371} \rightarrow Q$, $P_{349} \rightarrow T$, $D_{418} \rightarrow A$, $K_{423} \rightarrow T$ hoặc kết hợp của các đột biến thích ứng này. Ngoài ra, các ví dụ về alphavirus có thể bao gồm nhưng không giới hạn virus viêm não ngựa Venezuela (VEEV), virus viêm não ngựa miền đông (EEEV), virus viêm não ngựa miền Tây (WEEV) hoặc virus Chikungunya.

Sáng chế đề xuất alphavirus tái tổ hợp có độc lực giảm được tạo ra bằng phương pháp được thảo luận ở trên. Các alphavirus như thế có thể không có khả năng sao chép trong muỗi, và lây truyền bằng vật chủ trung gian là muỗi, nhưng có khả năng cảm ứng mức độ IFN alpha/beta cao, phát triển chậm trong các tế bào IFN alpha/beta và trong tế bào BHK-21 thiếu tín hiệu IFN hoặc kết hợp các dạng nói trên.

Sáng chế còn đề xuất vector bao gồm trình tự nucleotit mã hóa alphavirus tái tổ hợp có độc lực giảm như được xác định trong các điểm yêu cầu bảo hộ và tế bào chủ chứa và biểu hiện vector. Việc tạo cấu trúc các vector và biểu hiện chúng trong các tế bào đã biết rõ và là kỹ thuật tiêu chuẩn trong lĩnh vực này. Do đó, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể tạo cấu trúc vector này dựa vào các kiến thức và thí nghiệm thông thường trong lĩnh vực này.

Sáng chế còn đề xuất được phẩm, bao gồm alphavirus tái tổ hợp có độc lực giảm như được xác định trong các điểm yêu cầu bảo hộ và chất mang được dụng. Sáng chế còn đề xuất chế phẩm miễn dịch chứa alphavirus tái tổ hợp có độc lực giảm.

Sáng chế còn bộc lộ phương pháp bảo vệ đối tượng khỏi nhiễm bệnh do phơi nhiễm alphavirus, bao gồm bước: sử dụng lượng có hiệu quả miễn dịch của chế phẩm miễn dịch như được thảo luận ở trên, nhờ đó bảo vệ đối tượng khỏi sự nhiễm bệnh do phơi nhiễm với alphavirus. Đối tượng hưởng lợi ích từ phương pháp này có thể là người hoặc vật nuôi.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp tạo ra alphavirutalphavirus tái tổ hợp có độc lực giảm không có khả năng lây nhiễm cho muỗi, bao gồm bước tách dòng vị trí tiếp nhận ribosom nội tại của virus encephalomyocarditi và các gen capsit phía sau các gen glycoprotein vỏ ngoài với gen lớp capsit nói trên virus ở vị trí đầu 3' của vùng hệ gen phụ phía trước 3'UTR, trong đó lớp vỏ capsit của virus được biểu hiện bằng phương thức không phụ thuộc mũ và các gen protein vỏ ngoài được dịch mã theo phương thức phụ thuộc mũ trong khi protein capsit của virus được dịch mã theo cách thức phụ thuộc IRES.

Chế phẩm được mô tả ở đây có thể được dùng độc lập, hệ thống hoặc cục bộ, bằng bất kỳ phương pháp tiêu chuẩn nào trong lĩnh vực này, ví dụ, dưới da, trong tĩnh mạch, ngoài đường tiêu hóa, trong màng bụng, trong da, trong cơ, cục bộ, hoặc trong mũi. Các công thức liều lượng của chế phẩm đã được mô tả ở đây có thể bao gồm các tá chất mang không độc, không có hại cho sinh lý hoặc có được tính được dùng thông thường hoặc tá được lỏng thích hợp cho phương pháp dùng thuốc và được hiểu rõ bởi những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Chế phẩm được mô tả ở đây có thể được dùng độc lập một hoặc nhiều lần để đạt được, duy trì, cải tiến tác dụng trị liệu. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể xác định được liều lượng hoặc liều thích hợp của chế phẩm bao gồm liều chỉ định đơn hoặc liều chỉ định đa. Liều lượng thích hợp phụ thuộc vào sức khỏe của đối tượng, khả năng cảm ứng của phản ứng miễn dịch, và/hoặc khả năng ngăn chặn lây nhiễm bệnh do alphavirus gây ra, chỉ định và công thức được dùng.

Các ví dụ sau đây được đưa ra với mục đích minh họa các phương án khác nhau của sáng chế và nhưng không có nghĩa giới hạn sáng chế. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này hiểu rõ rằng sáng chế được điều chỉnh được để thực hiện các mục đích và thu được kết quả cuối cùng và ưu điểm đã đề cập, cũng như là các mục đích khác, mục đích cuối cùng và ưu điểm đã nêu ở đây. Người có hiểu biết trung bình

trong lĩnh vực này sẽ phát hiện các thay đổi ở đây và việc sử dụng khác mà nằm trong bản chất của sáng chế được xác định rõ bằng các yêu cầu bảo hộ.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Nuôi cấy tế bào

Các tế bào BHK-21 do Paul Olivo (Đại học Washington, St. Louis, Mo) cung cấp, và các tế bào Vero do Charles Rice (Đại học Rockefeller, NY, NY) cung cấp. Các tế bào NH 3T3 thu được từ Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Mỹ (American Type Tissue Culture Collection - ATCC) (Manassas, VA). Các dòng tế bào này được duy trì ở 37°C trong môi trường cần thiết tối thiểu alpha (alpha minimum essential medium - aMEM) được bổ sung thêm huyết thanh phôi thai bò 10% (fetal bovine serum-FBS) và vitamin. Các tế bào của muỗi C₇10 từ Henry Huang (Đại học Washington, St. Louis, MO) và được nhân giống trong môi trường DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium – DMEM) được bổ sung thêm FBS 10% bất hoạt bởi nhiệt và dung dịch canh tryptophan photphat 10% (tryptose phosphate broth-TPB).

Ví dụ 2: Cấu trúc Plasmid

Kỹ thuật ADN tái tổ hợp tiêu chuẩn được sử dụng cho tất cả các cấu trúc plasmid. Tác giả sẵn sàng cung cấp biểu đồ và trình tự ADN khi có yêu cầu. Plasmid gốc có hệ gen VEEV TC-83 dưới sự điều khiển của vùng khởi động ARN polymeraza SP6, pVEEV TC-83, đã được mô tả trong tài liệu tham khảo (33). pVEEV/IRES chứa EMCV IRES với bốn bộ ba mã hóa đầu tiên của polyprotein EMCV. Trình tự này được tách dòng thành trình tự mã hóa ARN hệ gen phụ VEEV giữa đầu cuối của 5'UTR và AUG mở đầu. pVEEV/mutSG/IRES mã hóa hệ gen VEEV TC-83, trong đó, vùng khởi động hệ gen phụ bị bất hoạt gây bệnh bởi các đột biến điểm phân cụm mà không làm cải biến trình tự axit amin của đầu carboxy của nsP4 (Fig.1A và Fig.1B). Hệ gen virus này có 5'UTR của ARN hệ gen phụ bị xóa bỏ. Do đó, người ta mong đợi rằng các protein VEEV TC-83 cấu trúc và phi cấu trúc được tổng hợp từ ARN hệ gen phụ giống nhau. Các đột biến thích ứng được đưa vào trong nsP2 mã hóa pVEEV/mutSG/IRES bằng sự khuếch đại PCR các đoạn quan tâm của các thể biến dị chọn lọc, sau đó thay thế đoạn tương ứng trong hệ gen gốc. Kỹ thuật dựa trên PCR giống nhau được sử dụng cho việc tách dòng các đoạn khác nhau vào trình tự SphI ở vị

trí 3'UTR của hệ gen VEEV/mutSG/IRES. Tất cả các đoạn được tách dòng sẽ được giải trình tự trước khi thực hiện thí nghiệm tiếp theo với các virus còn sống.

Ví dụ 3: Phiên mã ARN

Các plasmid được tinh sạch bằng phương pháp ly tâm trong gradient CsCl và được tạo mạch thẳng bằng phản ứng cắt của MluI. ARN được tổng hợp bởi ARN polymeraza SP6 (ambion) khi có mặt tương đồng mũ (New England Biolabs). Sản lượng và sự đồng nhất của các bản phiên mã được phân tích bởi phương pháp điện di trên gel trong điều kiện không biến tính. Nồng độ ARN được đo trên bộ tạo ảnh hóa quang (Alpha Innotech), và phản ứng dịch mã được sử dụng cho quá trình xung điện mà không cần tinh sạch thêm.

Ví dụ 4: Biến nạp ARN

Quá trình xung điện của các tế bào BHK-21 được thực hiện dưới các điều kiện đã được mô tả trước (27). Để virus sống được, 1 mg ARN hệ gen virus tổng hợp trong ống nghiệm được xung điện để đưa vào trong các tế bào (27), và sau đó chúng được đổ vào các đĩa có kích thước 10 mm và ủ tới khi quan sát được các hiệu ứng tế bào học. Hiệu giá virus được xác định khi sử dụng thí nghiệm tạo vết tiêu chuẩn trên các tế bào BHK-21 (26).

Để xác định khả năng gây nhiễm ARN, pha loãng 10 lần dung dịch tế bào BHK-21 được xung điện sau đó được đổ vào các khay Costar có 6 lỗ chứa các tế bào nguyên thể, bội biến. Sau 1 giờ ủ ở nhiệt độ 37°C trong lò ủ có CO₂ 5%, các tế bào được phủ bằng 2 ml agarosa siêu tinh khiết 0,5% chứa MEM được bổ sung FBS 3%. Các vết virus được nhuộm với tím tinh thể sau 2 ngày ủ ở nhiệt độ 37°C, và khả năng gây nhiễm được xác định theo đơn vị tạo vết (PFU) trên mỗi mg ARN được biến nạp.

Ví dụ 5: Giải trình tự hệ gen virus

Vết tan rộng được lựa chọn ngẫu nhiên trong quá trình hiệu giá các virus gốc (mà không nhuộm với đỏ trung tính). Các virus được chiết xuất từ các nút agarosa vào trong MEM, và dung dịch còn lại được sử dụng để gây nhiễm. Các tế bào BHK-21 trong các đĩa có kích thước 35 mm. Sau khi CPE phát triển hết, các virus gốc được thu lại để phân tích thêm, và các ARN được phân lập từ các tế bào bị gây nhiễm bằng chất thử TRIzol theo sự hướng dẫn của nhà sản xuất (Invitrogen). Các đoạn gộp lên nhau có

chiều dài khoảng 1000 nucleotit được tổng hợp sử dụng kỹ thuật RT-PCR tiêu chuẩn, được tinh sạch bằng điện di trên gel agarosa và giải trình tự. Việc giải trình tự của 5'UTR được thực hiện sử dụng FirstChoice RLM-RACE Kit (Ambion) như được mô tả ở tài liệu tham khảo (16).

Ví dụ 6: Phân tích sự sao chép virus

1/5 số tế bào được xung điện được đưa vào các đĩa có kích thước 35mm. Tại thời điểm như chỉ ra trên các hình vẽ, môi trường được thay thế và hiệu giá virus được xác định bằng thí nghiệm tạo vết trên tế bào BHK-21 (26). Ngoài ra, các tế bào BHK-21, NIH3T3 hoặc C710 được đưa vào các đĩa có kích thước 35mm và được gây nhiễm tại các vị trí MOI như được chỉ ra trên các hình vẽ. Môi trường được thay thế bằng môi trường tươi, và các hiệu giá virus trong các mẫu thu được được xác định bởi thí nghiệm tạo vết trên tế bào BHK-21.

Ví dụ 7: Phân tích sinh tổng hợp protein

Các tế bào BHK-21 được xung điện với 4 mg ARN được chỉ thị, và 1/5 số tế bào được xung điện được đưa vào các khay Costar có 6 lỗ. Tại thời điểm 12 giờ sau biến nạp, các protein được đánh dấu chuyển hóa bằng cách ủ 30 phút trong 0,8 ml môi trường DMEM khuyết methionin, được bổ sung FBS 0,1 % và 20 mCi/ml [³⁵S]methionin. Sau khi ủ, các protein đi vào môi trường, được phân tách bằng ly tâm và hòa tan vào 100 µl dung dịch đệm nạp protein tiêu chuẩn. Lượng protein bằng nhau được nạp lên trên gel natri dodecyl sunphat (SDS)-polyacrylamit 10%. Sau khi điện di, gel được làm khô và chụp tự động bằng phóng xạ.

Ví dụ 8: Phân tích ARN

Để phân tích sự tổng hợp ARN đặc hiệu virus, các tế bào được xung điện với 4 mg ARN virus được tổng hợp trong ống nghiệm, và 1/5 số tế bào này được đưa vào các đĩa có kích thước 35 mm. Tại thời điểm 4,5 giờ sau biến nạp, môi trường trong lỗ được thay thế bằng 1 ml môi trường aMEM có thêm FBS 10%, ActD (1 µg/ml) và [³H]uridin (20 mCi/ml). Sau 4 giờ ủ ở nhiệt độ 37°C, toàn bộ các ARN tế bào được phân lập bằng Trizol (Invitrogen) theo giao thức của Nhà sản xuất, sau đó được biến tính với glyoxal trong dimetyl sulfoxit và được phân tích bằng điện di trên gel agarosa sử dụng các điều kiện đã nêu trong tài liệu tham khảo (7). Gel được ngâm vào trong 2,5-diphenyloxazon (PPO), được làm khô và chụp tự động bằng phóng xạ.

Ví dụ 9: Phân tích IFN-alpha/beta

Nồng độ của IFN-alpha/beta trong môi trường được đo bằng các phân tích sinh học đã được mô tả trong tài liệu tham khảo (41). Tóm lại, các tế bào L929 được đưa vào trong 100 ml môi trường hoàn thiện có nồng độ là 5×10^4 tế bào/lỗ trong các khay có 96 lỗ và được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 6 giờ. Các mẫu môi trường thu được từ các tế bào bị gây nhiễm NIH 3T3 được xử lý bằng tia UV trong 1 giờ, và được pha loãng ra từng kì trong các bước hai lần trực tiếp trong lỗ với các tế bào L929. Sau khi ủ trong 24 giờ ở nhiệt độ 37°C , cho thêm 100 ml môi trường chứa 2×10^5 PFU virus gây viêm miệng (vesicular stomatitis virus-VSV) vào lỗ và tiếp tục ủ từ 36 giờ - 40 giờ. Sau đó, các tế bào được nhuộm bằng màu tím tinh thể, và điểm cuối được xác định như là nồng độ của IFN-a/b cần thiết để bảo vệ 50% tế bào không bị nhiễm CPE do VSV gây ra. Tiêu chuẩn IFN-a/b để chuẩn hóa các kết quả được mua từ ATCC, và hiệu giá virus giải phóng được xác định bởi vết tan trên tế bào BHK-21.

Ví dụ 10: Đánh giá sự sao chép của virus trong muỗi

Để đánh giá được khả năng sao chép trong muỗi trong cơ thể sống, sử dụng phương pháp tiêm vào ngực muỗi *Aedes aegypti* (dòng có nguồn gốc từ Galveston, Texas) sử dụng xấp xỉ 10^5 PFU trong 1 μL thể tích. Việc tiêm vào ngực muỗi được lựa chọn thay vì dùng đường miệng bởi vì gần như bất cứ muỗi culex nào cũng rất dễ bị nhiễm alphavirus vào lòng ngực, trong khi tính nhạy cảm qua đường miệng có sự thay đổi cao và ít nhạy cảm hơn rất nhiều (42). Sau khi tiêm sử dụng pipet thủy tinh, muỗi được ủ 10 ngày ở nhiệt độ 27°C và sau đó chuẩn độ riêng lẻ trong 1 mL môi trường MEM có bổ sung thêm FBS 20% và Fungizon. Sau đó cứ mỗi 100 μL thể tích cá thể muỗi được chuẩn độ được bổ sung vào lớp đơn tế bào Vero trên khay có 24 lỗ và quan sát trong 5 ngày hiệu ứng tế bào học để phát hiện sự lây nhiễm. Các đối chứng thử nghiệm bao gồm cả virus bố mẹ TC-83 và thể biến dị IRES.

Ví dụ 11: Gây miễn dịch và thử thách với virus VEEV độc

Chuột Thụy Sĩ NIH sáu ngày tuổi được tiêm trong não bằng chủng VEEV TC-83 hoặc các thể biến dị được thiết kế ở liều lượng xấp xỉ 10^6 PFU trong tổng thể tích 20 μL PBS. Sau khi gây nhiễm, mỗi nhóm 8-10 động vật được duy trì trong 2 tháng mà không có bất cứ sự thao túng nào. Trong 21 ngày, chuột được theo dõi hàng ngày để tìm ra dấu hiệu bệnh (xù lông, trầm cảm, biếng ăn, và/hoặc liệt) và/hoặc chết.

Chuột cái Thụy Sĩ NIH tám tuần tuổi được tiêm chủng dưới da với liều lượng xấp xỉ 10^6 PFU/cá thể sử dụng VEEV TC-83 hoặc các virus tái tổ hợp, sau đó thử thách tiêm dưới da 4 tuần sau đó với liều lượng xấp xỉ 10^4 PFU chủng VEEV 3908 độc lực cao. Trong 21 ngày, chuột được theo dõi 2 lần một ngày để tìm ra dấu hiệu bệnh (xù lông, trầm cảm, biếng ăn, và/hoặc liệt) và/hoặc chết.

Ví dụ 12: Các virus dựa trên VEEV TC-83 tái tổ hợp

Cơ sở hợp lý của nghiên cứu này là để phát triển alphavirus có khả năng sao chép hiệu quả trong các tế bào của động vật có xương sống, nhưng không phải muỗi. Do đó, sự sao chép của các virus như vậy phải phụ thuộc vào các protein hoặc các trình tự ARN chỉ có chức năng trong động vật có xương sống, nhưng không có chức năng trong các tế bào côn trùng. Để đạt được điều này, sáng chế đã thiết kế phương pháp tạo sự biểu hiện của các protein cấu trúc alphavirus dựa trên EMCV IRES. IRES được thiết kế không chứa trình tự poly (C), nhưng giữ lại bốn bộ ba mã hóa đầu tiên của polyprotein EMCV nhằm thu được sự dịch mã hiệu quả nhất của gen cấu trúc VEEV TC-83. Trong các thí nghiệm sau này, người ta khẳng định rằng các axit amin bổ sung không có ảnh hưởng bất lợi đối với sự sao chép virus, mà có ảnh hưởng tích cực có thể nhận thấy đối với sự dịch mã của các protein cấu trúc virus (dữ liệu không được thể hiện).

Trong một của các cấu trúc VEEV/IRES, trình tự IRES được tách dòng vào ARN hệ gen phụ phía sau vùng 5'UTR nguyên vẹn (Fig.1A). Do đó, hệ gen này được hy vọng là có khả năng tổng hợp ARN hệ gen phụ. Trong thể tái tổ hợp khác, VEEV/mutSG/IRES, vùng khởi động hệ gen phụ bị bất hoạt do 13 đột biến điểm đồng nghĩa (Fig.1A và Fig.1B), điều này được mong đợi sẽ ngăn chặn sự hồi biến thành vùng khởi động SG ARN hoạt động. Để thúc đẩy sự tổng hợp protein cấu trúc VEEV, trình tự IRES được tách dòng để thay thế 26S 5'UTR.

ARN hệ gen của VEEV/IRES, VEEV/mutSG/IRES và VEEV TC-83 kiểu dại, không bị biến đổi được tổng hợp trong ống nghiệm và biến nạp vào trong các tế bào BHK-21. Trong thí nghiệm tâm gây nhiễm, ARN của VEEV/IRES đã thể hiện khả năng gây nhiễm giống với ARN của TC-83, và tạo thành các vết tan có kích thước đồng nhất giống với kích thước vết tan của TC-83 (Fig.1A và Fig.1B). Điều này nhấn mạnh rằng không đột biến thích ứng, bổ sung nào cần thiết cho quá trình sao chép sản

xuất của virus. VEEV/IRES sao chép đến hiệu giá vượt quá 10^9 PFU/ml, nhưng các hiệu giá cuối cùng này và tỷ lệ sao chép virus chậm hơn rõ rệt so với VEEV TC-83 (Fig.1D). Các tế bào BHK-21 biến nạp với hệ gen virus tái tổ hợp khác, VEEV/mutSG/IRES, thiếu vùng khởi động hệ gen phụ, đã tạo ra virus gây nhiễm không hiệu quả (Fig.1D). Trong thí nghiệm tâm gây nhiễm, cấu trúc này phát triển chủ yếu các vết tan nhỏ, và rất khó để xác định được số lượng vết tan. Điều ngạc nhiên là virus này biểu lộ sự tiến hóa thêm trên sự chuyển tiếp hàng loạt và phát triển nhanh chóng các thể biến dị tạo ra các vết tan lớn hơn (Fig.1C và dữ liệu không được bộc lộ). Đường cong sinh trưởng được thể hiện trong Fig.1D thể hiện sự giải phóng cả virus tạo thành vết tan nhỏ và virus tạo thành vết tan lớn.

Do đó, kết quả của các thí nghiệm này đã chỉ ra rằng, ít nhất trong phạm vi của hệ gen VEEV/IRES, EMCVIREs có thể tạo ra các protein cấu trúc ở mức độ hiệu quả cho sự sao chép VEEV. Cấu trúc với vùng khởi động hệ gen phụ bị đột biến, VEEV/mutSG/IRES, tạo ra virus sao chép sai hỏng có thể tiến hóa cho sự sao chép hiệu quả hơn.

Ví dụ 13: Phân tích các đột biến thích ứng trong VEEV/mutSG/IRES

Sự tiến hóa của VEEV/mutSG/IRES thành kiểu hình vết tan lớn thể hiện sự tích lũy các đột biến bổ sung trong hệ gen virus. Sự hồi biến thành trình tự gen kiểu dại là điều không thể bởi số lượng lớn các đột biến điểm được tạo ra, vì vậy vị trí của các đột biến thích ứng rất khó dự đoán. Để xác định các đột biến, 5 vết tan của các mẫu VEEV/mutSG/IRES thu được tại thời điểm 24 giờ sau xung điện được lựa chọn ngẫu nhiên, và toàn bộ các hệ gen (bao gồm 3' và 5'UTR) của 2 thể biến dị được tinh sạch vết tan được giải trình tự. Danh sách đột biến được xác định được thể hiện trên Fig. 2A. Phần lớn đột biến là đồng nghĩa và không được thể hiện trong yếu tố ARN điều hòa cis đã biết. Do vậy, ảnh hưởng của chúng đối với sự sao chép virus là không chắc chắn. Tuy nhiên, các hệ gen của cả vết tan phân lập cũng chứa đột biến giống trong protein nsP2, $Y_{370} \rightarrow C$, và một trong các hệ gen có aa được mã hóa tiếp theo cũng bị thay đổi ($K_{371} \rightarrow Q$).

Để thử nghiệm tính hiệu quả của các đột biến trong sự sao chép virus, $Y_{370} \rightarrow C$ và cả $Y_{370} \rightarrow C$ và $K_{371} \rightarrow Q$ được tách dòng vào cấu trúc VEEV/mutSG/IRES gốc (Fig.2B) và so sánh khả năng gây nhiễm ARN, tỷ lệ sao chép virus và kích thước vết

tan với các VEEV/mutSG/IRES và các cấu trúc khác. Các thể đột biến giống nhau cũng được tách dòng vào hệ gen VEEV TC-83 nhằm thử nghiệm ảnh hưởng của chúng đối với sự sao chép của virus bố mẹ. Các ARN hệ gen mã hóa IRES với một hoặc cả hai đột biến VEEV/mutSG/IRES/1 và VEEV/mutSG/IRES/2 trong hệ gen, thể hiện khả năng gây nhiễm giống nhau trong thí nghiệm tâm gây nhiễm như thực hiện với ARN VEEV TC-83 và các virus còn sống tạo thành vết tan đồng nhất có kích thước giống với kích thước vết tan của VEEV TC-83 (dữ liệu không được bộc lộ). Chúng cũng thể hiện tỷ lệ phát triển tăng mạnh (Fig.2C và Fig.1D), nhưng ảnh hưởng của đột biến thứ hai gần như không tìm thấy. Do vậy, khi kết hợp với nhau, dữ liệu chỉ ra rằng đột biến $Y_{370} \rightarrow C$ trong nsP2 có ảnh hưởng tích cực lớn đối với sự sao chép virus, và đột biến thứ hai không có ảnh hưởng đáng quan tâm nào. Khi tạo ra đột biến trong hệ gen VEEV TC-83, các đột biến giống nhau không có ảnh hưởng có thể nhận thấy đối với tỷ lệ sao chép của virus hoặc tác dụng đối với hiệu giá cuối cùng (Fig.2C) đã gợi ý rằng việc thúc đẩy sao chép đặc hiệu cho thể biến dị VEEV/mutSG/IRES.

Các thay đổi được xác định ($Y_{370} \rightarrow C$ và $K_{371} \rightarrow Q$) có thể thể hiện chỉ một phần của các đột biến có thể dẫn tới sự sao chép hiệu quả của virus chứa IRES thiếu vùng khởi động hệ gen phụ. Do đó, trong thí nghiệm tương đương, nucleotit 2161- 2959 trong ba dòng vết tan khác được phân lập từ các mẫu đã được giải trình tự, được thu lại tại thời điểm 24 giờ sau gây nhiễm ARN từ ARN được tổng hợp trong ống nghiệm, và của 5 thể biến dị đã tinh sạch vết tan được phân lập từ virus gốc sau khi bổ sung thêm 3 lần chuyển tiếp trong tế bào Vero. Có thể dự đoán rằng sự chuyển tiếp này có thể dẫn đến sự chọn lọc các virus sao chép hiệu quả nhất. Danh sách của các thể đột biến đã xác định được thể hiện trên Fig.3A. Việc giải trình tự được thực hiện trực tiếp từ các đoạn AND có nguồn gốc từ RT-PCR. Do đó, các đột biến thể hiện trình tự liên ứng của quần thể virus ở vết tan và không phải virus có nguồn gốc từ PCR (Fig.3B).

Tất cả các virus phân lập chứa các đột biến trong đoạn được giải trình tự, tương ứng với đầu carboxy của miền ARN helicaza của nsP2, và tất cả axit amin thay thế ở giữa axit amin 348-424. Hơn nữa, đột biến phổ biến nhất, cả trong virus gốc, tạo ra sau khi xung điện, và trong nhóm được chuyển tiếp đều là $Y_{370} \rightarrow C$. Điều này chỉ ra rằng đột biến $Y_{370} \rightarrow C$ chắc chắn có một trong những ảnh hưởng nổi bật nhất đối với sự sao chép, do đó, thể biến dị được mô tả ở trên với các đột biến cụ thể này,

VEEV/mutSG/IRES/1, được sử dụng trong các thí nghiệm được đưa ra trong các phần sau đây.

Ví dụ 14: Ảnh hưởng của đột biến Y₃₇₀→C của nsP2 đối với sự sao chép virus

Việc xác định đột biến thích ứng trong đoạn đầu carboxy của nsP2 được kết hợp helicaza ARN làm ngạc nhiên và không đưa ra bất kỳ sự giải thích nào cho sự tăng sao chép VEEV/mutSG/IRES. Đột biến này có thể có ảnh hưởng thúc đẩy sự sao chép ARN hoặc sự dịch mã protein cấu trúc virus hoặc sự hình thành hạt virus, hoặc sự chia ngăn phức hợp sao chép, v.v. Tuy nhiên, ảnh hưởng được mong đợi nhất là việc tăng sự tổng hợp ARN virus. Do đó, các tế bào BHK-21 được biến nạp cùng với các hệ gen được tổng hợp trong ống nghiệm của các thể biến dị VEEV khác nhau, đánh dấu trao đổi chất với các ARN virus được tổng hợp mới cùng với [³H]uridin khi có mặt ActD trong 4 giờ bắt đầu 4,5 giờ sau xung điện, và ARN được phân tích bằng điện di trên gel agarosa (Fig.4A).

Như mong đợi, VEEV/IRES có khả năng tổng hợp ARN hệ gen phụ, đã chỉ ra rằng IRES được tạo ra ở vị trí đầu 3' của 5'UTR của ARN hệ gen phụ không can thiệp vào hoạt động của vùng khởi động hệ gen phụ. VEEV/mutSG/IRES và các thể biến dị của nó có các đột biến thích ứng trong nsP2 không tạo ra các ARN SG có thể tìm thấy được. Do đó, 13 đột biến được đưa vào trong trình tự vùng khởi động của các hệ gen này hoàn toàn loại bỏ sự phiên mã của ARN hệ gen phụ. Điều ngạc nhiên là các đột biến thích ứng trong nsP2 không có ảnh hưởng nào đặc biệt đối với sự sao chép hệ gen ARN, và các ARN của hệ gen VEEV/mutSG/IRES/1 và VEEV/mutSG/IRES/2 được sao chép hiệu quả như với hệ gen VEEV/mutSG/IRES được thiết kế gốc. Hơn nữa, sự sao chép ARN hệ gen của tất cả các thể biến dị rất giống với VEEV TC-83. Cũng không thể tìm thấy ảnh hưởng nào của các đột biến này trong phạm vi ARN của VEEV TC-83 gốc (xem các lần tương ứng với VEEV/1 và VEEV/2). Các phát hiện này đề xuất rằng sự thích ứng không làm tăng sự sao chép của ARN.

Sự tổng hợp các protein cấu trúc virus được đánh giá tại thời điểm 12 giờ sau xung điện (Fig.4B). Tại thời điểm đó, capsit đặc hiệu VEEV/IRES và VEEV/mutSG/IRES và các protein cấu trúc tương tự khác được tổng hợp gấp 2 lần vẫn kém hiệu quả hơn so với các tế bào được biến nạp bằng ARN của VEEV TC-83. Sự khác biệt nhỏ hợp lý này không giải thích sự cao hơn bậc 4 và 7 so với các giá trị

hiệu giá gây nhiễm thấp hơn của các virus VEEV/IRES và VEEV/mutSG/IRES, lần lượt (so với hiệu giá của VEEV TC-83), được phát hiện trong các mẫu thu được sau 12 giờ biến nạp. Hơn nữa, không có sự khác nhau nào giữa sự tổng hợp các protein virus trong các tế bào BHK-21 chứa các hệ gen VEEV/mutSG/IRES gốc đối với VEEV/mutSG/IRES/1 và VEEV/mutSG/IRES/2 với các đột biến thích ứng trong nsP2 được tìm thấy trong thí nghiệm này và cả các thí nghiệm khác. Đặc điểm khác nhau của các mẫu protein được đánh dấu trong các tế bào bị gây nhiễm với các virus chứa IRES với sự có mặt của hai dải bổ sung, được xác định bởi khối phổ là các protein sốc nhiệt Hsp90 và Hsp72. Ý nghĩa sinh học của sự cảm ứng của chúng là chưa rõ ràng, nhưng có thể kết quả từ một số bất thường trong sự gấp nếp của protein cấu trúc virus dẫn đến phát triển căng thẳng trong các tế bào có các protein cấu trúc được biểu hiện từ IRES.

Trong các thí nghiệm bổ sung, sự phân bố ngoại bào của các glycoprotein virus trong các tế bào bị gây nhiễm với VEEV TC-83, VEEV/mutSG/IRES và VEEV/mutSG/IRES/1 được đánh giá và sự có mặt của các protein này trên bề mặt tế bào được phân tích theo sự nhuộm với các kháng thể đặc hiệu VEEV. Không có sự khác nhau đáng chú ý nào trong sự phân bố các glycoprotein được nhận ra: Khả năng các đột biến thích ứng gây ra sự hình thành của tín hiệu đóng gói bổ sung trong hệ gen virus được kiểm tra; đoạn chứa thể đột biến (tương ứng với nucleotit 2533-2950 của hệ gen VEEV) được tách dòng vào vùng 3' UTR của hệ gen VEEV/mutSG/IRES, và sự tái tổ hợp trong ARN được tổng hợp trong ống nghiệm được kiểm tra trong thí nghiệm tâm gây nhiễm. Không tìm thấy sự tăng về kích thước vết tan hoặc hiệu giá virus so với các giá trị của VEEV/mutSG/IRES.

Trong biến thể khác, vùng khởi động hệ gen phụ và trình tự mã hóa capsit của VEEV được tách dòng vào vùng 3'UTR của hệ gen VEEV/mutSG/IRES để kiểm tra xem sự biểu hiện capsit bổ sung từ ARN hệ gen phụ sẽ tăng hiệu quả của sự sao chép virus hay không. Sự biến đổi này cũng không có bất kỳ hiệu quả tích cực nào đối với hiệu giá virus. Cuối cùng, VEEV/mutSG/IRES tạo ra các hạt tiểu virus tự do hệ gen thay vì các virus bị gây nhiễm được phân tích. Quan sát thấy rằng đây không phải là trường hợp: các tế bào được biến nạp với ARN của VEEV/mutSG/IRES và đánh dấu chuyển hóa với [³⁵S] methionin không tạo ra các hạt tiểu virus mà có thể được phát hiện bởi sự siêu ly tâm trong các gradient sucroza (dữ liệu không được bộc lộ). Do

vậy, kết hợp với nhau, sự phân tích phức tạp được mô tả ở trên không chỉ ra sự giải thích mang tính cơ học rõ ràng đối với sự sao chép không hiệu quả của VEEV/mutSG/IRES gốc hoặc ảnh hưởng tích cực của các đột biến được tìm thấy trong nsP2 của VEEV đối với sự sao chép của virus chứa IRES. Tuy nhiên, mục đích chính của sáng chế là phát triển các thể biến dị VEEV, mà sự sao chép của chúng phụ thuộc vào chức năng EMCVIREs, và cả VEEV/IRES và VEEV/mutSG/IRES/1 xuất hiện để đáp ứng mục đích này.

Ví dụ 15: Sự sao chép các thể biến dị VEEV phụ thuộc IRES trong các tế bào của muỗi và muỗi

Dữ liệu thu thập được về sự sao chép alphavirus đã chứng minh rõ ràng sự mất ổn định di truyền và tốc độ tiến hóa cao dẫn đến sự biến mất bất cứ gen khác loại nào (17, 40), đặc biệt nếu chúng có ảnh hưởng xấu đến sự sao chép virus. Do đó, một trong những câu hỏi quan trọng của sáng chế là liệu việc thêm EMCVIREs được thiết kế có ổn định và làm cho virus không có khả năng sao chép trong tế bào của muỗi hay không. Để kiểm chứng điều này, các tế bào của muỗi C₇10 được gây nhiễm với virus VEEV/IRES và VEEV/mutSG/IRES thu được tại thời điểm 24 giờ sau xung điện để đưa các ARN được tổng hợp trong ống nghiệm vào các tế bào BHK-21. VEEV/mutSG/IRES được sử dụng thay vì VEEV/mutSG/IRES/1 được mô tả ở trên với thể đột biến thích ứng Y₃₇₀→C trong nsP2 để kiểm tra toàn bộ thư viện của các thể biến dị, được giải phóng sau khi biến nạp ARN cho khả năng thành lập sao chép trong tế bào của muỗi.

Trong lần chuyển tiếp thứ nhất, tại thời điểm 48 giờ sau gây nhiễm các tế bào C₇10, hiệu giá của VEEV/IRES đạt được là $1,5 \times 10^{10}$ PFU/ml, và hiệu giá tương tự cũng được tìm thấy trong vật liệu gốc thu được sau lần chuyển tiếp thứ hai (Fig.5A và Fig.5B). Ngược lại, Hiệu giá của VEEV/mutSG/IRES là 150 PFU/ml sau lần chuyển tiếp thứ nhất (điều này chắc chắn phản ánh số virus còn lại được sử dụng cho gây nhiễm chứ không phải virus mới sinh được tạo ra trong các tế bào của muỗi), và dưới giới hạn phát hiện sau lần chuyển tiếp thứ hai dưới đây (Fig.5A và Fig.5B). Trong các thí nghiệm bổ sung, các thể biến dị được tinh sạch vết của VEEV/mutSG/IRES chứa các thể đột biến thích ứng trong nsP2 được chuyển tiếp trong các tế bào C₇10. Không có virus gây nhiễm nào được phục hồi sau 2 lần chuyển tiếp mù.

Trong thí nghiệm khác, muỗi *Ae. aegypti* được tiêm vào lồng ngực với liều lượng xấp xỉ 10^5 PFU của VEEV TC-83 và thể biến dị VEEV/mutSG/1 RES/1. Không có cá thể muỗi nào trong số 17 cá thể muỗi được tiêm thể đột biến IRES có thể sao chép được trong *Ae. aegypti*, trong khi 17/17 cá thể muỗi được tiêm chủng TC-83 bố mẹ sao chép ở mức có thể phát hiện được trong thí nghiệm CPE với hiệu giá trung bình trên 10^6 PFU/cá thể. Do vậy, thể biến dị VEEV chứa IRES, VEEV/mutSG/IRES/1 không có khả năng sao chép trong tế bào của muỗi cả trong ống nghiệm và trong cơ thể sống.

Để giải thích về hiệu giá cao của VEEV/IRES (khả năng tạo ra thể biến dị ARN hệ gen phụ) sau khi chuyển tiếp trong các tế bào của muỗi, hai vết tan riêng biệt được lựa chọn ngẫu nhiên và giải trình tự đoạn chứa IRES của hệ gen. Trong cả hai vết tanphân lập, trình tự IRES không còn có mặt trong các hệ gen virus, và chỉ 13 và 15 nucleotit còn lại của IRES gốc được tìm thấy (Fig.5C). Do đó, việc chuyển tiếp thể biến dị VEEV/IRES trong các tế bào của muỗi dẫn đến sự tích tụ các thể biến dị âm tính IRES, và VEEV/mutSG/IRES (thiếu vùng khởi động hệ gen phụ) không phát triển được các đột biến có khả năng sao chép hiệu quả trong các tế bào của muỗi.

Ví dụ 16: Thể biến dị VEEV/mutSG/1 RES/1 thể hiện kiểu hình có độc lực giảm

Mục đích của sáng chế là nhằm tới sự phát triển các thể biến dị VEEV không có khả năng sao chép trong các tế bào có nguồn gốc từ muỗi (và tương ứng, trong các vật chủ trung gian là muỗi) nhưng thể hiện kiểu hình có độc lực giảm hơn trong động vật có xương sống so với chủng VEEV TC-83 bố mẹ. Tỷ lệ sao chép chậm hơn của thể biến dị VEEV/mutSG/IRES/1 đặt ra mối lo ngại rằng virus này có thể không sao chép được trong các tế bào của động vật có xương sống cùng với sự hình thành và phát tín hiệu IFN α/β nguyên vẹn. Tuy nhiên, đây không phải là trường hợp này. Các kết quả thí nghiệm, được thể hiện trên Fig.6, thể hiện rằng VEEV/mutSG/1 RES/1 sao chép trong các tế bào NIH 3T3, mà không có sai hỏng trong sự tiết và phát tín hiệu IFN α/β , đến hiệu giá lớn hơn 10^9 PFU/ml. Sự sao chép này gây ra sự cảm ứng IFN- α/β hiệu quả hơn (Fig.6), nhưng rõ ràng việc giải phóng IFN không loại bỏ sự sao chép virus đã thành lập trước đó. Như được thể hiện trên các tế bào BHK-21 (Fig.2C), sự sao chép của VEEV/mutSG/1 RES/1 kém hiệu quả hơn so với VEEV TC-83, gợi ý rằng đột biến phụ thuộc IRES có thể được có độc lực giảm trong cơ thể sống. Hơn nữa, sau khi tiêm vào não chuột 6 ngày tuổi với liều lượng xấp xỉ 10^6 PFU, 86% còn sống sau khi bị gây

nhễm và không phát triển tín hiệu viêm não, ngược lại, 92% số chuột bị chết khi dùng chủng TC -83 VEEV với liều lượng tương tự. Kết hợp lại, các dữ liệu này chỉ ra rằng VEEV phụ thuộc IRES biến đổi gen được có độc lực giảm nhiều hơn so với chủng TC- 83 VEEV bố mẹ.

Tuy nhiên, biến thể VEEV/mutSG/IRES/1 vẫn duy trì gây miễn dịch trong cả chuột mới sinh và chuột trưởng thành. 12 cá thể chuột 6 ngày tuổi sống sót khi tiêm vào não với VEEV/mutSG/IRES/1, 10 cá thể chuột sống sót khi tiêm thử dưới da 10^4 PFU chủng VEEV kiểu đại 3908 được sử dụng 5 tuần sau đó; ngược lại, 12 cá thể chuột bị gây nhiễm giả (PBS) thử thách bằng cách thức tương tự, thì không có cá thể nào sống sót (Fig.7). VEEV/mutSG/IRES/1 cũng được gây miễn dịch trong chuột trưởng thành, một cá thể chuột khi được chủng ngừa dưới da với liều lượng xấp xỉ 10^6 PFU đã bảo vệ 80% chuột chống lại sự thử thách tiêm dưới da 3 tuần sau đó với lượng 10^4 PFU ($\sim 10^4$ LD₅₀) của chủng VEEV 3908 (Fig. 8). Trung hòa hiệu giá kháng thể (PRNT₈₀) không thể phát hiện dưới 1:20 trong tất cả các cá thể chuột ngay trước khi thử thách gợi ý rằng sự bảo vệ không đầy đủ sau một lần tiêm vaccin chắc chắn do mức độ sao chép virus chứa IRES trong cơ thể sống thấp hơn. Do vậy, mức độ có độc lực giảm cao sẽ tạo ra sự an toàn cao hơn, nhưng chắc chắn đòi hỏi phải tiêm nhắc lại.

Ví dụ 17: Chiến lược biểu hiện có độc lực giảm cho virus nhưng duy trì khả năng không gây nhiễm muỗi

Theo phương án riêng biệt của sáng chế, chiến lược biểu hiện mới được thiết kế để có độc lực giảm cho virus nhưng duy trì khả năng không gây nhiễm cho muỗi. Chiến lược này bao gồm xác định vùng IRES phía sau các gen glycoprotein vỏ ngoài với gen capsit ở đầu 3' của vùng hệ gen phụ phía trước 3' UTR (Fig.9). Do vậy, thông tin hệ gen phụ được thành lập với các gen protein vỏ ngoài được dịch mã theo phương thức phụ thuộc mũ, nhưng protein capsit dịch mã theo cách thức phụ thuộc IRES. Sự sao chép của thể đột biến IRES mới này trong các tế bào BHK và Vero vẫn có tác dụng, nhưng không thể phát hiện trong các tế bào của muỗi C7/10. Hai mươi cá thể chuột cái trưởng thành *Aedes aegypti* được tiêm vào lòng ngực không thấy bằng chứng về sự sao chép. Khi IRES loại 2 này được sử dụng để chủng ngừa cho chuột, tất cả 10 cá thể chuột chuyển đổi huyết thanh với hiệu giá trung bình thấp hơn khoảng 2 lần so với hiệu giá được cảm ứng bởi TC-83 thông thường, và IRES loại 2 bảo vệ tất cả 10 cá thể chuột không bị chết do thử thách tiêm dưới da. Do đó, chiến lược biểu hiện IRES

mới xuất hiện để làm có độc lực giảm của virus trong khi vẫn giữ lại được kiểu hình bất khả biến trong muỗi.

Bảng 1

Khả năng gây miễn dịch và tính hiệu quả của các thể đột biến IRES TC-83			
Chủng vaccin	Tỷ lệ chuyển đổi huyết thanh	Hiệu giá trung hòa Ab trung bình Ab $\pm$ SD	Tỷ lệ được bảo vệ khỏi thử thách VEEV gây chết
IRES loại 1	0/10	<20	8/10
IRES loại 2	10/10	224 $\pm$ 260	10/10
TC-83	5/5	576 $\pm$ 143	5/5
giả	0/5	<20	0/5

Các tài liệu tham khảo được chỉ ra dưới đây:

1. Aguilar, P. V. et al., 2007, J Virol 81 :3866-76.
2. Alevizatos, A. C. et al., 1967, Am J Trop Med Hyg 16:762-8.
3. Barton, D. J. et al., 1999, J Virol 73:10104-12. 4. Berge, T. O. et al., 1961 , Am. J. Hyg. 73:209-218.
5. Blaney, J. E., Jr. et al., 2006, Viral Immunol 19:10-32.
6. Blaney, J. E., Jr. et al., 2005, J Virol 79:5516-28.
7. Bredenbeek, P. J. et al., 1993, J. Virol. 67:6439-6446.
8. Burke, D. S. et al., 1977, J Infect Dis 136:354-9. 9. Dal Canto, M. C, and S. G. Rabinowitz, 1981 , J Neurol Sc/ 49:397-418.
10. Davis, N. L et al., 1995, Wro/ogy212:102-110.
11. Davis, N. L. et al. 1991 , Virology 183:20-31.
12. Davis, N. L et al., 1989, Virology 171:189-204.

13. Garmashova, N. et al., 2007. J Virol 81 :13552-65 14. Garmashova, N. et al. 2006, . J Virol 80:5686-96.
15. Garmashova, N. et al., 2007, J Virol 81 :2472-84.
16. Gorchakov, R. et al., 2004, J Virol 78:61-75.
17. Gorchakov, R. et al., 2007, Virology 366:212-25.
18. Griffin, D. E. 2001. Alphaviruses, p. 917-962. In Knipe and Howley (ed.), Fields' Virology, Fourth Edition. Lippincott, Williams and Wilkins, New York.
19. Hart, M. K. et al., 2000, Vaccine 18:3067-75.
20. Jan, E., and P. Sarnow. 2002, J Mol Biol 324:889-902.
21. Johnson, K. and D. Martin. 1974. Adv. Vet. Sci. Comp. Med. 18:79-116.
22. Khromykh, A. A. et al., 2001 , J Virol 75:4633-40. 23. Kinney, R. M. et al. 1993, J. Virol. 67:1269-1277.
24. Kinney, R. M. et al. , 1989, Virology 170: 19-30.
25. Kuhn, R. J. et al., 1996, J Virol 70:7900-9.
26. Lemm, J. A. et al., 1990, J. Virol. 64:3001-3011.
27. Liljeström, P. et al., 1991 , J. Virol. 65:4107-4113. 28. Morrill, J. C. et al., 1991 , Vaccine 9:35-41.
29. Murphy, B. R., and R. M. Chanock. 2001. Immunization against viral diseases, p. 435-467. In D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), Fields' Virology, Fourth Edition. Lippincott, Williams and Wilkins, New York.
30. Nugent, C. I. et al., 1999, J Virol 73:427-35.
31. Paessler, S. et al., 2003, J Virol 77:9278-86.
32. Pedersen, C. E. et al., 1972, Am J Epidemiol 95:490-6.
33. Petrakova, O. et al., 2005, J Virol 79:7597-608.
34. Pittman, P. R. et al., 1996, Vaccine 14:337-43.
35. Pugachev, K. V. et al., 2000, J Virol 74:10811-5.
36. Rice, C. M. et al., 1987, J. Virol. 61 :3809-3819.

37. Rivas, F. et al., 1997, J Infect Dis 175:828-32.
38. Russo, A. T. et al., 2006, Structure 14:1449-58.
39. Strauss, J. H., and E. G. Strauss, 1994., Microbiol. Rev. 58:491-562.
40. Thomas, J. M. et al., 2003, J Virol 77:5598-606. 41. Trgovcich, J. et al., 1996. Virology 224:73-83.
42. Weaver, S. C. 1997. Vector Biology in Viral Pathogenesis, p. 329-352. In N. Nathanson (ed.), Viral Pathogenesis. Lippincott-Raven, New York.
43. White, L. J. et al., 2001 , J Virol 75:3706-18.

Yêu cầu bảo hộ

1. Alphavirus tái tổ hợp có độc lực giảm bao gồm:

axit nucleic của alphavirus có phần chèn vào (i) của vị trí tiếp nhận ribosom nội tại của virus encephalomyocarditis (internal ribosomal entry site of encephalomyelocarditis virus - EMCV IRES) có chức năng chỉ ở tế bào có nguồn gốc động vật có xương sống, mà không có chức năng ở tế bào có nguồn gốc côn trùng, giữa đầu cuối của trình tự mã hóa protein phi cấu trúc 4 (nonstructural protein 4 - nsP4) và AUG khởi đầu của trình tự mã hóa ARN hệ gen phụ của alphavirus, và (ii) gen khởi đầu hệ gen phụ được bất hoạt, trong đó alphavirus không có khả năng sao chép ở muỗi và tế bào muỗi.

2. Alphavirus có độc lực giảm theo điểm 1, trong đó 5' UTR của ARN hệ gen phụ ở giữa đầu cuối của trình tự mã hóa protein phi cấu trúc 4 (nsP4) và AUG khởi đầu của trình tự mã hóa ARN hệ gen phụ của axit nucleic của alphavirus bị loại bỏ.

3. Alphavirus có độc lực giảm theo điểm 1, trong đó gen khởi đầu hệ gen phụ được bất hoạt bằng các đột biến điểm phân cụm trong axit nucleic của alphavirus được xác định vị trí ở 5'UTR của ARN hệ gen phụ của alphavirus.

4. Alphavirus có độc lực giảm theo điểm 3, trong đó các đột biến điểm phân cụm bao gồm hai hoặc nhiều đột biến ở các vị trí 5, 8, 11, 12, 14, 17, 20, 22, 24, 25, 26, 27, 28, 29 và 30 của trình tự SEQ IN NO: 1 là 5'ccccuauaacucucuaacggcuaaccugaauggacuacg3'.

5. Alphavirus có độc lực giảm theo điểm 3 hoặc 4, trong đó đột biến của gen khởi đầu hệ gen phụ không làm cải biến trình tự axit amin của đầu tận cùng carboxy của nsP4.

6. Alphavirus có độc lực giảm theo điểm 1, trong đó alphavirus này còn bao gồm các đột biến thích ứng trong trình tự axit nucleic mã hóa protein phi cấu trúc 2 (non-structural protein 2 - nsP2) có hiệu quả làm tăng sự sao chép virus, giải phóng, và độ chuẩn virus.

7. Alphavirus có độc lực giảm theo điểm 6, trong đó các đột biến thích ứng là các đột biến axit nucleic mà dẫn đến một hoặc nhiều sự thay đổi axit amin tương ứng với Y₃₇₀→C, K₃₇₁→Q, P₃₄₉→T, D₄₁₈→A, K₄₂₃→T trong protein nsP2 của virus TC-83 hoặc sự kết hợp của các đột biến này.

8. Alphavirus có độc lực giảm theo điểm 1, trong đó alphavirus được chọn từ nhóm bao gồm virus Chikungunya, virus gây viêm não ngựa miền đông, virus gây viêm não ngựa Venezuela và virus gây viêm não ngựa miền tây.

9. Vector bao gồm trình tự nucleotit mã hóa alphavirus tái tổ hợp có độc lực giảm theo điểm 1.

10. Tế bào chủ chứa và biểu hiện vector theo điểm 9.

11. Dược phẩm bao gồm alphavirus tái tổ hợp có độc lực giảm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8 và chất mang dược dụng.

12. Phương pháp tạo alphavirus tái tổ hợp có độc lực giảm không có khả năng sao chép trong muỗi và tế bào muỗi, bao gồm bước:

tách dòng vị trí tiếp nhận ribosom nội tại của virus encephalomyelocarditis (EMCV IRES) có chức năng chỉ ở tế bào có nguồn gốc động vật có xương sống, mà không có chức năng ở tế bào có nguồn gốc côn trùng, và các gen capsit phía sau các gen glycoprotein bọc ngoài với gen capsit ở đầu tận cùng 3' của vùng hệ gen phụ ở trước 3' UTR, trong đó capsit này được biểu hiện theo cách không phụ thuộc mũ và các gen protein bọc ngoài được dịch mã theo cách phụ thuộc mũ nhưng protein capsit được dịch mã theo cách phụ thuộc IRES.

13. Phương pháp tạo virus chikungunya (CHIK) sống, có độc lực giảm không có khả năng sao chép trong muỗi và tế bào muỗi, phương pháp này bao gồm các bước:

tách dòng vị trí tiếp nhận ribosom nội tại của virus encephalomyocarditis (EMCV IRES) ở giữa một đầu của trình tự mã hóa protein phi cấu trúc 4 (nsP4) và AUG khởi đầu của trình tự mã hóa ARN hệ gen phụ của virus chikungunya (CHIK) thay cho đầu 5'UTR tự nhiên của ARN hệ gen phụ và trước khung đọc mở (open reading frame - ORF) của protein cấu trúc của virus CHIK; và

bất hoạt gen khởi đầu hệ gen phụ của virus chikungunya (CHIK) bằng cách đưa các đột biến điểm phân cụm ở đầu 5'UTR của ARN hệ gen phụ ngăn cản sự đảo ngược vào gen khởi đầu ARN SG hoạt hóa.

14. Phương pháp theo điểm 13, trong đó đột biến điểm phân cụm của gen khởi đầu hệ gen phụ không cải biến đầu tận cùng carboxy của protein phi cấu trúc 4 (nsP4).

15. Phương pháp theo điểm 13, trong đó phương pháp này còn bao gồm:

đưa ít nhất một đột biến thích ứng vào trong trình tự mã hóa protein phi cấu trúc 2 (nsP2) của virus chikungunya (CHIK), trong đó ít nhất một đột biến thích ứng đồng nghĩa với $Y_{370} \rightarrow C$, $K_{371} \rightarrow Q$, $P_{349} \rightarrow T$, $D_{418} \rightarrow A$, $K_{423} \rightarrow T$ hoặc kết hợp các đột biến này của virus viêm não ngựa Venezuela (VEEV).

16. Virus chikungunya (CHIK) sống có độc lực giảm được tạo ra bằng phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm 13-15.

17. Vectơ biểu hiện bao gồm polynucleotit mã hóa virus chikungunya (CHIK) sống có độc lực giảm theo điểm 16.

18. Tế bào chủ được phân lập chứa polynucleotit mã hóa virus chikungunya (CHIK) sống có độc lực giảm theo điểm 16.

19. Dược phẩm bao gồm virus chikungunya (CHIK) sống có độc lực giảm theo điểm 16, và chất mang dược dụng.

20. Chế phẩm miễn dịch bao gồm virus chikungunya (CHIK) sống có độc lực giảm theo điểm 16.

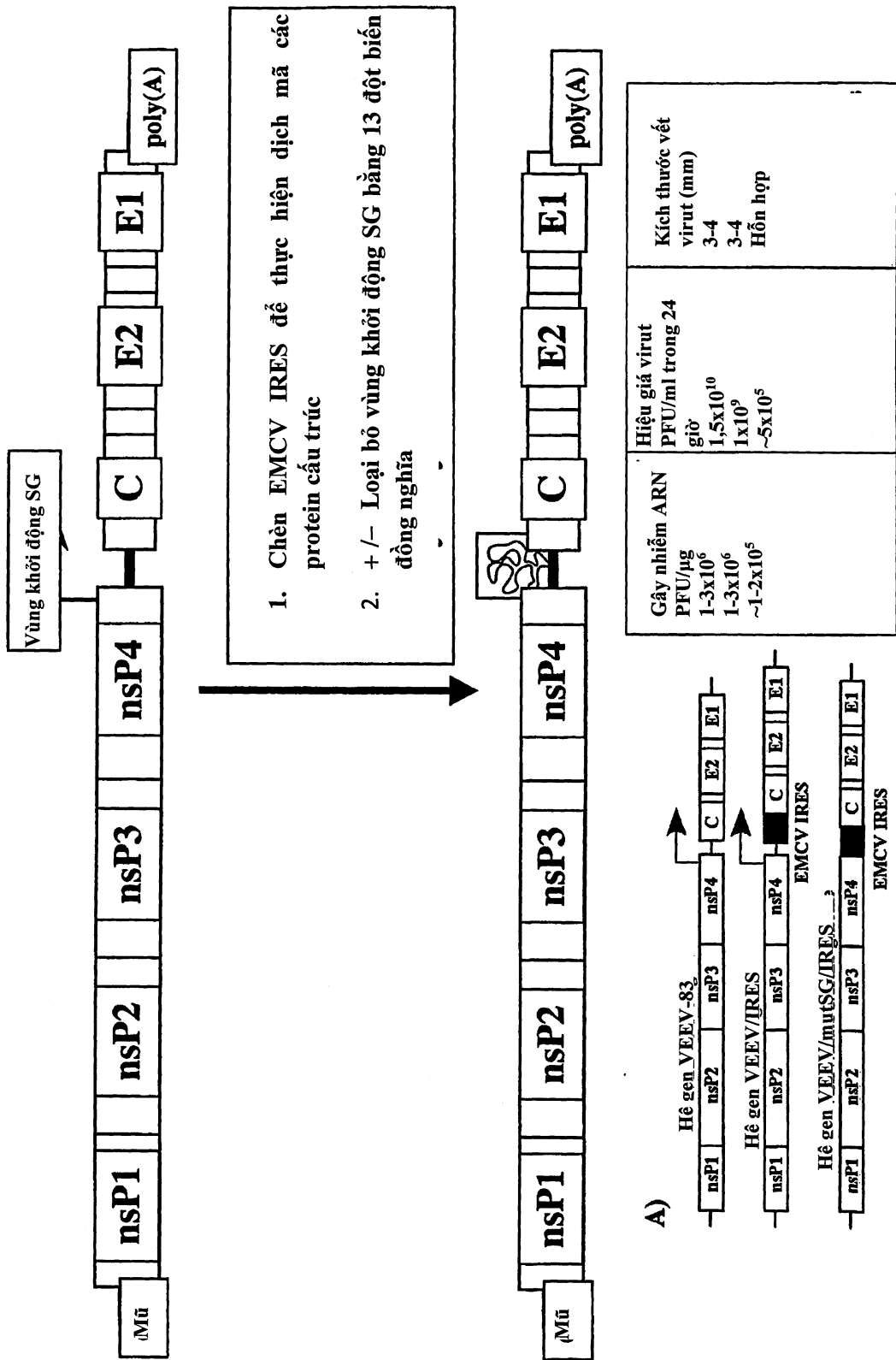


Fig. 1A

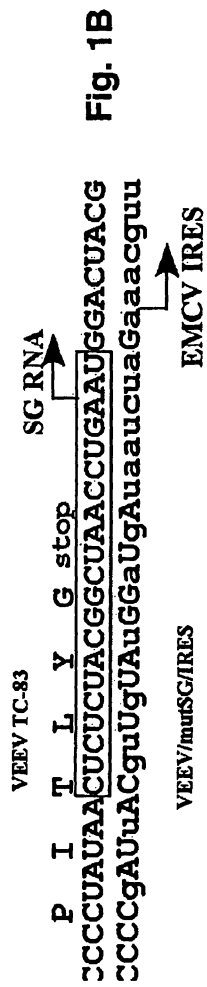


Fig. 1C

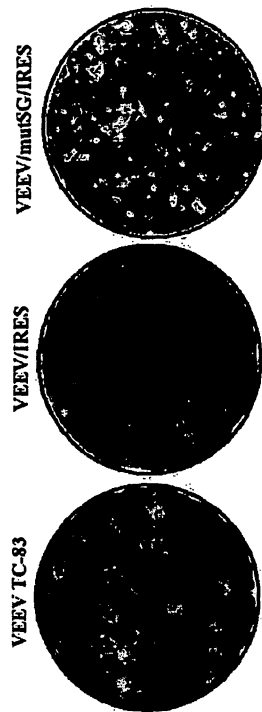
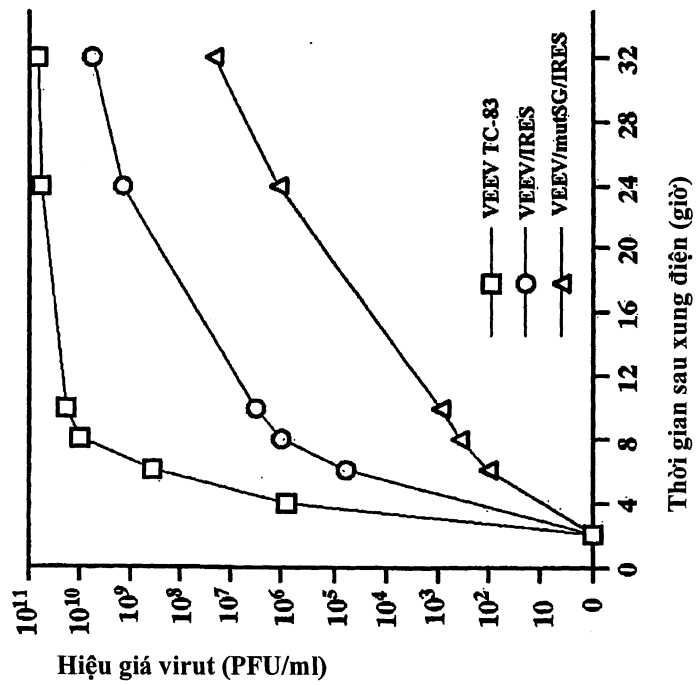


Fig. 1D



Đột biến	Phân lập 1	Phân lập 2	Thay đổi aa
$A_{1613} \rightarrow G$	+	+	Im lặng
$C_{1616} \rightarrow A$	+	+	Im lặng
$T_{1619} \rightarrow C$	+	+	Im lặng
$T_{2176} \rightarrow A$	+	-	Im lặng
$A_{2758} \rightarrow G$	+	+	$Y_{370} \rightarrow C$
$A_{2760} \rightarrow C$	+	-	$K_{371} \rightarrow Q$
$T_{9702} \rightarrow C$	+	+	Im lặng
$T_{10299} \rightarrow G$	+	+	Im lặng

Fig. 2A

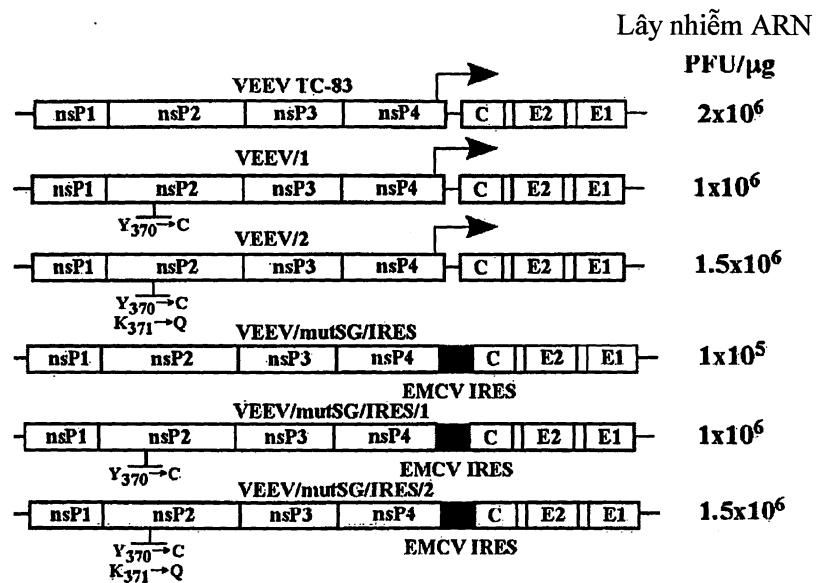


Fig. 2B

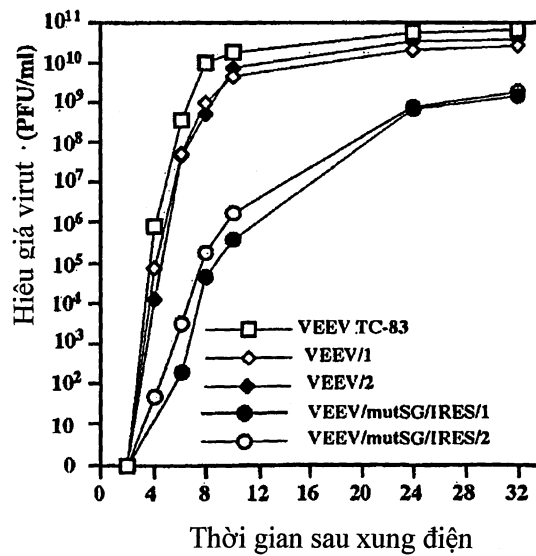


Fig. 2C

Phân lập vết virut	P ₃₄₉ →T	Y ₃₇₀ →C	K ₃₇₁ →Q	D ₄₁₈ →A	K ₄₂₃ →T
Orig. pl 1		+			
Orig. pl 2		+	+		
Orig. pl 3		+			
Orig. pl 4	+				
Orig. pl 5					+
Pass. pl 1		+			
Pass. pl 2		+			
Pass. pl 3		+			
Pass. pl 4				+	
Pass. pl 5					+

Fig. 3A

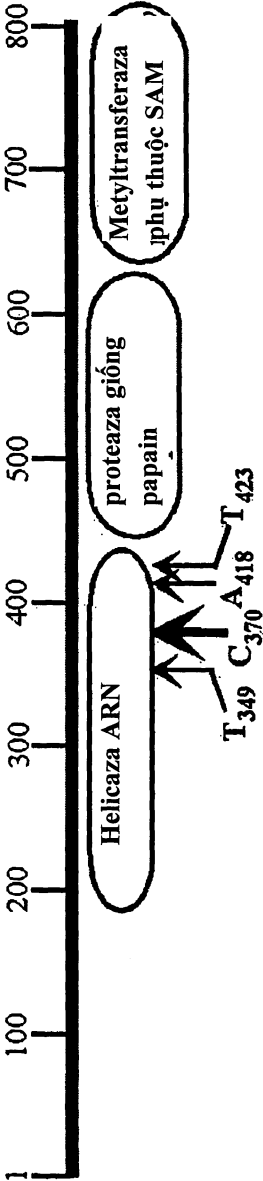


Fig. 3B

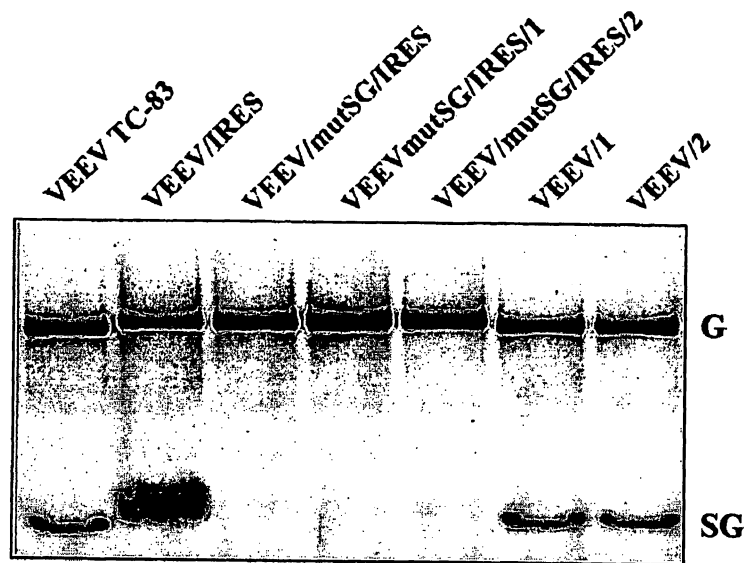


Fig. 4A

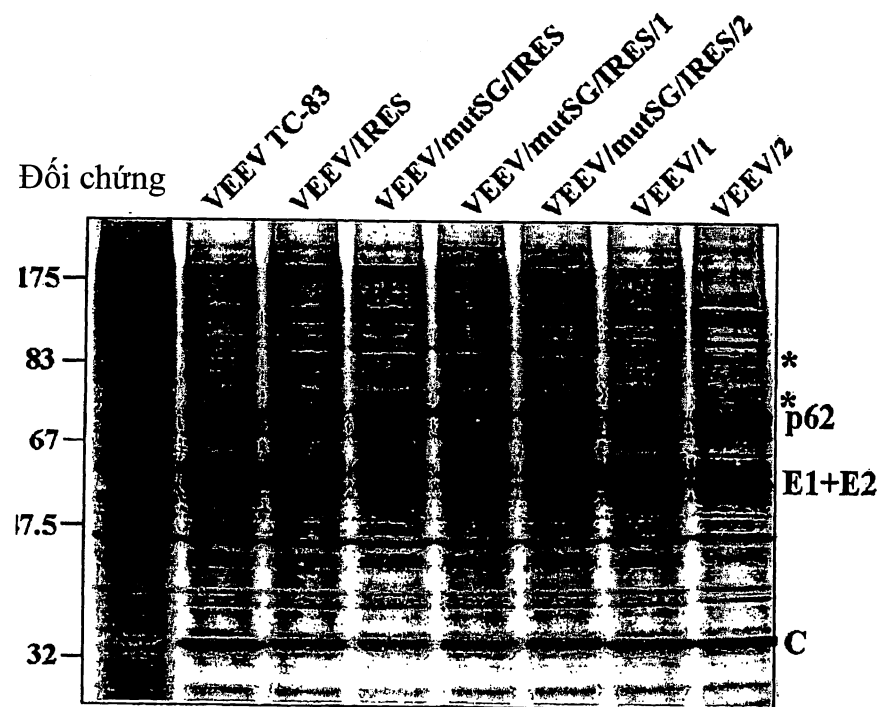


Fig. 4B

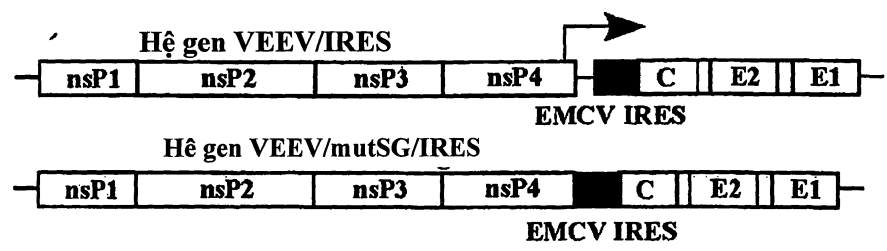


Fig. 5A

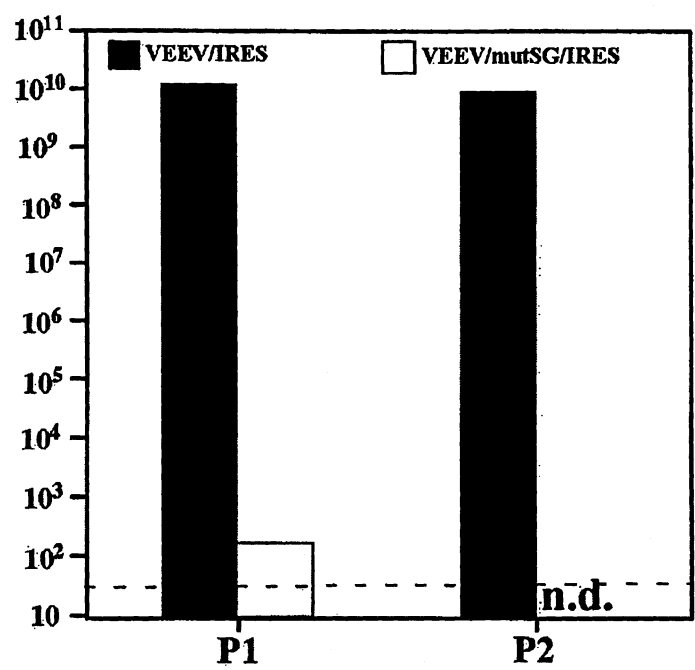


Fig. 5B

→
ATGGACTACGACATAGTCTAGTCCGCCA----tatggccacaaccATG pl. 1
ATGGACTACGACATAGTCTAGTCCGCCAAGtctatggccacaaccATG pl. 2
ATGGACTACGACATAGTCTAGTCCGCCAAG-----ATG TC-83

Fig. 5C

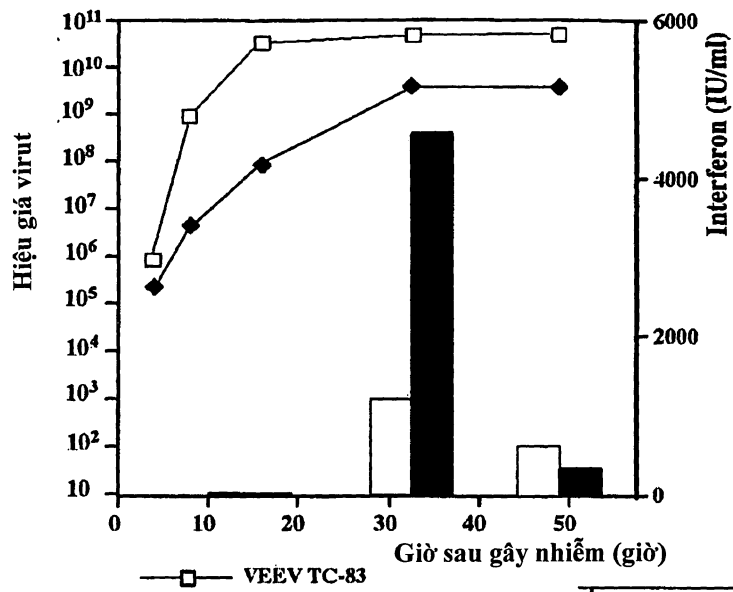


Fig. 6

Fig. 7

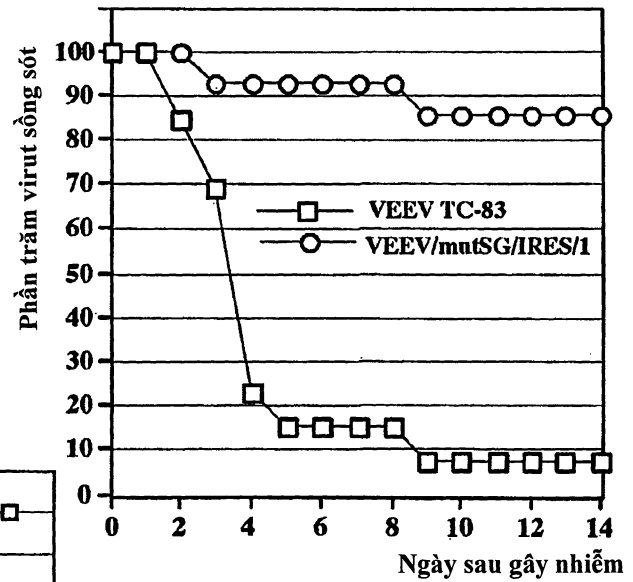
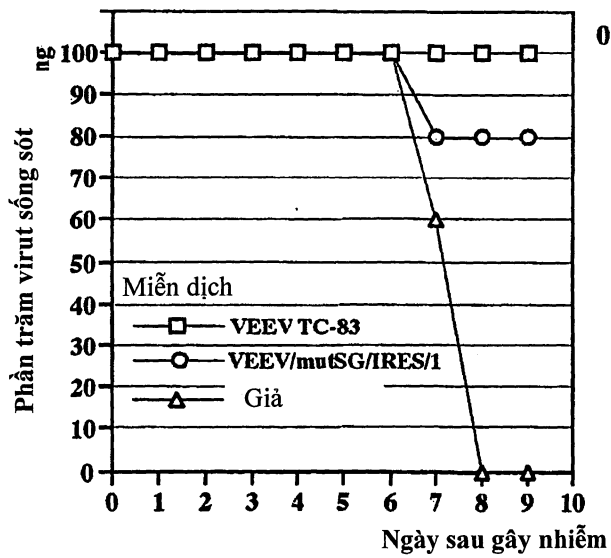


Fig. 8



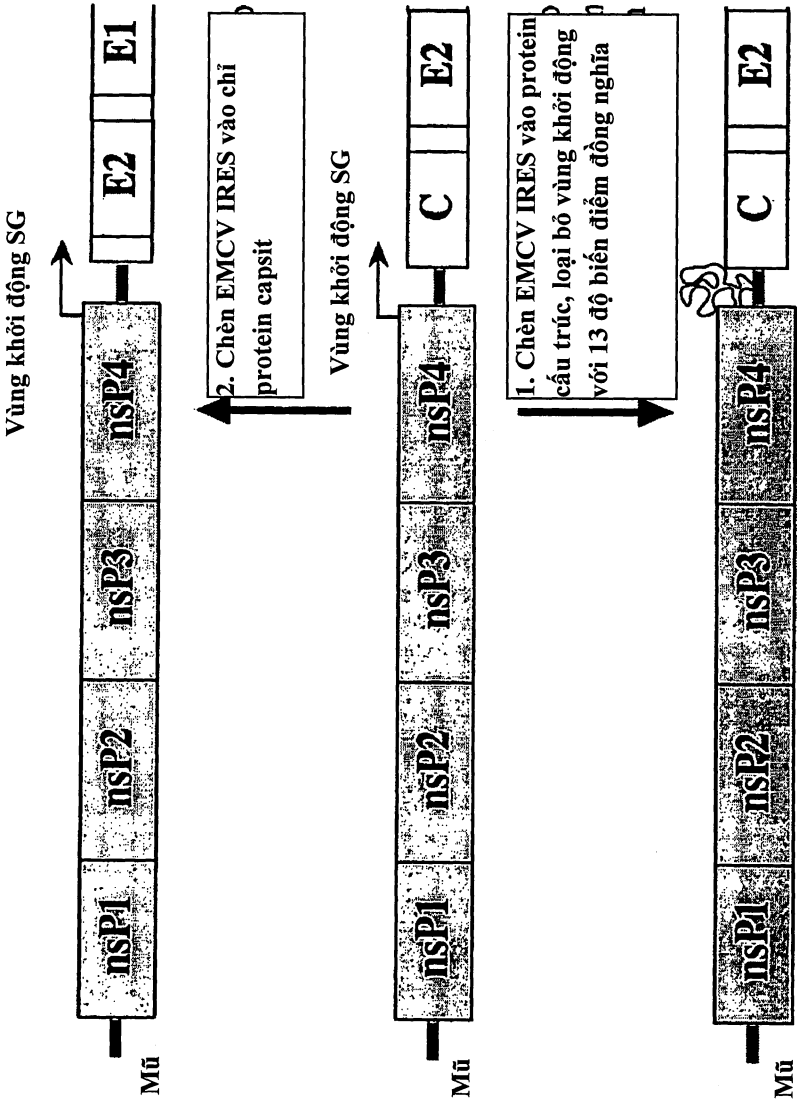


Fig.9

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> The Board of Regents of the University of Texas System

<120> Alphavirut tái tổ hợp có độc lực giảm, phương pháp tạo ra alphavirut và dược phẩm chứa alphavirut này

<130> JMH/8295EP00

<140> EP09735287.6

<141> 2010-09-23

<150> PCT/US2009/000458

<151> 2009-01-23

<150> US 61/062,229

<151> 2008-01-24

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 38

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn ARN của VEEV TC-83 chứa vùng khởi động hệ gen phụ

<400> 1

ccccuaaauac ucucuacggc uaaccugaau ggacuacg

38

<210> 2

<211> 38

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn ARN của VEEV/mutSG/IRES

<400> 2

ccccgauuac guuguaugga ugauaauca gaaacguu

38

<210> 3
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn protein của VEEV/mutSG/IRES

<400> 3

Pro Ile Thr Leu Tyr Gly
 1 5

<210> 4
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn ADN của thể biến dị VEEV/IRES

<400> 4
 atggactacg acatagtcta gtccgccata tggccacaac catg 44

<210> 5
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn ADN của thể biến dị VEEV/IRES

<400> 5
 atggactacg acatagtcta gtccgccaag tctatggcca caaccatg 48

<210> 6
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn ADN của chủng VEEV TC-83

<400> 6

atggactacg acatagtcta gtccgccaag atg

33