



(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)



1-0025388

(51)⁷ A61K 39/145; C12Q 1/70; C12N 7/00; (13) B
C07H 21/04; C07K 14/11

(21) 1-2012-03491

(22) 28/07/2006

(62) 1-2008-00474

(86) PCT/US2006/029575 28/07/2006

(87) WO2007/019094 15/02/2007

(30) 60/705,808 04/08/2005 US

(45) 25/09/2020 390

(43) 27/04/2009 253A

(73) ST. JUDE CHILDREN'S RESEARCH HOSPITAL (US)

262 Danny Thomas Place, Memphis, TN 38105-3678, United States of America

(72) HOFFMANN Erich (DE); LIPATOV Aleksandr S. (RU); WEBSTER Robert G. (US); WEBBY Richard J. (NZ); GOVORKOVA Elens A. (RU).

(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) CHẾ PHẨM CÓ KHẢ NĂNG SINH MIỄN DỊCH CHỨA PHÂN TỬ NGỪNG KẾT TỔ HỒNG CẦU (HA: HEMAGGLUTININ) VIRUT CÚM H5 TÁI TỔ HỢP

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm có khả năng sinh miễn dịch chứa: (a) phân tử ngưng kết tổ hồng cầu (HA: hemagglutinin) virut cúm H5 tái tổ hợp trong đó phân tử HA H5 tái tổ hợp này: (i) có một hoặc nhiều thay đổi trình tự axit amin so với phân tử HA có trong tự nhiên chứa axit amin không phải là asparagin ở vị trí axit amin tương ứng với vị trí axit amin 223 trong HA H5; (ii) chứa asparagin ở vị trí axit amin tương ứng với vị trí axit amin 223 trong HA H5; (iii) có khả năng phản ứng gia tăng với kháng huyết thanh được lấy từ động vật đã bị phơi nhiễm virut cúm H5 hoặc vacxin cúm H5 so với phân tử HA có trong tự nhiên nêu trên; và (iv) không phải là phân tử HA A/HK/213/03, và (b) chất mang.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Nhìn chung, sáng chế đề cập đến việc làm tăng tính kháng nguyên và/hoặc khả năng sinh miễn dịch của các phân nhóm virus cúm.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các virus cúm, đáng lưu ý nhất là các chủng virus đặc biệt A và B, là một trong số các nguyên nhân nghiêm trọng của tình trạng mắc bệnh và tử vong trên toàn thế giới, dẫn tới các bùng phát dịch bệnh hằng năm. Xảy ra theo chu kỳ nhưng với tần suất không đều, các đại dịch thường gây ra tỉ lệ mắc bệnh và tử vong rất cao. Về mặt lịch sử, các đại dịch xảy ra là do việc xuất hiện các phân nhóm virus cúm A mới, sinh ra do việc tái sắp xếp cấu trúc (reassortment) các phân đoạn trong bộ gen của các chủng virus (chuyển dịch kháng nguyên – antigenic shift), do đó, nhìn chung, các dịch bệnh hằng năm là do sự tiến hóa của các kháng nguyên bề mặt của virus cúm A và B (chuyển dịch kháng nguyên). Virus cúm ở người thường có nguồn gốc từ các chủng virus cúm ở loài chim, nên việc truyền nhiễm bệnh cúm về cơ bản là theo phương thức truyền bệnh từ động vật sang người. Cũng đã có bằng chứng cho thấy rằng lợn có thể là vật chủ trung gian (“thùng trộn”) trong việc tạo ra các chủng virus mới có nguồn gốc từ virus cúm ở loài chim, các chủng mới này lại gây bệnh ở người (Scholtissek et al., Virology 1985, 147:287). Sự bùng phát dịch cúm A H5N1 ở Hồng Kông năm 1997 đã cho thấy các virus cúm A có khả năng gây bệnh cao có thể cũng đã được lây truyền trực tiếp từ các loài chim sang người (Claas et al., Lancet 1998, 351:472; Suarez et al., J.Virol. 1998, 72:6678; Subbarao et al., Science 1998, 279:393; Shortridge, Vaccine 1999, 17 (Suppl. 1): S26-S29). Trong năm 2003, đã phát hiện ra rằng các virus phân nhóm H5N1 ở Đông Nam Á có các genotyp khác nhau truyền nhiễm song hành, nhưng trong năm 2004, một genotyp đơn, được biết đến với tên "Z-genotype", đã trở thành genotyp trội (Li et al., Nature 2004, 430:209). Bằng chứng hiện có cho thấy rằng các ca mắc bệnh cúm nặng ở người là do việc lây truyền trực tiếp genotyp này từ loài chim sang người, genotyp này cũng lây nhiễm sang mèo, với phương thức truyền nhiễm trực tiếp từ mèo sang mèo (Kuiken et al., Science 2004, 306:241). Bằng chứng này cũng như các chứng cứ

khác về việc thay đổi vật chủ truyền bệnh và sự phân bố rộng rãi của loại virus này đã gây ra sự lo ngại là virus H5N1 có thể có thêm các đặc tính mới cho phép chúng có thể lây truyền trực tiếp từ người sang người. Nếu con người không miễn dịch được với các virus H5N1 mới này thì các virus này có thể gây ra thảm họa đại dịch cúm (Fouchier et al., *Nature* 2005, 435:419). Khả năng các virus cúm A tạo ra các chủng gây bệnh mới từ vô số các chủng đang lan truyền trong các nguồn động vật đã cho thấy rằng, để khống chế được dịch bệnh, cần phải có các biện pháp kiểm soát các chủng virus này cũng như cần phải phát triển các phương pháp điều trị và các vaccine kháng virus được cải tiến. Tốc độ phát triển nhanh chóng của các chủng virus mới đòi hỏi sự quan tâm cao độ trong nỗ lực kiểm soát, bao gồm các cải tiến kỹ thuật nhằm đánh giá hiệu quả của các vaccine kháng các chủng virus mới.

Các virus cúm A, B và C, thuộc họ *Orthomyxoviridae*, đều có bộ gen ARN đơn sợi âm tính bao gồm nhiều đoạn, được sao chép ở nhân tế bào bị nhiễm, có dung lượng mã hóa gộp khoảng 13kb và chứa thông tin di truyền cho 10 loại protein của virus. Đặc biệt là, các virus cúm có 8 đoạn gen ARN đơn sợi âm tính (nsRNA: negative-sense RNA) ghi mã ít nhất 10 loại polypeptit bao gồm các protein ARN polymeaza được chi phối bởi ARN (PB2, PB1 và PA), các nucleoprotein (NP), neuraminidaza (NA), ngưng kết tố hồng cầu (HA, là protein mà sau khi phân giải bằng enzym cho thấy là nó được hình thành từ việc liên kết hai tiểu phân HA1 và HA2), các protein nền (M1 và M2) và các protein không có cấu trúc (NS1 và NS2) (Krug et al., *In The Influenza Viruses*, R.M. Krug, ed., Plenum Press, New York, 1989, pp. 89-152).

Các hệ kỹ thuật di truyền ngược (reverse-genetics systems) được phát triển gần đây đã cho phép thao tác bộ gen của virus cúm (Palese et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996, 93:11354; Neumann and Kawaoka, *Adv. Virus Res.* 1999, 53:265; Neumann et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, 96:9345; Fodor et al., *J. Virol.* 1999, 73:9679). Ví dụ, đã chứng minh được rằng sự biểu hiện được chi phối bởi plasmid (plasmid-driven expression) của 8 gen ARN đơn sợi âm tính (nsRNA) của virus cúm bắt đầu từ gen khởi đầu đặc hiệu với ARN polymeraza I (pol I promoter) và việc đồng biểu hiện các protein phức polymeaza sẽ tạo ra chủng virus cúm A lây nhiễm (Hoffmann et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000, 97:6108).

Hạt virus của virus cúm có kích thước khoảng 125nm và bao gồm một lõi ARN đơn sợi âm tính được kết hợp với nucleoprotein được bao quanh bởi vỏ của virus có cấu

trúc lipid hai lớp. Lớp trong của vỏ virus chủ yếu bao gồm các protein nền và lớp ngoài của vỏ virus bao gồm chủ yếu là chất lipid có nguồn gốc từ vật chủ. Các protein mà được gọi là “protein bề mặt”, bao gồm neuraminidaza (NA) và ngưng kết tố hồng cầu (HA), trông giống như những cái gai trên bề mặt của hạt virus. Khả năng truyền nhiễm các virus cúm mới phụ thuộc vào sự phân giải HA bởi các proteaza đặc hiệu của vật chủ, trong khi đó NA tham gia vào quá trình giải phóng các virion thế hệ con ra khỏi bề mặt tế bào và ngăn ngừa việc kết thành khối của các virus mới hình thành.

Các protein HA và NA được gắn vào vỏ virus là các chất quyết định tính kháng nguyên ban đầu của virus cúm (Air et al., *Structure, Function, and Genetics*, 1989, 6:341-356; Wharton et al., In *Influenza viruses*, R. M. Krug, ed., Plenum Press, New York, 1989, pp. 153-174). Do việc tái sắp xếp cấu trúc bộ gen phân đoạn của virus cúm, các biến thể HA và NA mới được tạo ra một cách ổn định mà sinh vật mới bị nhiễm virus sẽ không có đáp ứng miễn dịch tiền sử. Glycoprotein HA là kháng nguyên chính làm trung hòa các kháng thể và tham gia vào việc liên kết các hạt virus với các thụ thể trên tế bào chủ.

Các phân tử HA từ các chủng virus khác nhau thể hiện có sự tương tự đáng kể về mặt trình tự ở cả mức độ axit nucleic và mức độ axit amin. Mức độ tương tự này thay đổi khi so sánh các chủng thuộc các phân nhóm khác nhau, trong đó một số chủng có mức độ tương tự cao hơn hẳn so với các chủng khác (Air, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1981, 78:7643). Mức độ tương tự về trình tự axit amin khác biệt giữa các chủng virus cùng phân nhóm so với các chủng khác phân nhóm (Air, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1981, 78:7643). Sự khác biệt này đủ để phân ra các phân nhóm riêng biệt và phản hệ tiến hóa của các chủng virus khác nhau nhưng các trình tự ADN và các trình tự axit amin của các chủng virus khác nhau có thể được sắp xếp dễ dàng bằng cách sử dụng các kỹ thuật tin sinh học thông dụng (Air, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1981, 78:7643; Suzuki và Nei, Mol. Biol. Evol. 2002, 19:501).

Vaccine cúm

Các vaccine cúm hiện nay đang được các cơ quan y tế nhà nước cho phép sử dụng ở Mỹ và châu Âu là các vaccine cúm bất hoạt cũng như vaccine virus cúm sống được làm giảm độc lực FLUMIST ở Mỹ. Các virus thuộc các chủng virus cúm A và B quan trọng về mặt dịch tễ học được nuôi cấy trong trứng gà có phôi, rồi sau đó, hạt

virut được tinh chế và được làm bất hoạt bằng các biện pháp hóa học để thu được nguyên liệu gốc cho vaccin. Hàng năm, tổ chức y tế thế giới (WHO) sẽ lựa chọn các phân nhóm mà có khả năng sẽ hoành hành trong năm đó để phát triển vaccin.

Mặc dù các vaccin cúm đã được sử dụng kể từ những năm đầu của thập niên 1940 để chủng ngừa cho người và từ những năm cuối thập niên 1960 để chủng ngừa cho ngựa, nhưng việc tồn tại các nguồn động vật đa dạng, kết hợp với mối đe dọa xuất hiện virut cúm mới có khả năng gây ra đại dịch, đã thôi thúc việc nghiên cứu tìm ra các liệu pháp mới để phòng chống virut. Trong vài năm trở lại đây, đã có một số tiến bộ quan trọng trong lĩnh vực nghiên cứu bệnh cúm (tham khảo, Cox và Subbarao, Lancet 1999, 354:1277-82). Ví dụ, vaccin cúm tam liên, sống, được làm giảm độc lực, được dùng qua đường mũi (live, attenuated, intranasally administered trivalent influenza vaccine) được sử dụng thử nghiệm đã thể hiện có hiệu quả cao trong việc bảo vệ trẻ em khỏi bị lây nhiễm cúm A H3N2 và cúm B. Các biện pháp khác nhằm cải thiện hiệu quả của vaccin cúm bất hoạt hiện tại bao gồm việc tạo ra các virut cúm được biến đổi gen và thích nghi lạnh bao gồm các đột biến làm giảm độc lực đặc thù (tham khảo, Palese et al., J. Infect. Dis., 1997, 176 Suppl 1:S45-9). Hy vọng rằng, các virut được biến đổi gen này, trong đó các gen ghi mã HA và NA của các chủng virut đang lan truyền được ghép vào theo kỹ thuật tái sắp xếp cấu trúc, có thể được sử dụng làm các vaccin virut cúm sống an toàn để kích thích đáp ứng miễn dịch lâu dài trong cơ thể người. Mặc dù vaccin được thích nghi lạnh có vẻ hiệu quả đối với trẻ em và thanh niên, nhưng có thể chúng lại quá yếu để kích thích đáp ứng miễn dịch lý tưởng ở những người lớn tuổi là nhóm tuổi chủ yếu mà có từ 20.000 đến 40.000 người chết hàng năm ở Mỹ do bị nhiễm cúm.

Các vaccin được lưu hành sẽ cung cấp phương tiện hữu hiệu nhất chống lại đại dịch cúm. Sau sự bùng phát dịch cúm H5N1 năm 1997 ở Hồng Kông, các vaccin được sản xuất bằng hai phương pháp khác nhau đã được đem thử nghiệm ở người. Thông thường, Vaccin phân nhóm H5 được sản xuất từ chủng virut A/duck/Singapore/3/97 sinh miễn dịch ở người kém, ngay cả đối với các chủng có quan hệ gần xét về tính kháng nguyên và ngay cả sau khi chủng ngừa nhiều mũi (multiple vaccination) (Nicholson et al., Lancet 2001, 357:1937; Stephenson et al., Journal of Infectious Disease 2005, 191:1210). Việc sử dụng chất bổ trợ MF59 làm tăng hiệu giá kháng thể của vaccin H5 này (Stephenson et al., Vaccine 2003, 21:1687). Việc chủng ngừa bằng

vacxin bất hoạt “gồm nhiều thành phần” (split) đi từ virus không gây bệnh A/duck/HK/836/80 (H3N1) và ngưng kết tổ hồng cầu H5 của virus A/HK/156/97 (H5N1) đã thu được các hiệu giá kháng thể trung hòa (titers of neutralizing antibodies) ở mức đáng kể (Takada et al., Journal of Virology 1999, 73:8303). Do đó, mặc dù các vacxin H5N1 này đã được dung nạp tốt, nhưng chúng có vẻ là sinh miễn dịch kém. Hiện nay, tình trạng thiếu các vacxin có hiệu quả đối với các chủng virus H5N1 làm tăng mối đe dọa bùng nổ các đại dịch cúm do các chủng virus này gây ra.

Khả năng sinh miễn dịch của vacxin cúm

Các phương pháp hiệu giá kháng thể (antibody titer) trong huyết thanh là các phương pháp thay thế được chấp nhận để đo mức độ bảo vệ của hệ miễn dịch sau khi được chủng ngừa hoặc sau khi bị nhiễm virus. Các phương pháp hiệu giá kháng thể trong huyết thanh được sử dụng chủ yếu là các phương pháp phân tích hiệu giá trung hòa virus và phân tích hiệu giá ức chế ngưng kết tổ hồng cầu (hemagglutinin inhibition – HI). Các phương pháp phân tích này dựa trên khả năng của các kháng thể kháng virus cúm có trong huyết thanh trong việc phản ứng chéo với các kháng nguyên trong các điều kiện *in vitro*. Các phân tích được chọn đối với một trường hợp cụ thể dựa trên không chỉ khả năng cho kết quả nhất quán và khả dụng mà còn dựa trên tính dễ sử dụng cũng như các đòi hỏi về thiết bị, cơ sở vật chất cho từng loại thử nghiệm.

Tóm lại, phân tích trung hòa virus (virus neutralization assay) kiểm tra, đánh giá khả năng của các kháng thể từ mẫu huyết thanh trong việc phong bế sự lây nhiễm virus cúm ở các tế bào được nuôi cấy. Phân tích được tiến hành bằng cách chuẩn bị các dung dịch pha loãng hàng loạt từ mẫu huyết thanh (các hiệu giá) rồi bổ sung vào các dung dịch pha loãng này một lượng chuẩn virus lây nhiễm. Sau đó, từng hỗn hợp sau khi bổ sung virus này được đưa vào môi trường nuôi cấy tế bào, sau đó đánh giá tỉ lệ lây nhiễm bệnh. Phân tích hiệu giá trung hòa virus được xem là phân tích hữu dụng và có độ tin cậy trong việc đánh giá mức kháng thể bảo vệ miễn dịch có trong từng trường hợp. Tuy nhiên, phương pháp phân tích này còn phụ thuộc vào các thiết bị, phương tiện nuôi cấy tế bào và do đó không thông dụng. Phương pháp này cũng tốn thời gian và công sức, do đó nó không thích hợp với việc phân tích sàng lọc số lượng mẫu lớn.

Tương tự như vậy, phân tích ức chế ngưng kết tổ hồng cầu (HI) kiểm tra, đánh giá khả năng của các kháng thể từ mẫu huyết thanh trong việc liên kết với virus đối

chúng được chuẩn hóa. Cơ sở của phân tích này dựa trên thực tế là các virus cúm sẽ liên kết với và ngưng kết các hồng cầu. Trong phân tích HI, các dung dịch pha loãng liên tiếp từ mẫu huyết thanh được trộn với virus đối chứng theo các lượng chuẩn và sau khi ủ trong khoảng thời gian định trước, được bổ sung vào mẫu hồng cầu. Sau đó, việc kết hợp giữa các virus đối chứng và hồng cầu tạo thành các phức có thể quan sát thấy bằng mắt thường. Dung dịch pha loãng nhất của mẫu huyết thanh mà ức chế được ngưng kết tổ hồng cầu sẽ được ghi nhận làm hiệu giá ức chế ngưng kết tổ hồng cầu. Mặc dù không có độ nhạy cao trong việc đánh giá khả năng sinh miễn dịch của vaccin như các phương pháp phân tích khác, nhưng phân tích HI lại được ứng dụng một cách rộng rãi do công nghệ và các yêu cầu về phòng thí nghiệm tương đối đơn giản của phương pháp phân tích này.

Với các hạn chế đã được thảo luận trên đây về các kỹ thuật hiện có để phát triển và đánh giá vaccin cúm, cần phải có các cải tiến về kỹ thuật đánh giá khả năng sinh miễn dịch để kiểm tra đáp ứng miễn dịch sau khi nhiễm virus cũng như đánh giá hiệu quả của vaccin.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất các thay thế axit amin trong phân tử ngưng kết tổ hồng cầu (HA: hemagglutinin) của virus cúm A để có thể làm thay đổi tính kháng nguyên và khả năng sinh miễn dịch của HA. Các thay thế này có thể là thay đổi các vị trí kháng nguyên bằng cách thay đổi tính đặc hiệu liên kết thụ thể và/hoặc liên kết kháng thể-kháng nguyên. Theo một phương án của sáng chế, tính kháng nguyên được làm tăng lên do sự thay thế nêu trên có thể là hữu dụng trong việc làm tăng độ nhạy của phân tích ngưng kết tổ hồng cầu (HI) trên mẫu huyết thanh được lấy từ động vật bị nhiễm virus cúm. Thông tin này có vai trò quan trọng đối với việc sản xuất virus đối chứng chẩn đoán và các vaccin mới cho bệnh cúm. Tốt hơn là, sự thay thế axit amin này dẫn tới tạo ra các phân tử có các đặc tính sinh miễn dịch đặc trưng bởi sự thay thế bằng axit amin asparagin ở vị trí 223 của phân tử HA thuộc phân nhóm H5 (H5 HA).

Do đó, theo các khía cạnh cụ thể, sáng chế đề cập đến phân tử ngưng kết tổ hồng cầu (HA) của virus cúm được thay thế một hoặc nhiều axit amin ở vị trí liên kết thụ thể làm cho phân tử HA này có tính kháng nguyên cao hơn đối với các kháng thể đặc hiệu với phân tử HA không có sự thay thế axit amin ở vị trí liên kết thụ thể đó.

Phân tử HA của virus cúm được làm tăng tính kháng nguyên có thể bao gồm axit amin asparagin ở vị trí tương ứng với vị trí 223 ở phân tử HA thuộc phân nhóm H5, trong đó việc gắn asparagin này vào dẫn tới việc làm tăng khả năng phản ứng với kháng huyết thanh của động vật bị phơi nhiễm virus cúm có phân tử HA kiểu hoang. Phân tử HA của virus cúm được làm tăng tính kháng nguyên có thể bao gồm axit amin asparagin ở vị trí tương ứng với vị trí 223 ở phân tử HA thuộc phân nhóm H5, trong đó phân tử HA không có nguồn gốc từ chủng virus cúm H5 ở người được phân lập A/HK/213/03, việc gắn asparagin vào ở vị trí 223 dẫn tới việc làm tăng khả năng phản ứng với kháng huyết thanh của động vật bị phơi nhiễm virus cúm. Theo một số phương án của sáng chế, sự thay thế axit amin này làm thay đổi vị trí glycosyl hóa. Theo một số phương án của sáng chế, virus cúm là virus cúm A ở người. Ví dụ, virus cúm A ở người có thể là một chủng virus thuộc phân nhóm H5. Virus cúm A ở người có thể là chủng virus A/Vietnam/1203/04 (H5N1). Theo một số khía cạnh của sáng chế, virus cúm này là virus cúm B. Sáng chế đề cập đến các phân tử HA của virus cúm được làm tăng tính kháng nguyên có nguồn gốc từ virus cúm ở loài chim.

Theo các khía cạnh khác, sáng chế đề xuất virus cúm tái tổ hợp chứa phân tử ngưng kết tổ hồng cầu (HA) của virus cúm được thay thế một hoặc nhiều axit amin ở vị trí liên kết thụ thể, sự thay thế này làm cho phân tử HA có tính kháng nguyên cao hơn đối với các kháng thể đặc hiệu với phân tử HA không có sự thay thế axit amin này ở vị trí liên kết thụ thể của nó. Virus tái tổ hợp này có thể bao gồm phân tử HA đã được cải biến được tạo ra từ virus cúm H5N1 trên cơ sở bộ gen của một virus cúm A khác. Virus cúm A này có thể là chủng virus chủ đạo. Virus tái tổ hợp này có thể được sử dụng làm virus đối chứng chẩn đoán trong phân tích ức chế ngưng kết tổ hồng cầu (HI). Virus cúm tái tổ hợp này có thể được bao gồm trong bộ kit phân tích ức chế ngưng kết tổ hồng cầu (HI).

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề cập đến các hệ kỹ thuật di truyền ngược để sản xuất virus chứa phân tử ngưng kết tổ hồng cầu (HA) của virus cúm được thay thế axit amin ở vị trí liên kết thụ thể, sự thay thế này làm cho phân tử HA có tính kháng nguyên cao hơn đối với các kháng thể đặc hiệu với phân tử HA không có sự thay thế axit amin ở vị trí liên kết thụ thể này.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề cập đến các phương pháp sản xuất virut chứa phân tử ngưng kết tổ hồng cầu (HA) của virut cúm được thay thế một hoặc nhiều axit amin ở vị trí liên kết thụ thể, sự thay thế này làm cho phân tử HA có tính kháng nguyên cao hơn đối với các kháng thể đặc hiệu với phân tử HA không có sự thay thế axit amin ở vị trí liên kết thụ thể này. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp bao gồm bước đưa vật truyền tái tổ hợp vào hệ kỹ thuật di truyền ngược, trong đó vật truyền tái tổ hợp này biểu hiện phân tử HA được làm tăng tính kháng nguyên.

Theo các khía cạnh liên quan, sáng chế còn đề xuất phương pháp xác định hiệu quả của vacxin virut cúm ở động vật. Theo một số khía cạnh, phương pháp theo sáng chế bao gồm bước cho kháng huyết thanh được lấy từ động vật đã được chủng ngừa phản ứng với phân tử ngưng kết tổ hồng cầu (HA) của virut cúm (có mặt trong vacxin virut cúm) được thay thế một hoặc nhiều axit amin ở vị trí liên kết thụ thể, sự thay thế này làm cho phân tử HA có tính kháng nguyên cao hơn đối với các kháng thể đặc hiệu với phân tử HA không có sự thay thế axit amin ở vị trí liên kết thụ thể này. Theo một số phương án của sáng chế, phân tử HA được làm tăng tính kháng nguyên có nguồn gốc từ virut phân nhóm H5N1 ở người được phân lập A/HK/213/03 và việc gắn asparagin vào vị trí tương ứng với vị trí 223 ở phân tử HA của virut H5N1 dẫn tới việc làm tăng khả năng phản ứng với kháng huyết thanh được lấy từ động vật đã được chủng ngừa. Theo một số phương án của sáng chế, động vật được đề cập là con người. Theo một số phương án khác của sáng chế, động vật được đề cập là chồn sương.

Các khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất các phương pháp sản xuất virut cúm bao gồm phân tử ngưng kết tổ hồng cầu (HA), trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy hệ kỹ thuật di truyền ngược trong đó ADN ghi mã phân tử HA sẽ ghi mã sự thay thế một hoặc nhiều axit amin ở vị trí liên kết thụ thể, sự thay thế này làm cho phân tử HA có tính kháng nguyên cao hơn đối với các kháng thể đặc hiệu với phân tử HA không có sự thay thế axit amin ở vị trí liên kết thụ thể này, sự thay thế này được thực hiện bằng quy trình kỹ thuật di truyền ngược.

Sáng chế cũng đề xuất các phương pháp làm tăng độ nhạy của phân tích ức chế ngưng kết tổ hồng cầu (HI), các phương pháp này bao gồm việc cho kháng huyết thanh được lấy từ động vật bị nhiễm virut cúm hoặc được chủng ngừa phản ứng với phân tử ngưng kết tổ hồng cầu (HA) của virut cúm được thay thế một hoặc nhiều axit amin ở vị

trí liên kết thụ thể, sự thay thế này làm cho phân tử HA có tính kháng nguyên cao hơn đối với các kháng thể đặc hiệu với phân tử HA không có sự thay thế axit amin ở vị trí liên kết thụ thể này. Theo một số phương án của sáng chế, phương pháp làm tăng độ nhạy của phân tích HI thu được kết quả là độ nhạy của phân tích ức chế ngưng kết tổ hồng cầu (HI) tăng lên ít nhất 2 lần. Theo một số phương án của sáng chế, phương pháp làm tăng độ nhạy của phân tích HI thu được kết quả độ nhạy của phân tích ức chế ngưng kết tổ hồng cầu (HI) tăng lên ít nhất 4 lần.

Một khía cạnh khác của sáng chế đề xuất các phương pháp được sử dụng để xác định xem liệu một cá thể động vật đã bị phơi nhiễm virus cúm hay chưa. Theo một số phương án của sáng chế, phương pháp này bao gồm bước cho kháng huyết thanh được lấy từ động vật phản ứng với virus đối chứng chuẩn đoán được tạo ra từ virus cúm đang nghi ngờ nhưng chứa phân tử ngưng kết tổ hồng cầu (HA) của virus cúm được thay thế axit amin ở vị trí liên kết thụ thể, sự thay thế này làm cho phân tử HA có tính kháng nguyên cao hơn đối với các kháng thể đặc hiệu với phân tử HA không có sự thay thế axit amin ở vị trí liên kết thụ thể, điều này dẫn tới làm tăng khả năng phản ứng với kháng huyết thanh. Theo một số phương án của sáng chế, động vật được đề cập là con người. Theo các phương án khác của sáng chế, động vật được đề cập là chồn sương.

Theo các khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các phương pháp xác định xem liệu một cá thể động vật đã bị phơi nhiễm virus cúm hay chưa. Theo một số phương án của sáng chế, phương pháp này bao gồm bước cho kháng huyết thanh được lấy từ động vật phản ứng với virus đối chứng chẩn đoán được tạo ra từ virus cúm đang nghi ngờ nhưng chứa phân tử HA của virus cúm được cải biến bao gồm axit amin asparagin ở vị trí tương ứng với vị trí 223 ở phân tử HA thuộc phân nhóm H5, trong đó sự gắn asparagin vào dẫn tới việc làm tăng khả năng phản ứng của phân tử HA với kháng huyết thanh được lấy từ động vật bị phơi nhiễm virus cúm có phân tử HA kiểu hoang. Theo một số phương án của sáng chế, phương pháp xác định xem liệu một cá thể động vật đã bị phơi nhiễm virus cúm hay chưa bao gồm việc cho kháng huyết thanh được lấy từ động vật phản ứng với virus đối chứng chẩn đoán có nguồn gốc từ virus cúm đang nghi ngờ nhưng bao gồm phân tử HA của virus cúm được cải biến bao gồm axit amin ở vị trí tương ứng với vị trí 223 ở phân tử HA thuộc phân nhóm H5, trong đó phân tử HA không có nguồn gốc từ virus cúm H5 được phân lập ở người A/HK/213/03 và việc gắn asparagin vào vị trí 223 dẫn tới việc làm tăng khả năng phản ứng với kháng huyết

thanh được lấy từ động vật bị phơi nhiễm virus cúm. Theo một số phương án của sáng chế, động vật được đề cập đến là con người. Theo các phương án khác của sáng chế, động vật được đề cập đến là chồn sương.

Sáng chế cũng đề cập đến các virus vaccine cúm bao gồm phân tử ngưng kết tổ hồng cầu (HA) được thay thế axit amin ở vị trí liên kết thụ thể, sự thay thế này làm cho phân tử HA có tính kháng nguyên cao hơn đối với các kháng thể đặc hiệu với phân tử HA không có sự thay thế axit amin ở vị trí liên kết thụ thể này và trong đó, sự cải biến này dẫn tới việc làm tăng khả năng sinh miễn dịch của virus vaccine nêu trên.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất các axit nucleic được phân lập mã hóa phân tử ngưng kết tổ hồng cầu (HA) của virus cúm được thay thế axit amin ở vị trí liên kết thụ thể, sự thay thế này làm cho phân tử HA có tính kháng nguyên cao hơn đối với các kháng thể đặc hiệu với phân tử HA không có sự thay thế axit amin ở vị trí liên kết thụ thể này. Theo một số phương án của sáng chế, phân tử HA của virus cúm được ghi mã bởi axit nucleic được phân lập bao gồm axit amin asparagin ở vị trí tương ứng với vị trí 223 ở phân tử HA thuộc phân nhóm H5, trong đó phân tử HA không có nguồn gốc từ virus cúm H5 được phân lập A/HK/213/03 và việc có asparagin ở vị trí 223 dẫn tới việc làm tăng khả năng phản ứng của phân tử HA với kháng huyết thanh được lấy từ động vật bị phơi nhiễm virus cúm.

Sáng chế cũng đề xuất các phương pháp sản xuất các axit nucleic ghi mã phân tử ngưng kết tổ hồng cầu (HA) của virus cúm được thay thế axit amin ở vị trí liên kết thụ thể, sự thay thế này làm cho phân tử HA có tính kháng nguyên cao hơn đối với các kháng thể đặc hiệu với phân tử HA không có sự thay thế axit amin ở vị trí liên kết thụ thể này. Theo một số phương án của sáng chế, phương pháp này bao gồm bước đưa trình tự nucleotit vào axit nucleic ghi mã phân tử HA chưa được thay thế axit amin ở vị trí liên kết thụ thể, điều này dẫn tới việc thay thế axit amin trong trình tự của phân tử HA làm cho phân tử HA có tính kháng nguyên cao hơn đối với các kháng thể đặc hiệu với phân tử HA không có sự thay thế axit amin ở vị trí liên kết thụ thể này.

Sáng chế cũng đề xuất quy trình sản xuất thuốc điều trị lây nhiễm virus cúm, trong đó có sử dụng phân tử HA của virus cúm. Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất quy trình sản xuất thuốc điều trị lây nhiễm virus cúm bằng cách sử dụng virus cúm tái tổ hợp bao gồm phân tử HA của virus cúm.

Sáng chế được mô tả chi tiết hơn trong phần Mô tả chi tiết sáng chế và Các ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG. 1 là đồ thị thể hiện các hiệu giá kháng thể kháng HI ở chồn sương được cho nhiễm các virus cúm H5N1 được phân lập trong các năm 2003 và 2004 (A); Các hiệu giá kháng HI và hiệu giá trung hòa virus ở chồn sương được tạo miễn dịch bằng các virus Δ H5N1/03 và Δ H5N1/04 (B). Trên FIG. 1A, huyết thanh được thu vào ngày thứ 28 kể từ ngày bắt đầu cho nhiễm virus H5N1 với lượng bằng 10^6 EID₅₀ (EID₅₀ = 50% Egg Infective Dose = liều gây nhiễm 50% trứng) và được hiệu giá theo 4 đơn vị ngưng kết hồng cầu (HAU) của virus cùng dạng. Số liệu là các trị số tiêu biểu thu được từ 2 hoặc 4 kháng huyết thanh. Trên FIG. 1B, các huyết thanh được thu từ chồn sương được chủng ngừa 2 lần bằng 7 μ gHA của các virus Δ H5N1/03 và Δ H5N1/04 và được hiệu giá lần lượt theo 4 HAU và 100 TCID₅₀ (50% Tissue Culture Infective Dose = liều gây nhiễm 50% mô nuôi cấy) của virus cùng dạng.

FIG. 2 là đồ thị thể hiện các hiệu giá virus ở dịch mũi của các con chồn sương được chủng ngừa và chồn sương đối chứng sau khi được phơi nhiễm virus A/Vietnam/1203/04 (H5N1). Các con chồn sương được chủng ngừa bằng các virus tái tổ hợp Δ H5N1/04 hoặc Δ H5/04 được cho gây nhiễm qua đường mũi bằng virus A/Vietnam/1203/04 với lượng bằng 10^6 EID₅₀. Các hiệu giá tính toán được là các trị số trung bình ($\log_{10}$ EID₅₀/0,1ml) $\pm$ SD (standard deviation = độ lệch chuẩn) được xác định ở dịch mũi của 3 con chồn sương.

Cần lưu ý rằng, sự khác nhau về trị số của hiệu giá giữa các nhóm được chủng ngừa vacxin và nhóm đối chứng là đáng kể với trị số P nằm trong khoảng từ 0,0028 đến 0,0173 theo các kết quả phân tích về trị số của hiệu giá riêng rẽ.

FIG. 3 là mô hình phân tử về polypeptit HA thuộc phân nhóm H5 cho thấy vị trí axit amin ở các vị trí 154 và 223 trong cấu trúc không gian 3 chiều của phân tử HA của chủng virus cúm A/duck/Singapore/3/97 (H5N3). FIG. 3A thể hiện vị trí liên kết thụ thể bao gồm các axit amin này trong cấu trúc không gian 3 chiều. Trên FIG. 3B, vòng tròn biểu thị giao diện giữa monome được thể hiện trên hình vẽ này và hai monome khác (không được thể hiện) trong phân tử tetramer HA. Axit amin ở vị trí

223 khu trú ở vòng 220 của vùng liên kết thụ thể (receptor binding domain) nằm giữa glutamin thường có mặt ở vị trí 222 và glyxin thường có mặt ở vị trí 224.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất các thay đổi về trình tự axit amin của phân tử ngưng kết tổ hồng cầu (HA) của virus cúm, các thay đổi này làm cho phân tử HA có tính kháng nguyên cao hơn đối với các kháng thể đặc hiệu với phân tử HA không có các thay đổi này. Các thay đổi về trình tự này bao gồm các thay thế và loại bỏ. Phân tử HA thu được được gọi là “phân tử HA được làm tăng tính kháng nguyên”.

Phân tử HA được làm tăng tính kháng nguyên hữu dụng trong việc kiểm tra hiệu quả của vaccin, do sự thay đổi trong trình tự của nó làm tăng độ nhạy của các kiểm nghiệm chuẩn đoán về kháng thể kháng virus cúm trong huyết thanh. Theo một phương án cụ thể của sáng chế, virus cúm là virus cúm A. Theo một phương án khác của sáng chế, virus cúm có thể là virus cúm B, và theo một phương án khác nữa của sáng chế, virus cúm có thể là virus cúm C. Theo một phương án của sáng chế, trong đó virus cúm là virus cúm A, virus này có thể là virus cúm A phân nhóm H5. Theo một phương án cụ thể hơn nữa của sáng chế, phân tử HA thuộc phân nhóm H5 được cải biến để bao gồm axit amin asparagin ở vị trí 223 (N₂₂₃), dẫn tới việc làm tăng khả năng phản ứng của phân tử HA với các kháng huyết thanh được lấy từ động vật bị phơi nhiễm virus cúm phân nhóm H5. Theo một phương án cụ thể của sáng chế, phân tử HA theo sáng chế không phải là phân tử HA của chủng virus A/HK/213/03, phân tử HA của chủng virus phân nhóm H5 này xuất hiện trong tự nhiên và có asparagin ở vị trí 223. Virus cúm có thể là virus cúm A ở người thuộc phân nhóm H5 bao gồm chủng virus A/Vietnam/1203/04 (H5N1).

Sự thay đổi axit amin làm phân tử HA có tính kháng nguyên cao hơn có thể được thực hiện ở vùng liên kết thụ thể của HA, ví dụ, như được mô tả ở FIG. 3A, cụ thể là ở vòng 220 thuộc vùng liên kết thụ thể. Thay đổi này có thể làm giảm khả năng liên kết của HA với các thụ thể axit sialic nằm trên các tế bào hồng cầu, do đó làm tăng khả năng của các kháng thể kháng HA trong việc ức chế sự ngưng kết hồng cầu, dẫn tới việc tăng cường hiệu quả của hoạt tính liên kết của thụ thể ở phân tích ức chế ngưng kết hồng cầu. Theo cách khác, sự thay đổi axit amin làm cho phân tử HA có tính kháng nguyên cao hơn có thể được tiến hành để thay đổi hoặc để xóa vị trí glycosyl hóa trên

phân tử protein HA, cụ thể là vị trí glycosyl hóa mà che các epitop trên phân tử HA trong đó các epitop này được các kháng thể đặc hiệu với HA nhận dạng. Theo một phương án của sáng chế, sự thay đổi axit amin có thể được thực hiện đối với gốc axit amin tương ứng với gốc 223 của phân tử HA thuộc phân nhóm H5. Theo tất cả các phương án của sáng chế, các biến đổi axit amin làm cho phân tử HA có tính kháng nguyên cao hơn có thể được dễ dàng xác định bằng các phân tích miễn dịch bằng cách sử dụng các kháng thể đặc hiệu với virus phân nhóm HA cụ thể. Sự biến đổi axit amin làm cho phân tử HA có tính kháng nguyên cao hơn sẽ dẫn tới hoạt tính liên kết với HA của các kháng thể có hiệu giá cao hơn rõ ràng so với hoạt tính liên kết với phân tử HA mà với phân tử HA này các kháng thể được kích thích. Các phân tích này bao gồm các phân tích ức chế ngưng kết tổ hồng cầu (HI).

Theo một phương án cụ thể của sáng chế, sự thay thế gốc serin (có thể là gốc được glycosyl hóa) bằng asparagin (có thể hoặc không được glycosyl hóa hoặc được glycosyl hóa theo cách khác) được thực hiện trên phân tử HA thuộc phân nhóm H5 dẫn tới việc làm tăng tính kháng nguyên của HA. Tuy nhiên, các thay thế khác cũng có thể dẫn tới việc làm tăng tính kháng nguyên một cách rõ ràng. Các thay thế này có thể là, nhưng không nhất thiết phải là, kiểu thay thế bảo toàn, ví dụ, thay serin bằng threonin hoặc thay asparagin bằng glutamin. Chúng có thể giữ được tính phân cực tương đối, ví dụ, khi thay serin bằng asparagin, thay axit aspartic bằng lysin, các thay thế này bảo toàn được tính phân cực nhưng không duy trì được cùng một thay đổi. Cũng có thể thay thế bằng các gốc như glyxin và alanin, các gốc này loại bỏ mạch bên mà không có ảnh hưởng nhiều lên cấu trúc. Cuối cùng, cũng có thể thực hiện các thay đổi hoàn toàn không mang tính bảo toàn. Hơn nữa, các phân tích miễn dịch đơn giản sẽ xác định được liệu một thay đổi cụ thể có dẫn tới việc làm tăng tính kháng nguyên hay không.

Một số virus H5N1 ở loài chim được phân lập ở Trung Mỹ và Nam Mỹ có axit amin cơ bản arginin ở vị trí 223. Axit amin trung tính asparagin ở vị trí 223 được tìm thấy ở phân tử HA của chủng virus ở người được phân lập A/HK/213/03. Gốc axit amin này khu trú ở vòng 220 của vùng liên kết thụ thể nằm giữa glutamin thường có mặt ở vị trí 222 và glyxin thường có mặt ở vị trí 224 (FIG. 3). Bằng chứng thực nghiệm đề xuất là các hiệu giá HI cao hơn phản ánh sự thay đổi về tính đặc hiệu với thụ thể. Thực ra, glutamin thường có mặt ở vị trí 222 và glyxin thường có mặt ở vị trí 224 liên kết trực tiếp với thụ thể axit sialic.

Các axit amin ở vòng 220 hoặc tiếp giáp với vòng này đóng vai trò quan trọng đối với việc cấu dạng của vùng liên kết thụ thể (Ha et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2001, 98:11181). Mặc dù sáng chế không dựa trên bất cứ diễn giải cụ thể nào về kết quả thu được, cũng có thể là sự thay thế serin ở vị trí 223 của phân tử HA thuộc phân nhóm H5 bằng asparagin dẫn tới việc thay đổi về cấu dạng và tính đặc hiệu với thụ thể của phân tử HA thuộc phân nhóm H5.

Theo một khía cạnh khác, phân tử HA được cải biến theo sáng chế có tính kháng nguyên cao hơn cũng có thể có khả năng sinh miễn dịch tốt hơn. Các phân tử này có thể kích thích đáp ứng miễn dịch công hiệu hơn, được sử dụng làm thành phần của vacxin cúm, mà nhờ đó vacxin cúm có khả năng bảo vệ tốt hơn đối với sự lây nhiễm cúm.

Các virus cúm có nguồn gốc từ các loài chim là mối quan tâm đặc biệt đối với ngành y tế công cộng. Đặc biệt là, các virus này được cho là có thể là nguyên nhân gây ra các bùng phát dịch cúm ở người. Do đó, phân tử HA của phân nhóm virus ở loài chim được làm tăng tính kháng nguyên và/hoặc khả năng sinh miễn dịch sẽ đặc biệt hữu dụng trong các phân tích miễn dịch được tiến hành kết hợp với việc phát triển vacxin mới. Phương pháp được nêu ví dụ ở đây liên quan đến phân nhóm virus H5 hữu dụng trong việc làm tăng hiệu giá HI (ức chế ngưng kết tố hồng cầu) đối với các phân tử HA của các phân nhóm virus cúm khác, và phương pháp này đặc biệt hữu dụng để đánh giá mức độ miễn dịch đối với cúm ở loài chim. Theo một số phương án của sáng chế, phân tử HA được thay thế axit amin ở vị trí liên kết thụ thể có thể được tạo ra từ virus cúm ở loài chim, bao gồm toàn bộ các phân nhóm từ H1 đến H16.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất việc sử dụng virus cúm tái tổ hợp có phân tử HA được làm tăng tính kháng nguyên làm virus đối chứng trong phân tích miễn dịch, cụ thể là phân tích HI, bao gồm bộ kit để tiến hành phân tích này. Ví dụ, việc thay thế axit amin bằng asparagin ở vị trí 223 trong phân tử HA thuộc phân nhóm H5 làm tăng sự liên kết với các thụ thể axit sialic của tế bào hồng cầu (RBC) có liên kết 2,6, ví dụ như các phân tử HA của virus cúm gà, nhưng lại làm giảm khả năng liên kết với các thụ thể có liên kết α 2,3 với axit N-glycosyl sialic, ví dụ như các phân tử HA của virus cúm ngựa. Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất liên kết yếu hơn trên các tế bào hồng cầu của ngựa được tạo ra sẽ đòi hỏi lượng kháng thể ít hơn để ức chế sự ngưng kết hồng cầu. Khái niệm về việc thực hiện các thay thế axit amin (ở phân

tử HA) làm tăng tính kháng nguyên này, như được đo bằng sự liên kết với kháng thể, có thể được áp dụng cho các phân tử HA của tất cả 16 phân nhóm virus, bao gồm các phân tử HA của các virus cúm A ở loài chim.

Sáng chế đề xuất phương pháp xác định hiệu quả của vaccin cúm ở động vật. Phương pháp này bao gồm bước cho kháng huyết thanh được lấy từ động vật được chủng ngừa phản ứng với virus cúm mà virus cúm này có phân tử ngưng kết tổ hồng cầu (HA) được làm tăng tính kháng nguyên. Một số khía cạnh của sáng chế đề xuất phương pháp xác định hiệu quả của vaccin cúm ở động vật, như được mô tả ở các ví dụ thực hiện sáng chế, bao gồm bước cho kháng huyết thanh được lấy từ động vật được chủng ngừa phản ứng với phân tử HA thuộc phân nhóm H5 chứa axit amin asparagin ở vị trí 223 (N₂₂₃), ví dụ, phân tử HA từ chủng virus H5N1 ở người được phân lập A/HK/213/03. Asparagin ở vị trí 223 dẫn tới việc làm tăng khả năng phản ứng của HA với kháng huyết thanh được lấy từ động vật được phơi nhiễm một chủng virus cúm H5 khác. Động vật đã được chủng ngừa có thể là động vật bất kỳ trong số một số loài động vật, bao gồm chồn sương và con người.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp làm tăng độ nhạy của phân tích HI bằng việc sử dụng virus đối chứng có phân tử HA được làm tăng tính kháng nguyên. Theo một số phương án của sáng chế, phân tử HA có nguồn gốc từ chủng virus H5N1 ở người được phân lập A/HK/213/03, sự thay đổi về axit amin ở đây là sự có mặt của asparagin ở vị trí 223, dẫn tới việc làm tăng khả năng phản ứng với kháng huyết thanh được lấy từ động vật bị phơi nhiễm virus cúm H5 có gốc axit amin khác ở cùng vị trí đó, ví dụ như chủng virus A/Vietnam/1203/04. Khả năng phản ứng có thể được tăng lên đến mức độ bất kỳ, bao gồm việc khả năng phản ứng được tăng lên ít nhất 2 lần hoặc ít nhất 4 lần. Việc khả năng phản ứng được tăng lên 2 lần hoặc 4 lần có thể đặc biệt có ý nghĩa trong các trường hợp khi các điểm kết thúc hiệu giá của các phương pháp hiệu giá thông thường nằm dưới ngưỡng phát hiện.

Theo một phương án cụ thể của sáng chế, trong đó, virus đối chứng chẩn đoán được sử dụng là virus cúm tái tổ hợp chứa phân tử HA thuộc phân nhóm H5 được cải biến có axit amin asparagin ở vị trí 223, dẫn tới việc làm tăng khả năng phản ứng với kháng huyết thanh được lấy từ động vật bị phơi nhiễm virus cúm H5. Theo một phương án cụ thể của sáng chế, phân tử HA thuộc phân nhóm H5 của virus cúm đối chứng chuẩn đoán có nguồn gốc từ chủng virus H5N1 ở người được phân lập A/HK/213/03.

Theo một phương án khác của sáng chế, asparagin (hoặc glutaman) được thế vào vị trí 223 của phân tử HA từ chủng virus cúm khác. Hiển nhiên là, phương pháp tương tự có thể được áp dụng cho phân tử HA bất kỳ từ chủng virus cúm bất kỳ. Theo các phương án khác nhau của sáng chế, động vật có thể là động vật bất kỳ trong số một số loài động vật, bao gồm chồn sương và con người.

Ngoài việc được sử dụng làm virus đối chứng để làm tăng độ nhạy trong các phân tích lâm sàng đối với vaccine sử dụng cho người, các virus này còn có thể được sử dụng trong các nghiên cứu dịch tễ huyết thanh học. Các số liệu cho biết có bao nhiêu người đã bị nhiễm các virus H5N1 được thực hiện bằng các phương pháp đơn giản và nhanh như phân tích HI sẽ cung cấp thông tin quan trọng về sự lan truyền của các virus H5N1 ở người. Số liệu này có thể được sử dụng để đánh giá khả năng các virus H5N1 lây truyền từ người sang người hay giữa các loài chim và con người.

Theo các khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các phương pháp xác định xem liệu một động vật đã bị phơi nhiễm virus cúm hay chưa bằng việc cho kháng huyết thanh của động vật này phản ứng với virus đối chứng chẩn đoán. Virus đối chứng chẩn đoán được tạo từ cùng chủng virus cúm với chủng virus phơi nhiễm, nhưng khác ở chỗ là virus đối chứng chứa phân tử HA được làm tăng tính kháng nguyên. Theo một phương án của sáng chế, virus đối chứng bao gồm phân tử HA có asparagin ở vị trí tương ứng với vị trí 223 ở phân tử HA thuộc phân nhóm H5, trong đó việc đưa asparagin vào dẫn tới việc làm tăng khả năng phản ứng với kháng huyết thanh được lấy từ động vật bị phơi nhiễm virus cúm có phân tử HA kiểu hoang, dẫn tới khả năng phản ứng với các kháng huyết thanh được tăng lên. Theo một phương án khác của sáng chế, virus đối chứng bao gồm phân tử ngưng kết tổ hồng cầu (HA) của virus cúm có axit amin asparagin ở vị trí tương ứng với vị trí 223 ở phân tử HA thuộc phân nhóm H5 của virus cúm phân nhóm H5, và phân tử HA không có nguồn gốc từ chủng virus phân nhóm H5 ở người được phân lập A/HK/213/03 và việc đưa asparagin vào vị trí 223 dẫn tới việc làm tăng khả năng phản ứng với kháng huyết thanh được lấy từ động vật bị phơi nhiễm virus. Theo một phương án cụ thể của sáng chế, virus đang nghi ngờ là một chủng virus H5N1 và virus đối chứng là chủng virus H5N1 ở người được phân lập A/HK/213/03, virus đối chứng này có asparagin ở vị trí axit amin 223, dẫn tới việc làm tăng khả năng phản ứng với kháng huyết thanh đặc hiệu với virus H5N1. Theo các khía cạnh khác

nhau của sáng chế, động vật có thể là động vật bất kỳ trong số một số loài động vật, bao gồm chồn sương và người.

Sáng chế cũng đề cập đến các vaccin cúm bao gồm phân tử HA được làm tăng tính kháng nguyên. Theo một phương án cụ thể của sáng chế, virus được sử dụng để sản xuất vaccin là một chủng virus H5N1 ở người được phân lập. Theo một phương án cụ thể hơn của sáng chế, phân tử HA được tạo ra từ chủng virus cúm A/HK/213/03. Theo một phương án khác nữa của sáng chế, phân tử HA thuộc phân nhóm H5 được cải biến để có asparagin ở vị trí 223.

Việc đưa các cải biến vào phân tử HA yêu cầu các kỹ thuật thao tác ở cấp độ kỹ thuật di truyền, như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, và được mô tả chi tiết hơn như dưới đây. Sau khi sản xuất được gen ghi mã phân tử HA, có thể sử dụng một số phương pháp khác nhau, ví dụ, các phương pháp “di truyền ngược”, để đưa phân tử HA được cải biến vào virus cúm, theo đó virus cúm này trở thành virus đối chứng phục vụ cho việc kiểm nghiệm hiệu quả của vaccin, hoặc virus đối chứng chẩn đoán để kiểm soát dịch cúm, bao gồm việc lây truyền virus cúm từ động vật sang người và từ người sang người.

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất các virus cúm tái tổ hợp bao gồm phân tử ngưng kết tố hồng cầu (HA) của virus cúm có ít nhất một sự thay đổi về trình tự axit amin làm cho phân tử HA có tính kháng nguyên cao hơn đối với các kháng thể đặc hiệu với phân tử HA không có các thay đổi này. Sự thay đổi về trình tự axit amin có thể bao gồm sự thay thế hoặc loại bỏ một hoặc nhiều axit amin. Phân tử HA được cải biến này có thể được tạo ra từ virus cúm H5N1 với nền di truyền của virus cúm A. Theo một số phương án của sáng chế, virus cúm A là một chủng virus chủ đạo. Các virus tái tổ hợp bao gồm phân tử HA được cải biến có tính kháng nguyên cao hơn đối với các kháng thể đặc hiệu với phân tử HA không có sự thay đổi về trình tự axit amin có thể được sử dụng làm virus đối chứng chuẩn đoán trong phân tích ức chế ngưng kết tố hồng cầu (HI). Virus tái tổ hợp cũng có thể được bao gồm trong bộ kit phân tích ức chế ngưng kết tố hồng cầu (HI).

Theo các khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các phương pháp sản xuất virus bao gồm phân tử ngưng kết tố hồng cầu (HA). Ví dụ, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất virus bao gồm phân tử ngưng kết tố hồng cầu (HA) của virus

cúm có ít nhất một sự thay đổi về trình tự axit amin làm cho phân tử HA có tính kháng nguyên cao hơn đối với các kháng thể đặc hiệu với các phân tử HA không có các thay đổi này. Phương pháp này cũng có thể bao gồm bước đưa vật truyền tái tổ hợp biểu hiện phân tử HA được cải biến vào hệ kỹ thuật di truyền ngược. Phương pháp sản xuất virus cúm có phân tử ngưng kết tổ hồng cầu (HA) có thể bao gồm bước nuôi cấy hệ kỹ thuật di truyền ngược, trong đó ADN ghi phân tử HA sẽ ghi mã sự thay thế axit amin ở vị trí liên kết thụ thể, sự thay thế này làm cho phân tử HA có tính kháng nguyên cao hơn đối với các kháng thể đặc hiệu với phân tử HA không có sự thay thế axit amin ở vị trí liên kết thụ thể này, và sự thay thế này được thực hiện bằng quy trình kỹ thuật di truyền ngược.

Sáng chế cũng đề cập đến các phương pháp sản xuất các axit nucleic ghi mã phân tử ngưng kết tổ hồng cầu (HA). Phân tử HA có thể có ít nhất một sự thay đổi về trình tự axit amin làm cho phân tử HA có tính kháng nguyên cao hơn đối với các kháng thể đặc hiệu với các phân tử HA không có các thay đổi này. Theo một số phương án của sáng chế, phương pháp này bao gồm bước đưa trình tự nucleotit vào trong axit nucleic ghi mã phân tử HA chưa có sự thay thế axit amin ở vị trí liên kết thụ thể, điều này dẫn tới sự thay thế axit amin ở trình tự của phân tử HA làm cho phân tử HA có tính kháng nguyên cao hơn đối với các kháng thể đặc hiệu với phân tử HA không có sự thay thế axit amin.

Các định nghĩa

Thuật ngữ “virus cúm” như được sử dụng ở đây được dùng để chỉ một loài virus mà các chủng gây bệnh của nó gây ra căn bệnh đã được biết là bệnh cúm (tên tiếng Anh là influenza hoặc flu).

Thuật ngữ “chủng virus chủ đạo” được dùng để chỉ một chủng virus được sử dụng trong sản xuất các chủng virus được làm giảm độc lực hoặc sinh trưởng nhanh để sản xuất vaccin. Thông thường, các chủng virus chủ đạo đóng góp sáu đoạn gen vào virus vaccin (PB1, PB2, PA, NP, NA, M và NS). Chủng virus chủ đạo cũng có thể được sử dụng làm thành phần của vaccin, bao gồm chủng virus A/PR/8/34.

Thuật ngữ “polypeptit” được dùng để chỉ một polyme của các axit amin và không được dùng để chỉ độ dài nhất định của sản phẩm; do đó, peptit, oligopeptit và

protein được bao gồm trong phạm vi định nghĩa về polypeptit này. Thuật ngữ này cũng không được dùng để chỉ, hay để loại trừ, các cải biến polypeptit sau dịch mã, ví dụ như glycosyl hóa, axetyl hóa, phosphoryl hóa và các cải biến tương tự.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “lây nhiễm” được dùng để chỉ khả năng một virus sao chép trong tế bào và tạo ra các hạt virus. Mức độ lây nhiễm có thể được đánh giá hoặc bằng việc phát hiện virus, tức là, lượng virus có trong cơ thể (viral load), hoặc bằng việc theo dõi diễn biến bệnh ở động vật.

Các thuật ngữ “cá nhân” hay “đối tượng” hay “động vật”, như được sử dụng ở đây, được dùng để chỉ các động vật có xương sống dễ bị nhiễm virus có dạng ARN đơn sợi âm tính, đặc biệt là nhiễm virus cúm, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các loài chim (ví dụ, chim nước và gà) và các loài động vật có vú, ví dụ, chó, mèo, chó sói, chồn, bộ gặm nhấm (thỏ, chuột,...v.v), ngựa, bò, cừu, dê, các loài lợn, và động vật linh trưởng bao gồm con người. Theo một phương án cụ thể của sáng chế, đối tượng là chồn sương – loài động vật điển hình cho việc nghiên cứu bệnh cúm. Theo một phương án khác, đối tượng là con người.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “sinh miễn dịch” có nghĩa là virus hoặc polypeptit có khả năng kích thích đáp ứng miễn dịch tế bào hoặc thể dịch, ưu tiên là cả hai. Thực thể sinh miễn dịch cũng có tính kháng nguyên. Chế phẩm sinh miễn dịch là chế phẩm kích thích đáp ứng miễn dịch tế bào hoặc thể dịch, hoặc cả hai, khi được cấp cho động vật.

Một phân tử có “tính kháng nguyên” khi nó có khả năng phản ứng đặc hiệu với một phân tử nhận dạng kháng nguyên của hệ miễn dịch, ví dụ như globulin miễn dịch (kháng thể) hoặc thụ thể kháng nguyên ở tế bào T. Một polypeptit có tính kháng nguyên chứa epitop bao gồm ít nhất 5, và ưu tiên là ít nhất 10 axit amin. Phân kháng nguyên của một polypeptit, cũng được gọi ở đây là “epitop”, có thể là phần có tính sinh miễn dịch trội (immunodominant) đặc hiệu với nhận dạng của kháng thể hoặc thụ thể của tế bào T, hoặc nó có thể là phần được sử dụng để tạo ra kháng thể kháng phân tử này bằng việc liên hợp phân kháng nguyên với polypeptit chất mang (carrier polypeptide) để sinh ra sự miễn dịch. Phân tử có tính kháng nguyên thì bản thân nó không cần sinh miễn dịch, tức là, có khả năng kích thích đáp ứng miễn dịch mà không có chất mang.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “sự thay thế axit amin” được dùng để chỉ sự có mặt của một axit amin ở một vị trí cụ thể trong trình tự axit amin của phân tử đó. Sự thay thế axit amin xảy ra đối với axit amin bất kỳ mà có thể chiếm vị trí đó. Polypeptit thu được từ sự thay đổi về trình tự axit amin có thể bao gồm các thay đổi về các cải biến sau dịch mã ví dụ như glycosyl hóa, axetyl hóa hoặc cải biến về axit amin bất kỳ khác, cũng như sự thay thế axit amin.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “hệ kỹ thuật di truyền ngược” được dùng để chỉ các phương pháp tạo ra các hạt virus, polypeptit, virion hoặc các axit nucleic bằng các kỹ thuật di truyền ngược. Các phương pháp này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở “hệ plasmit” như được mô tả bởi Hoffmann (Hoffmann et al., Vaccine 2002, 20:3165; Đơn sáng chế Mỹ có số công bố 2002/0164770A1, 7 November 2002, được bao gồm toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn). Nhìn chung, các hệ kỹ thuật di truyền ngược cho phép tạo ra các hạt virus, polypeptit và/hoặc axit nucleic có các trình tự đặc trưng bằng các kỹ thuật di truyền ngược là đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các hệ này được mô tả chi tiết hơn như dưới đây.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “vị trí liên kết thụ thể” được dùng để chỉ phần của phân tử HA mà tại đó thụ thể đặc hiệu, ví dụ như thụ thể axit sialic trên tế bào hồng cầu sẽ liên kết với. Cấu tạo của phân tử HA thuộc phân nhóm H5 của chủng virus A/duck/Singapore, và vị trí liên kết thụ thể của phân tử ngưng kết tố hồng cầu (HA) thuộc phân nhóm H5 là đã biết và đã được bộc lộ (Ha et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2001 98:11181). Mô hình phân tử của phân tử HA thuộc phân nhóm H5 này, bao gồm cả vị trí liên kết thụ thể, được thể hiện ở FIG. 3.

Thuật ngữ “virus đối chứng chẩn đoán” được dùng để chỉ virus được làm tăng tính kháng nguyên. Virus đối chứng chẩn đoán này có thể được sử dụng trong phân tích miễn dịch, ví dụ, phân tích ức chế ngưng kết tố hồng cầu.

Thuật ngữ “vi rút phơi nhiễm” được dùng để chỉ virus mà một cá thể động vật bị phơi nhiễm virus này. Sự phơi nhiễm này có thể trong quá trình hoạt động hàng ngày, ví dụ như tiếp xúc với đối tượng bị nhiễm, ví dụ, dẫn tới sự phơi nhiễm của người với virus cúm lây nhiễm. Sự phơi nhiễm này cũng có thể do một mục đích lâm sàng cụ thể, ví dụ trong phân tích trong phòng thí nghiệm, trong đó, động vật thí nghiệm như

chôn sương được cho phơi nhiễm virut có chủ đích. Rõ ràng, sự phơi nhiễm này có thể được tạo ra thông qua sự tạo miễn dịch bằng vacxin cúm.

Thuật ngữ “dược dụng” được sử dụng để chỉ các thực thể phân tử và chế phẩm để dung nạp sinh lý học và thông thường không gây ra sự dị ứng hoặc phản ứng bất lợi tương tự, ví dụ như, rối loạn dạ dày, chóng mặt và các triệu chứng tương tự, khi được dùng cho con người. Ưu tiên là, như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “dược dụng” có nghĩa là được chấp thuận bởi một cơ quan pháp chế của liên bang hoặc chính quyền bang ở Mỹ như được liệt kê trong dược điển Mỹ hoặc các dược điển được công nhận một cách rộng rãi khác để được phép sử dụng cho động vật, và ưu tiên hơn nữa là cho người.

Thuật ngữ “chất mang” được dùng để chỉ chất pha loãng, chất hỗ trợ, tá dược, hoặc môi trường mang mà hợp chất được cấp cùng với các chất này. Các chất mang dược dụng có thể là các chất lỏng vô trùng, như nước và dầu, bao gồm các chất từ dầu mỏ, động vật, thực vật hoặc được tổng hợp, ví dụ như dầu lạc, dầu đậu nành, dầu khoáng, dầu vừng và các chất tương tự. Ưu tiên là, nước hoặc dung dịch nước, dung dịch nước muối, dung dịch dextroza và dung dịch glyxerol được sử dụng làm chất mang, cụ thể là cho các chế phẩm dung dịch tiêm truyền. Các chất mang dược dụng thích hợp được mô tả trong tài liệu "*Remington's Pharmaceutical Sciences*" by E. W. Martin, 18th Edition.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “chất hỗ trợ” được dùng để chỉ một hợp chất hoặc hỗn hợp tăng cường đáp ứng miễn dịch đối với kháng nguyên. Chất hỗ trợ có thể hoạt động với chức năng như là một kho mô giải phóng từ từ kháng nguyên và đồng thời là chất kích hoạt hệ thống bạch huyết giúp tăng cường, một cách không đặc hiệu, đáp ứng miễn dịch (Hood, et al., Immunology, Second Ed., Menlo Park, CA: Benjamin/Cummings, 1984. p. 384). Thông thường, sự xâm nhập của chỉ riêng kháng nguyên, không có chất hỗ trợ, sẽ không kích thích được đáp ứng miễn dịch tế bào hoặc thể dịch. Các chất hỗ trợ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chất hỗ trợ Freund hoàn chỉnh, chất hỗ trợ Freund không hoàn chỉnh, saponin, các gel khoáng ví dụ như nhôm hydroxit, các chất hoạt động bề mặt như lysolexithin, các rượu polyhydric pluronic, các polyanion, các peptit, dầu hoặc nhũ hydrocacbon, các hemoxyanin của con hà hình lỗ khóa, và các chất hỗ trợ có tiềm năng sử dụng cho người ví dụ như N-axetyl-muramyl-L-threonyl-D-isoglutamin (thr-MDP), N-axetyl-nor-muramyl-L-

alanyl-D-isoglutamin, N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-L-alanin-2-(r-2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3-hydroxyphosphoryloxy)-etylamin, BCG (*bacille Calmette-Guerin*) và *Corynebacterium parvum*. Ưu tiên là, chất bổ trợ là chất được dùng.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “được phân lập” được dùng để chỉ đối tượng được nói đến được lấy ra khỏi môi trường tự nhiên của nó, ví dụ, tế bào hoặc virus. Do đó, một sinh phẩm được phân lập có thể không có một số hoặc toàn bộ các thành phần của tế bào, tức là, các thành phần của tế bào mà trong đó các chất vốn có xuất hiện một cách tự nhiên (ví dụ như, thành phần bào chất hoặc thành phần màng tế bào). Sinh phẩm được coi là được phân lập nếu nó có mặt trong dịch chiết hoặc dịch nổi bên trên của tế bào. Trong trường hợp các phân tử axit nucleic, axit nucleic được phân lập bao gồm sản phẩm PCR (Polymerase Chain Reaction = phản ứng dây chuyền được xúc tác bởi polymeraza), mRNA được phân lập, cADN, hoặc đoạn giới hạn. Theo một phương án khác của sáng chế, ưu tiên là, axit nucleic được phân lập được cắt từ nhiễm sắc thể chứa axit nucleic này, và ưu tiên hơn là, axit này không nối với hoặc không gắn với các vùng không ghi mã (nhưng có thể nối với vùng hoặc phân điều tiết tự nhiên của nó), hoặc với các gen khác, nằm ở phía trên hoặc phía dưới của gen được chứa bởi phân tử axit nucleic được phân lập này khi được tìm thấy trong nhiễm sắc thể. Theo một phương án khác của sáng chế, axit nucleic được phân lập thiếu một hoặc nhiều intron. Các phân tử axit nucleic được phân lập bao gồm các trình tự được chèn vào plasmid, cosmid, nhiễm sắc thể nhân tạo và các chất tương tự, tức là, nó tạo ra một phần của cấu trúc axit nucleic tái tổ hợp khả năng. Do đó, theo một phương án cụ thể của sáng chế, axit nucleic tái tổ hợp là axit nucleic được phân lập. Protein được phân lập có thể được kết hợp trong tế bào với các protein hoặc axit nucleic khác, hoặc cả hai, hoặc với màng tế bào nếu nó là protein kết hợp với màng tế bào. Cơ quan tế bào, tế bào, hoặc mô được phân lập được lấy ra khỏi vị trí giải phẫu vốn dĩ của nó trong sinh vật. Sinh phẩm được phân lập có thể được, nhưng không nhất thiết phải được, tinh chế.

Thuật ngữ “được tinh chế” như được sử dụng ở đây được dùng để chỉ sinh phẩm được phân lập trong các điều kiện làm giảm hoặc loại bỏ được các chất không mong muốn, tức là, các chất gây bẩn, bao gồm các chất tự nhiên mà sinh phẩm được thu được từ đó. Ví dụ, virion được tinh chế tốt hơn là hầu như không có các thành phần của tế bào chủ hoặc môi trường nuôi cấy, bao gồm môi trường nuôi cấy mô hoặc các protein trứng, các mầm bệnh không đặc hiệu hoặc các chất tương tự. Như được sử dụng

ở đây, thuật ngữ “hầu như không có” được sử dụng mang tính thực tế, xét theo kết quả phân tích sinh phẩm này. Tốt hơn là, sinh phẩm được tinh chế hầu như không có chất gây bẩn có độ tinh khiết ít nhất 50%; tốt hơn nữa là, có độ tinh khiết ít nhất 90%, và đặc biệt tốt hơn là, có độ tinh khiết ít nhất 99%. Độ tinh khiết có thể được đánh giá bằng các kỹ thuật sắc ký, điện di gel, phân tích miễn dịch, phân tích thành phần, phân tích sinh học, và các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Các phương pháp tinh chế là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các hạt virus có thể được tinh chế bằng kỹ thuật siêu lọc hoặc ly tâm tốc độ cao, tốt hơn là bằng kỹ thuật ly tâm liên tục (tham khảo tài liệu Furminger, trên đây). Các phương pháp tinh chế khác cũng có thể được áp dụng và trừ tính theo sáng chế. Sinh phẩm tinh khiết có thể bao gồm các thành phần tế bào, môi trường, protein, hoặc các thành phần hoặc tạp chất không mong muốn khác (như theo yêu cầu trong từng trường hợp cụ thể) với lượng nhỏ hơn khoảng 50%, tốt hơn là nhỏ hơn khoảng 75%, tốt nhất là nhỏ hơn khoảng 90%, các chất này là các chất thường kết hợp với sinh phẩm mong muốn. Thuật ngữ “về cơ bản là tinh khiết” được dùng để chỉ mức độ tinh khiết cao nhất có thể đạt được bằng cách sử dụng các kỹ thuật tinh chế thông dụng đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Theo một phương án cụ thể của sáng chế, thuật ngữ “khoảng” hoặc “xấp xỉ” được dùng để chỉ khoảng có nghĩa về mặt thống kê của một giá trị. Khoảng này có thể nằm trong khoảng biên độ dao động của nó, tốt hơn là nằm trong khoảng 50%, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng 20%, đặc biệt tốt hơn là 10%, đặc biệt tốt hơn nữa là 5% của giá trị hoặc khoảng đã cho. Biên độ dao động cho phép được bao hàm bởi thuật ngữ “khoảng” hoặc “xấp xỉ” tùy thuộc vào hệ cụ thể đang được nghiên cứu, và ý nghĩa của các từ này là rõ ràng đối với các chuyên gia có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Ngưng kết tố hồng cầu

Ngưng kết tố hồng cầu (HA) là glycoprotein chính ở vỏ của các virus cúm A và B. Hemagglutinin-esteraza (HE) của các virus cúm C là chất tương tự với HA ở các virus này. Các phân nhóm mới của các phân tử HA, thông thường có ở các virus cúm ở các loài chim nước, được biết đến là các nguồn virus cúm tự nhiên, dẫn tới các đại dịch cúm (tham khảo tài liệu Suzuki và Nei, Mol. Biol. Evol. 2002; 19(4): 501-509).

HA bao gồm hai chuỗi polypeptit, HA1 và HA2, được ghi mã bởi một gen đơn và được tạo ra từ quá trình thủy phân protein của phân tử tiền chất đơn, bao gồm việc mất đi một peptit tín hiệu (Suzuki và Nei, trên đây; Air, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1981; 78(12): 7639-7643). HA1 có khoảng 320 axit amin và là protein liên kết thụ thể và là đích chính của các đáp ứng miễn dịch. HA2 có khoảng 220 axit amin, và là phần tạo ra mấu gắn vào vỏ virus (Suzuki và Nei, trên đây).

Các phân tử HA từ các virus cúm A được phân loại vào 16 phân nhóm theo các tính chất kháng nguyên của chúng. Các phân tử HA của virus cúm B và C không được phân loại thành các phân nhóm. Các trình tự của các phân nhóm cúm từ H1 đến H15, và phân tử HA của virus cúm B và C (HE) đã được thể hiện ở FIG. 1 của tài liệu Suzuki và Nei, được bao gồm vào đây bằng cách viện dẫn. So sánh trình tự của phân nhóm HA của các virus cúm A: H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, và H12, bao gồm các gốc axit amin được bảo toàn từ tất cả 12 phân nhóm là được trình bày ở FIG. 1 của tài liệu Air, trên đây, được bao gồm vào đây bằng cách viện dẫn. Cả hai tài liệu tham khảo đều bộc lộ các chủng virus mà từ các chủng virus này thu được các trình tự trên đây.

Các phân tử HA theo sáng chế được tạo ra bằng cách đưa các thay đổi về trình tự axit amin vào dẫn tới việc làm tăng tính kháng nguyên. Việc phân lập các axit nucleic ghi mã phân tử HA là thông dụng (tham khảo tài liệu Air, trên đây), và cải biến axit nucleic được thực hiện để đưa các thay đổi về trình tự axit amin vào, ví dụ, bằng kỹ thuật đột biến gen định hướng vị trí (site-directed mutagenesis).

Theo một phương án khác của sáng chế, các phân tử HA từ một chủng virus thuộc một phân nhóm HA cụ thể đã bao gồm trình tự axit amin làm tăng tính kháng nguyên so với các phân tử HA thuộc cùng phân nhóm nhưng khác chủng, như được nêu ví dụ ở đây về chủng virus A/HK/213/03, ví dụ, so với chủng virus A/Vietnam/1203/04. Trong trường hợp này, chủng virus có phân tử HA có tính kháng nguyên cao hơn có thể được sử dụng làm chủng virus đối chứng chuẩn đoán. Theo một phương án khác của sáng chế, các gốc axit amin của phân tử HA có tính kháng nguyên cao hơn có thể được đưa vào hoặc được thay thế vào trình tự của phân tử HA có tính kháng nguyên kém hơn để làm cho nó trở thành phân tử HA được làm tăng tính kháng nguyên.

Các thay đổi về trình tự của phân tử HA có thể dẫn tới việc tính kháng nguyên được tăng lên. Như được mô tả trên đây, chuỗi HA1, là vùng liên kết thụ thể và là đích chính của đáp ứng miễn dịch, là chuỗi mà các thay đổi về trình tự này có thể được tiến hành trên đó. Các thay đổi này có thể làm tăng ái lực liên kết kháng thể của phân tử HA, ví dụ, bằng việc loại bỏ vị trí glycosyl hóa mà vị trí này tạo ra một epitop, hoặc bằng cách tạo thuận lợi cho cấu dạng có ái lực liên kết kháng thể được tăng cường. Theo cách khác, sự thay đổi này có thể dẫn tới việc làm giảm khả năng liên kết với thụ thể HA, ví dụ thụ thể axit sialic trên tế bào hồng cầu, làm cho các kháng thể đặc hiệu với phân tử HA trở thành các chất cạnh tranh hiệu quả hơn đối với phản ứng ngưng kết tổ hồng cầu. Các phân tích miễn dịch khác nhau có khả năng chứng minh các thay đổi này, bao gồm phân tích ức chế ngưng kết tổ hồng cầu (HI), đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Phân tích HI sử dụng các hạt virus cúm hoàn chỉnh, cũng như các vacxin theo sáng chế. Do đó, sáng chế đề xuất các virus cúm có phân tử HA được làm tăng tính kháng nguyên. Thuận tiện nhất, các virus này được tạo ra thông qua kỹ thuật “di truyền ngược”, mặc dù cũng có thể sử dụng các kỹ thuật tái sắp xếp cấu trúc thông dụng.

Các phương pháp kỹ thuật di truyền ngược

Các hệ kỹ thuật di truyền ngược được phát triển những năm gần đây đã cho phép việc thao tác trên bộ gen virus cúm (Palese et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996, 93:11354; Neumann and Kawaoka, Adv. Virus Res. 1999, 53:265; Neumann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999, 96:9345; Fodor et al., J. Virol. 1999, 73:9679; Đơn sáng chế Mỹ có số công bố 20040029251). Ví dụ, đã thấy rằng, sự biểu hiện (được chi phối bởi plasmid) của tám ARN của virus cúm đi từ gen khởi đầu đặc hiệu với ARN polymeraza I (pol I promoter) và tất cả các ARN thông tin đi từ gen khởi đầu đặc hiệu với ARN polymeraza III (pol III promoter) dẫn tới sự hình thành virus cúm A gây lây nhiễm (Hoffmann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2000, 97:6108; đơn sáng chế Mỹ có số công bố 20020164770, được bao gồm vào đây bằng cách viện dẫn để mô tả hệ kỹ thuật di truyền ngược tối thiểu trên plasmid, và để mô tả các phương pháp kỹ thuật di truyền). Các phương pháp tái tổ hợp này cho phép sản xuất đặc hiệu các chủng virus có các thay đổi đặc hiệu về trình tự axit amin của polypeptit. Phân tử HA có sự thay thế theo mong muốn có thể là một phần của virus cúm tái tổ hợp. Virus cúm tái tổ hợp có thể được sản xuất bằng phương pháp bất kỳ đã biết đối với chuyên gia trong

lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm kỹ thuật di truyền như hệ “chỉ plasmid” (plasmid only) (Hoffmann et al., Vaccine 2002, 20:3165). Virut cúm tái tổ hợp có thể được tạo ra từ virut H5N1. Virut cúm tái tổ hợp có thể có nền gen của virut cúm phân nhóm H1N1 được sử dụng trong việc phát triển vaccin mới như chủng virut A/PR/8/34 hoặc virut cúm A bất kỳ, bao gồm các chủng đã thích nghi lạnh như A/Leningrad/134/17/57, A/Leningrad/134/47/57 và A/Ann Arbor/6/60. Axit nucleic tương ứng với trình tự phân tử HA có thể được phân lập từ virut và được phân tích trình tự.

Các kỹ thuật phân lập và cải biến các axit nucleic và protein đặc hiệu là đã biết rõ đối với các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này. Theo sáng chế, có thể ứng dụng các kỹ thuật ADN tái tổ hợp, vi sinh, sinh học phân tử thông dụng trong phạm vi lĩnh vực kỹ thuật này. Các kỹ thuật này được mô tả đầy đủ trong các tài liệu của lĩnh vực kỹ thuật này. Tham khảo, ví dụ, các tài liệu Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 (ở đây gọi tắt là "Sambrook et al., 1989"); *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volumes I and II (D.N. Glover ed. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait ed. 1984); *Nucleic Acid Hybridization* [B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1985)]; *Transcription And Translation* [B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984)]; *Animal Cell Culture* [R.I. Freshney, ed. (1986)]; *Immobilized Cells And Enzymes* [IRL Press, (1986)]; B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); Ausubel, F.M. et al., (eds.). *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., 1994. Các kỹ thuật này bao gồm kỹ thuật đột biến gen định hướng vị trí sử dụng các oligonucleotit có các nucleotit được thay đổi để tạo ra các sản phẩm PCR có đột biến gen (ví dụ, bộ kit "Quikchange" do Stratagene sản xuất).

Phân tích miễn dịch

Các phương pháp khác nhau đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này được sử dụng để xác định khả năng liên kết đặc hiệu miễn dịch của kháng thể với kháng nguyên có thể được sử dụng để xác định mức độ liên kết và tính kháng nguyên được làm tăng theo sáng chế. Phương pháp trước đây xác định tương tác giữa kháng nguyên và kháng thể bao gồm bước phát hiện và phân tích phức chất tạo thành do kết tủa trong gel. Phương pháp khác xác định cặp liên kết kháng thể phát hiện – chất phân tích bao gồm bước sử dụng các kháng thể phát hiện được đánh dấu bằng đồng vị iot phóng xạ (radioiodinated

detector antibody) hoặc protein được đánh dấu bằng đồng vị iot phóng xạ (radioiodinated protein) mà dễ phản ứng với IgG, ví dụ như Protein A. Các phương pháp này đã được biết rõ đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này, như được tổng kết trong tài liệu *Methods in Enzymology* 1980, 70:166-198.

Các phương pháp sau này được sử dụng để xác định sự có mặt của chất phân tích trong mẫu sử dụng chỉ một kháng thể bao gồm các phân tích liên kết cạnh tranh. Trong kỹ thuật này, kháng thể, thường sẽ được giữ cố định lên nền rắn, sẽ được phơi nhiễm với mẫu bị nghi ngờ là có chất cần phân tích cùng với một lượng đã biết của chất phân tích được đánh dấu. Hai chất phân tích, chất phân tích được đánh dấu và chất phân tích có trong mẫu, sẽ cạnh tranh với nhau để liên kết với các vị trí liên kết trên kháng thể. Hoặc phân chất phân tích được đánh dấu đã liên kết với kháng thể hoặc phân chất phân tích được đánh dấu chưa liên kết với kháng thể sẽ được đem xác định và từ kết quả xác định được này, sẽ tính toán được lượng chất phân tích cạnh tranh có trong mẫu. Phương pháp này được mô tả chi tiết hơn trong tài liệu "*Basic Principles of Antigen-Antibody Reaction*" (Labat, *Methods in Enzymology*, 70, 3-70, 1980). Ở ví dụ này, chất phân tích được đánh dấu có thể được đánh dấu hoặc bằng đồng vị phóng xạ hoặc bằng enzym đánh dấu.

Các phân tích miễn dịch gần đây hơn sử dụng phương pháp kháng thể kẹp để xác định sự có mặt của một chất phân tích. Các kỹ thuật này cũng được tổng kết trong tài liệu tham khảo trên đây: *Methods in Enzymology*. Do đó, theo một phương án của sáng chế, sự có mặt của các kháng nguyên đánh dấu riêng rẽ được xác định bằng cách sử dụng cặp kháng thể đặc hiệu với từng kháng nguyên đánh dấu cần phát hiện. Một kháng thể trong cặp kháng thể này được mô tả ở đây đóng vai trò "kháng thể phát hiện" (detector antibody) và kháng thể kia đóng vai trò "kháng thể bắt" (capture antibody). Do đó, theo một phương án, sáng chế đề xuất việc sử dụng phương pháp kháng thể kẹp kẹp giữa (double antibody sandwich method) để phân tích chất phân tích ở mẫu sinh phẩm thể dịch. Theo phương pháp này, chất phân tích được kẹp giữa kháng thể phát hiện và kháng thể bắt, kháng thể bắt được cố định không thể thay đổi được lên trên nền rắn. Kháng thể phát hiện sẽ chứa một chất đánh dấu có thể phát hiện được, nhằm xác định sự có mặt của liên kết kẹp giữa kháng thể-chất phân tích-kháng thể và do đó xác định được sự có mặt của chất phân tích.

Các dạng nền rắn thông dụng trước đây bao gồm khay, ống hoặc hạt polystyren, tất cả các nền rắn này đều đã biết rõ trong lĩnh vực phân tích miễn dịch phóng xạ và phân tích miễn dịch enzym. Gần đây, một số vật liệu xốp như ni lông, nitroxenluloza, xenluloza axetat, sợi thủy tinh và các polyme xốp khác đã được ứng dụng làm nền rắn.

Các kỹ thuật khác nhau và các thiết bị cảm biến phát hiện tương ứng cũng có thể được sử dụng. Các thiết bị phân tích tự động bao gồm thiết bị phân tích ngẫu nhiên/liên tục. Các ví dụ về các hệ thống thiết bị này bao gồm hệ thống OPUS™ của hãng PB Diagnostic System, Inc. và thiết bị IMX™ Analyzer của hãng Abbott Laboratories of North Chicago, III. Các thiết bị phân tích tự động của hãng PB Diagnostic Systems, Inc. đã được mô tả trong các patent Mỹ số 5,051,237; 5,138,868; 5,141,871 và 5,147,609.

Các nhóm hệ thống thiết bị phân tích hóa miễn dịch khác, có thể được sử dụng trong việc áp dụng sáng chế, bao gồm các hệ thống thiết bị phân tích miễn dịch cảm biến quang (optical immunosensor system). Nhìn chung, thiết bị phân tích miễn dịch cảm biến quang là thiết bị sử dụng các nguyên lý quang học để chuyển một cách định lượng các nồng độ hoặc hoạt tính hóa học hoặc sinh hóa quan tâm thành các tín hiệu điện. Các hệ thống thiết bị này có thể được phân loại thành bốn nhóm chính: các kỹ thuật phản xạ; các kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt (surface plasmon resonance); các kỹ thuật sợi quang (fiber optic technique) và các thiết bị quang tích hợp (integrated optic device). Các kỹ thuật phản xạ bao gồm kỹ thuật đo phân cực elip ánh sáng (ellipsometry), phổ phản xạ tích hợp nhiều lần (multiple integral reflection spectroscopy), và các thiết bị nhồi mao quản huỳnh quang (fluorescent capillary fill device). Các kỹ thuật sợi quang bao gồm huỳnh quang trường giảm dần (evanescent field fluorescence), ống mao quản sợi quang (optical fiber capillary tube), và các cảm biến huỳnh quang sợi quang (fiber optic fluorescence sensor). Các thiết bị quang tích hợp bao gồm huỳnh quang trường giảm dần phẳng (planer evanescent field fluorescence), cảm biến miễn dịch nối phân loại đầu vào (input grading coupler immunosensor), giao thoa kế Mach-Zehnder (Mach-Zehnder interferometer), giao thoa kế Hartman (Hartman interferometer) và các cảm biến giao thoa khác nhau. Việc phát hiện các phản ứng liên kết theo nguyên lý chụp giao thoa laze (holographic) là sự phát hiện toàn diện bằng hình ảnh chụp giao thoa laze thu được ở một vị trí cần chụp định

trước khi một chất phản ứng của cặp liên kết liên kết với một chất phản ứng thứ hai được cố định của cặp liên kết (tham khảo patent Mỹ số 5,352,582, cấp ngày 04/10/1994 cho Lichtenwalter et al.). Các ví dụ về các cảm biến quang miễn dịch (optical immunosensors) đã được mô tả tổng quát trong tài liệu tổng kết của G. A. Robins, *Advances in Biosensors* 1991, 1:229-256. Các thiết bị này được mô tả cụ thể hơn, ví dụ, trong các patent Mỹ số 4,810,658; 4,978,503; và 5,186,897; trong các tài liệu R. A. Brady et al. (Phil. Trans. R. Soc. Land. B. 1987, 316:143-160) và G. A. Robinson et al. (in *Sensors and Actuators*, Elsevier 1992).

Các phân tích huyết thanh học được sử dụng một cách rộng rãi trong việc xác định chuẩn đoán cúm cũng như trong các nghiên cứu về dịch tễ học và về tính kháng nguyên của các chủng virus. Cụ thể là, phân tích ức chế ngưng kết tổ hồng cầu (HI) được sử dụng một cách rộng rãi do các yêu cầu tối thiểu về phòng thí nghiệm cũng như tính dễ áp dụng của nó. Đã trù tính là, sáng chế sẽ cải thiện khả năng ứng dụng của phân tích HI bằng việc làm tăng độ nhạy của phân tích này. Phân tích HI cũng có thể được sử dụng để xác định tính kháng nguyên của phân tử HA được cải biến, và hỗ trợ việc xác định xem phân tử HA được cải biến có tính kháng nguyên cao hơn hay thấp hơn so với các phân tử không được cải biến.

Phân tích HI xác định khả năng của các kháng thể của mẫu huyết thanh trong việc liên kết với chất đối chứng chuẩn hóa. Trong phân tích HI, các dung dịch pha loãng hàng loạt (các hiệu giá) từ mẫu huyết thanh được trộn với các lượng hồng cầu chuẩn và việc kết hợp của chúng thành các phức chất được xác định bằng mắt thường. Mức thấp nhất của huyết thanh được hiệu giá, mà tại giá trị đó, phức chất tạo thành có thể quan sát được bằng mắt thường, được xác định là kết quả của phân tích.

Như được mô tả trên đây, sáng chế đề xuất việc sản xuất và đánh giá vaccine được cải thiện để điều trị hoặc phòng ngừa lây nhiễm virus cúm. Cụ thể là, sáng chế có thể được áp dụng cho các vaccine được sản xuất bằng cách sử dụng các kỹ thuật di truyền ngược. Đã trù tính là, sáng chế sẽ được áp dụng để đánh giá và kiểm định đáp ứng miễn dịch sau khi chủng ngừa. Cụ thể là, nhưng không chỉ giới hạn ở, sáng chế đề xuất việc làm tăng khả năng phát hiện kháng thể sau khi một cá thể bị phơi nhiễm virus cúm nhờ có tính kháng nguyên được làm tăng của phân tử HA được cải biến. Tính kháng nguyên được làm tăng này thể hiện ở độ nhạy tăng lên của phân tích được sử dụng để phát hiện đáp ứng miễn dịch, ví dụ, phân tích HI.

Phát triển vaccin

Như được nêu ví dụ dưới đây, virus được cải biến chứa phân tử HA được làm tăng tính kháng nguyên có khả năng sinh miễn dịch cao hơn và có tiềm năng sử dụng làm vaccin cao hơn.

Các kỹ thuật tăng cường hiệu quả của vaccin cúm bao gồm việc sử dụng các chất bổ trợ (Wood and Williams, trên đây), đồng sử dụng các phân tử kích thích miễn dịch (Salgaller and Lodge, J. Surg. Oncol. 1998, 68:122) và các kỹ thuật chủng ngừa niêm mạc. Các kỹ thuật tạo miễn dịch niêm mạc bao gồm kỹ thuật bao virus vào các vi nang (các patent Mỹ số 5,075,109, 5,820,883, và 5,853,763) và sử dụng chất mang kiểu màng tăng cường miễn dịch (đơn sáng chế quốc tế có số công bố WO 98/0558). Ngoài ra, khả năng sinh miễn dịch của các chất sinh miễn dịch được dùng qua đường miệng có thể được tăng cường bằng cách sử dụng các tế bào hồng cầu (RBC) hoặc sử dụng các tế bào hồng cầu đã tách bỏ hemoglobin (RBC ghost) (patent Mỹ số 5,643,577), hoặc bằng cách sử dụng kháng nguyên gây triệu chứng lưỡi xanh (blue tongue antigen) (patent Mỹ số 5,690,938). Mặc dù các phương pháp này hứa hẹn sự cải thiện về kỹ thuật chủng ngừa trong tương lai, nhưng việc sử dụng chúng trong các trường hợp cụ thể đòi hỏi phải có sự đánh giá và theo dõi cẩn thận để đảm bảo hiệu quả của vaccin. Đã trù tính là, sáng chế được mô tả ở đây sẽ cải thiện các kỹ thuật này bao gồm việc làm tăng khả năng phát hiện các tác dụng sinh miễn dịch của chúng.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau mô tả các khía cạnh khác nhau của sáng chế, nhưng không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1: Hiệu giá kháng thể của huyết thanh ở chồn sương đã được cho nhiễm virus

Các virus H5N1 có khả năng gây bệnh cao do các phòng thí nghiệm phối hợp của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) ở châu Á cung cấp. Tất cả các phân tích với các virus này được tiến hành ở các phòng thí nghiệm an toàn sinh học cấp độ 3 trở lên (BL3+ facilities) tại bệnh viện St. Jude Children's Research Hospital. Để so sánh khả năng sinh miễn dịch của các virus cúm năm 2003 thuộc genotyp Z, mà sau đó đã trở thành các virus lan truyền chủ yếu năm 2004, với các virus năm 2004, các con chồn

sương đã được cho nhiễm virus H5N1 được phân lập từ một ca nhiễm cúm trầm trọng ở người (A/HK/213/03) (Guan et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2004, 101:8156) và được cho nhiễm bốn chủng virus H5N1 được phân lập từ người, gà và chim ưng năm 2004 (FIG. 1A). Các con chồn sương nhân giống xa đực và cái được lấy từ chương trình nhân giống đặc biệt của Trung tâm Nguồn Động Vật của bệnh viện St. Jude Children's Research Hospital. Các con vật này là từ 3 đến 5 tháng tuổi và có huyết thanh âm tính theo phân tích HI đối với sự phơi nhiễm các virus cúm A đang lan truyền H1N1, H3N2, và H5N1 và các virus cúm B. Các virus này được nhân giống trong khoang niệu nang của trứng gà có phôi 10 ngày tuổi ở nhiệt độ 35°C trong thời gian 48 giờ. Dịch niệu nang được thu hoạch một lần từ trứng gà có phôi được làm lạnh sâu ở nhiệt độ -80°C và được sử dụng cho các phân tích. Các kháng thể có trong huyết thanh được hiệu giá theo phân tích HI sau khi cho nhiễm virus được 28 ngày. Chủng virus A/HK/213/03 gây ra các hiệu giá kháng thể cao hơn (có giá trị nằm trong khoảng từ 1:640 đến 1:1280), trong khi bốn chủng virus năm 2003 gây ra các hiệu giá HI rất thấp (nằm trong khoảng từ 1:20 đến 1:40).

Các hiệu giá HI tương đối thấp đối với các chủng virus H5N1 năm 2004 có thể là do sự ức chế miễn dịch chung gây ra bởi virus. Tuy nhiên, kết quả chủng ngừa bằng các vaccin Δ H5N1- A/PR/8/34 (6+2) có phân tử HA và neuraminidaza từ các chủng virus A/HK/213/03 và A/Vietnam/1203/04 cho thấy là sự khác nhau về phân tử HA thuộc phân nhóm H5 có thể là nhân tố ảnh hưởng chính đến kết quả này (FIG. 1B). Việc chủng ngừa bằng hai liều vaccin Δ H5N1/03 riêng rẽ, mỗi liều 7 μ g đã gây ra các mức kháng thể huyết thanh cao có thể phát hiện được cả trong thực nghiệm HI và thực nghiệm trung hòa virus (FIG. 1B). Sau khi chủng ngừa bằng cùng loại vaccin Δ H5N1/04, các hiệu giá rất thấp (xấp xỉ 1:20) được xác định trong phân tích HI, trong khi đó các hiệu giá trung hòa lại cao hơn nhiều (khoảng một nửa so với khi gây ra bởi Δ H5N1/03). Các nghiên cứu trước đây đã phát hiện ra là, các vaccin bất hoạt được tạo ra từ chủng virus A/duck/Singapore/3/97 (H5N3) gây ra rất ít kháng thể huyết thanh hoặc gây ra ở mức không phát hiện được (Nicholson et al., Lancet 2001, 357:1937; Stephenson et al., Vaccine 2003, 21:1687). Tóm lại, các kết quả này chỉ ra là, một số chủng virus phân lập thuộc phân nhóm H5 có thể có khả năng sinh miễn dịch và/hoặc tính kháng nguyên khác thường. Phân tích các trình tự axit amin của phân tử HA thuộc phân nhóm H5 đã cho thấy là các phân tử HA của các chủng virus A/HK/213/03 và A/Vietnam/1203/04 khác nhau về 10 axit amin ở vùng HA1 (Bảng Ib). Chủng virus

A/Vietnam/1203/04 có vị trí glycosyl hóa tiềm năng tại asparagin N₁₅₄ (N_{*154}-S₁₅₅-T₁₅₆, N-X-S/T, X≠P). Khi so sánh trình tự của các phân tử HA này, đã phát hiện ra rằng, ba axit amin (S₁₂₀, K₁₈₉ và S₂₂₃) có mặt trong tất cả các virus năm 2004 nhưng không có mặt trong chủng virus A/HK/213/03. K₂₁₂ là đặc trưng của chủng virus A/Vietnam/1203/04.

Ví dụ 2: Sản xuất và xác định tính kháng nguyên của các virus ΔH5- A/PR/8/34 tái tổ hợp

Để kiểm tra tác động của các axit amin đã xác định lên khả năng sinh miễn dịch và bảo vệ chống lại sự lây nhiễm virus, hệ kỹ thuật di truyền ngược sử dụng 8 plasmid được sử dụng để sản xuất các virus tái tổ hợp có bảy đoạn gen của chủng virus A/PR/8/34 và đoạn gen ghi mã phân tử HA của chủng virus A/Vietnam/1203/04 bao gồm các đột biến đơn điểm (single point mutation) (Hoffmann et al., Vaccine 2002, 20:3165). Các virus tái tổ hợp, được làm mất tính gây bệnh bằng việc cải biến phân tử HA thuộc phân nhóm H5 ở vị trí phân giải, sẽ được sản xuất bằng kỹ thuật chuyển nhiễm ADN (Hoffmann et al., Vaccine 2002, 20:3165). Các đột biến điểm được chèn vào gen ghi mã HA trong quá trình PCR bằng việc sử dụng bộ kit đột biến gen định hướng vị trí QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (của hãng Stratagene, Cedar Creek, TX, USA) và bộ gen-mồi đặc hiệu cho gen ghi mã HA thuộc phân nhóm H5. Các virus tái sắp xếp cấu trúc chứa gen ghi mã HA hoặc các gen ghi mã HA và neuraminidaza (NA) từ các virus H5N1 trên nền di truyền của chủng virus A/PR/8/34 (H1N1) (tham khảo Bảng 1a đối với các virus được sản xuất cho nghiên cứu này và các tên viết tắt của chúng). Dịch niệu nang được thu hoạch sau 1 lần được lấy từ trứng gà có phôi được làm lạnh sâu ở nhiệt độ -80°C và được sử dụng trong thực nghiệm. Các gen ghi mã HA của các virus tái tổ hợp được sao chép quá mức bằng kỹ thuật RT-PCR (Real-Time Polymerase Chain Reaction – phản ứng dây chuyền xúc tác bởi polymeraza thời gian thực) rồi được phân tích trình tự để kiểm định là chỉ có các đột biến gen định trước. Sự thay đổi axit amin được kiểm định bằng việc phân tích trình tự của đoạn phân tử HA của các virus tái tổ hợp (Bảng 1a).

Để đánh giá tính kháng nguyên và sự đa dạng của các phân tử HA tái tổ hợp, phân tích HI được tiến hành với sáu loại kháng thể đơn dòng kháng HA (Bảng 2). Các kháng thể đơn dòng (mAb) CP24, CP46, CP58, và 406/7 kháng HA của chủng virus

A/chicken/Pennsylvania/1370/83 (H5N3) được sản xuất bởi Phòng Bệnh Truyền Nhiễm của bệnh viện St. Jude Children's Research Hospital. Kháng thể đơn dòng VN04-6 kháng HA của chủng virus A/Vietnam/1203/04 và kháng thể đơn dòng HK03-3 kháng HA của chủng virus A/HK/213/03 được sản xuất bằng cách cải biến theo phương pháp được mô tả bởi Kohler và Milstein (Kaverin et al., Journal of Virology 2004, 78:240; Koher et al., European Journal of Immunology 1976, 6:511). Năm kháng thể đơn dòng phản ứng với virus Δ H5N1/03 ở các mức hiệu giá tương đối cao, nhưng chỉ có 3 kháng thể đơn dòng phản ứng với Δ H5/04 HA. Nhìn chung, khả năng phản ứng của các kháng thể với các chủng virus Δ H5_{S155→N, T156→A}/04, Δ H5_{S120→N}/04 và Δ H5R_{212→K}/04 tương tự với chủng virus Δ H5/04. Các phản ứng của các chủng virus Δ H5_{S120→N, S155→N, T156→A}/04 tương tự với các phản ứng của chủng virus Δ H5N1/03. Bốn kháng thể đơn dòng nhận dạng được Δ H5/04 HA có đột biến S_{223→N} (Δ H5S_{223→N}/04). Đột biến ngược N_{223→S} ở phân tử HA của virus năm 2003 (Δ H5_{N223→S}/03) dẫn tới việc các hiệu giá HI bị giảm đáng kể hoặc mất khả năng được nhận dạng ra bởi các kháng thể đơn dòng.

Ví dụ 3: Các phân tích HI sử dụng các tế bào hồng cầu gà và ngựa

Một kết quả đáng quan tâm khác thu được khi tiến hành phân tích HI sử dụng các tế bào hồng cầu gà và ngựa. Đáng quan tâm là, virus tái tổ hợp Δ H5_{S223→N}/04 có khả năng kém hơn trong việc ngưng kết 1% tế bào hồng cầu ngựa nhưng lại ngưng kết được tế bào hồng cầu gà với hiệu giá cao hơn (1:1024). Không có virus nào trong số các virus tái tổ hợp còn lại khác nhau về phản ứng với các tế bào hồng cầu gà và ngựa trong cùng một phạm vi.

Ví dụ 4: Chủng ngựa cho chồn sương bằng các virus tái tổ hợp đột biến ở phân tử HA thuộc phân nhóm H5

Khả năng sinh miễn dịch và hiệu quả bảo vệ của các vaccin bất hoạt được đánh giá bằng việc chủng ngựa cho các nhóm chồn sương, mỗi nhóm gồm có 3 con, bằng cách tiêm trong cơ bằng các chế phẩm Δ H5N1/04, Δ H5/04, Δ H5_{S155→N, T156→A}/04, Δ H5_{S120→N}/04, và Δ H5_{S223→N}/04 được chuẩn hóa về hàm lượng phân tử HA. Kỹ thuật khuếch tán miễn dịch đơn xuyên tâm (single radial immunodiffusion technique) được sử dụng để chuẩn hóa Δ H5N1/03 (Webby et al., Lancet 2004, 363:1099). Các virus tái

tổ hợp còn lại được tách bằng kỹ thuật điện di gel SDS-polyacrylamit 12%, các gel được nhuộm được phân tích bằng việc đo mật độ (densitometry) trên máy phân tích FUJIFILM Luminescent Image Analyzer LAS-1000plus, và HA được định lượng bằng việc so sánh với chế phẩm protein đối chứng. Sau khi được tiêm 2 liều, mỗi liều 7 μ g HA, từng con vật phân tích được cho nhiễm virus A/Vietnam/1203/04 (H5N1). Các nhóm chồn sương, mỗi nhóm có 3 con này được chủng ngừa bằng việc tiêm trong cơ 250 μ l PBS tiệt trùng chứa 7 μ g HA từ các virus bất hoạt được tinh chế. Các virus vaccine được làm bất hoạt, cô đặc, tinh chế như mô tả (Liu et al., Virology 2003, 314:580; Webby et al., Lancet 2004, 363:1099). Ba con vật đối chứng được tiêm chỉ riêng 250 μ l PBS tiệt trùng. Vào ngày thứ 21 sau khi chủng ngừa, tiến hành lấy huyết thanh rồi tiêm trong cơ liều thứ hai với lượng 7 μ g HA. Hai tuần sau, lại tiến hành lấy huyết thanh, sau đó cho các con vật này nhiễm virus quan tâm.

Các con vật đối chứng và các con vật được chủng ngừa được cho nhiễm qua đường mũi như mô tả trên đây bằng chủng virus A/Vietnam/1203/04 với lượng bằng 10^6 liều gây nhiễm 50% trứng (EID_{50}) (Govorkova et al., Journal of Virology 2005, 79:2191). Các triệu chứng lâm sàng về việc nhiễm cúm, như trọng lượng cơ thể và nhiệt độ được theo dõi hàng ngày trong suốt hai tuần. Các con chồn sương có triệu chứng mắc bệnh nặng sẽ bị giết. Để đánh giá mức độ đáp ứng miễn dịch sau khi nhiễm virus, các nhóm chồn sương khác được cho nhiễm các chủng virus H5N1 ở người và chim được phân lập A/HK/213/03, A/Vietnam/3046/04, A/Vietnam/3062/04, A/chicken/ Vietnam/39/04, và A/falcon/HK/D0028/04 với lượng bằng 10^6 EID_{50} . Tiến hành lấy huyết thanh từ các con vật này vào ngày thứ 28 sau khi cho nhiễm virus. Để xác định hiệu giá virus ở vùng trên của đường hô hấp, các mẫu dịch mũi được lấy bằng cách rửa mũi vào các ngày thứ 3, 5, và thứ 7 (Govorkova et al., Journal of Virology 2005, 79:2191). Virus trong các mẫu này được hiệu giá trong các quả trứng gà có phôi 10 ngày tuổi và được thể hiện theo giá trị $\log_{10}$ EID_{50} trên 0,1mL. Các dịch mũi của các con vật được chủng ngừa có các hiệu giá nằm trong khoảng từ 2,5 đến 4,5 $\log_{10}$ EID_{50} vào ngày thứ 3, và nằm trong khoảng từ 0,5 đến 2,5 $\log_{10}$ EID_{50} vào ngày thứ 5, và nhỏ hơn hoặc bằng 0,25 $\log_{10}$ EID_{50} vào ngày thứ 7 (FIG. 2). Các con chồn sương không được chủng ngừa có giá trị hiệu giá trung bình bằng 4,0 $\log_{10}$ EID_{50} một tuần sau khi nhiễm. Hai trong số ba con chồn sương đối chứng có các triệu chứng mắc bệnh nặng (sụt cân nhiều và bị liệt) và được đem giết không đau đớn, con còn lại thì chết do nhiễm bệnh. Chỉ có một con chồn sương được chủng ngừa là bị phát bệnh nặng. Con

chồn sương này, được chủng ngừa bằng virus $\Delta H5_{S120 \rightarrow N}/04$, có các triệu chứng thần kinh nặng, và được đem giết không đau đớn vào ngày thứ 7 sau khi cho nhiễm virus gây bệnh. Con chồn sương này mắc chứng viêm kết mạc nặng do virus vào ngày thứ 4 sau khi cho nhiễm virus, sau đó bị virus tấn công lên não. Có thể là, virus đã được truyền đến mắt trong quá trình rửa lấy dịch mũi ở ngày thứ 3 và quá trình phát nhiễm theo tế bào thần kinh lên não đã gây ra chứng bệnh viêm não. Các con chồn sương được chủng ngừa còn lại biểu hiện các triệu chứng như lười hoạt động, sụt cân, và bị sốt trong vòng 3 ngày đầu tiên kể từ khi cho nhiễm virus. Các triệu chứng này biến mất vào ngày thứ 5 và tất cả các con vật này hồi phục nhanh chóng. Như vậy, tất cả các virus vaccine được kiểm nghiệm bảo vệ được các con chồn sương khỏi sự tấn công nguy hiểm của chủng virus A/Vietnam/1203/04. Việc chủng ngừa làm giảm hiệu giá virus ở vùng trên của đường hô hấp và giảm thời gian tác động của virus.

Ví dụ 5: Phân tích HI và phân tích trung hòa để kiểm tra khả năng sinh miễn dịch của các virus tái tổ hợp $\Delta H5-A/PR/8/34$

Huyết thanh được lấy từ các con chồn sương được chủng ngừa được kiểm tra khả năng miễn dịch đối với các virus tái tổ hợp bằng các phân tích HI và phân tích trung hòa (xem các Bảng 3 và 4, tương ứng). Huyết thanh được lấy từ các con vật được xử lý qua đêm bằng enzyme phá hủy thụ thể được phân lập từ vi khuẩn gây tả *Vibrio cholerae* (*Vibrio cholerae* receptor-destroying enzyme) (Denka-Seiken, Tokyo, Japan), được làm bất hoạt bằng nhiệt ở nhiệt độ 56°C trong thời gian 30 phút, sau đó được hút hấp thụ bằng hỗn dịch 0,5% của tế bào hồng cầu gà. Các phân tích HI và trung hòa virus chuẩn được tiến hành trong các tế bào MDCK (môi trường nuôi cấy) như được mô tả trên đây (Palmer et al., US Department of Health, Education and Welfare, Immunology series no. 6. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention. 1975; Kida et al., Virology 1982 122:38).

Bốn đơn vị ngưng kết hồng cầu (HAU) của virus được sử dụng trong mỗi phân tích HI và một lượng bằng 100 liều gây nhiễm 50% môi trường nuôi cấy mô tế bào (TCID₅₀) được sử dụng trong từng phân tích trung hòa. Huyết thanh từ các con chồn sương được chủng ngừa bằng virus tái sắp xếp cấu trúc gen đơn kiểu hoang ($\Delta H5/04$, virus đối chứng) có kết quả giá trị hiệu giá HI bằng 1:20. Chủng virus tái tổ hợp có vị trí glycosyl hóa đã bị loại bỏ ($\Delta H5_{S155 \rightarrow N; T156 \rightarrow A}/04$) gây ra hiệu giá HI nằm trong

khoảng từ 1:10 đến 1:20. Thể đột biến $\Delta H5_{HA_{S120 \rightarrow N}/04}$ dẫn tới các hiệu giá HI có giá trị nằm trong khoảng từ 1:20 đến 1:80. Ngược lại, việc chủng ngừa bằng $\Delta H5_{S223 \rightarrow N}/04$ dẫn tới hiệu giá HI có giá trị bằng 1:640, và các huyết thanh khác được kiểm tra phản ứng với chủng virus $\Delta H5_{S223 \rightarrow N}/04$ và thu được hiệu giá có giá trị cao (nằm trong khoảng từ 1:160 đến 1:320). Như vậy, mặc dù việc chủng ngừa mang lại sự miễn dịch bảo vệ, nhưng mức độ kháng thể có thể phát hiện được lại khác nhau.

Tất cả các virus $\Delta H5/04$ đều mang lại các hiệu giá kháng thể trung hòa virus cao sau khi chủng ngừa (nằm trong khoảng từ 1:320 đến 1:1280) (Bảng 4). Không thấy có sự khác biệt đáng kể nào giữa các hiệu giá trung hòa cùng dạng và khác dạng. Do đó, sự khác nhau quan sát được giữa các kháng huyết thanh trong việc nhận dạng phân tử HA không phản ánh được khả năng của các kháng thể trong việc trung hòa virus.

Ví dụ 6: Khả năng phản ứng của các virus tái tổ hợp

Để đánh giá sâu hơn nữa về khả năng phản ứng của các virus tái tổ hợp, các phân tích HI được tiến hành trên huyết thanh gà và chuột được tăng miễn dịch được lấy sau khi chủng ngừa bằng các virus $\Delta H5N1/03$ và A/HK/213/03, các phân tích HI này sử dụng các virus cần kiểm nghiệm là các virus tái tổ hợp có phân tử HA được thay đổi (Bảng 5). Hiệu giá HI trung bình đối với virus $\Delta H5N1/03$ cùng dạng bằng 1:2560. Hiệu giá HI đối với các chủng virus $\Delta H5/04$ bằng 1:160. Hiệu giá HI đối với virus tái tổ hợp $\Delta H5_{S223 \rightarrow N}/04$ bằng ít nhất hai lần giá trị hiệu giá HI đối với các thể đột biến khác.

Để thu được thêm thông tin về vai trò của axit amin ở vị trí 223 đối với khả năng phản ứng huyết thanh học, virus tái tổ hợp được sản xuất, trong đó virus này có phân tử HA thuộc phân nhóm H5 được lấy A/HK/213/03 nhưng có một đột biến điểm duy nhất $N_{223} \rightarrow S$ (Bảng 1a). Virus tái tổ hợp $\Delta H5_{N223 \rightarrow S}/03$ này có giá trị hiệu giá HI ở tế bào hồng cầu gà và ngựa thấp hơn so với virus $\Delta H5N1/03$. Để xác định được mức độ tác động của axit amin 223 lên khả năng nhận dạng kháng nguyên của kháng thể, các virus tái tổ hợp chứa HA kiểu hoang và HA từ A/duck/Singapore/3/97 được đột biến $S_{223} \rightarrow N$ (xem Bảng 1a). Các virus này được kiểm tra bằng phân tích HI đối với một số kháng huyết thanh kháng HA thuộc phân nhóm H5 và đối với một số kháng thể đơn dòng (Bảng 6). Sự thay thế $S_{223} \rightarrow N$ ở phân tử HA làm tăng mạnh hiệu giá HI (lên 4 lần hoặc hơn). Tuy nhiên, đột biến này làm thay đổi không đáng kể khả năng phản ứng của

phân tử HA của chủng virus A/duck/Singapore/3/97, đặc biệt là trong các phản ứng với các kháng thể đơn dòng: cả HA ở dạng gốc và ở dạng đột biến đều không phản ứng với kháng thể đơn dòng HK03-3 và CP46, và cả hai chỉ phản ứng với CP46 với giá trị hiệu giá thấp (Bảng 6). Các kết quả này thể hiện là, sự thay thế $S_{223} \rightarrow N$ ở phân tử HA làm tăng độ nhạy của phân tích HI.

Ví dụ 7: Các virus đối chứng chẩn đoán thế hệ thứ hai được dự đoán là làm tăng độ nhạy của phân tích HI

Như đã chứng minh ở Ví dụ 3 trên đây, bằng việc chuyển axit amin ở vị trí 223 của phân tử HA thuộc phân nhóm H5 thành asparagin thì độ nhạy của phân tích HI sử dụng tế bào hồng cầu gà được tăng lên. Cũng đưa ra được bằng chứng là cơ sở phân tử của ảnh hưởng này là do sự thay đổi tính đặc hiệu với thụ thể. Virus đột biến có độ nhạy tăng lên không làm ngưng kết tế bào hồng cầu ngựa, loại chỉ có liên kết $\alpha 2,3$. Do đó, các thay đổi về axit amin dẫn tới việc không có khả năng ngưng kết tế bào hồng cầu ngựa là các thay đổi có tiềm năng mang lại độ nhạy được tăng lên trong phân tích HI sử dụng tế bào hồng cầu gà. Quan điểm này có thể được áp dụng cho tất cả 16 phân nhóm của HA, đặc biệt là các virus cúm A ở loài chim có tính đặc hiệu liên kết $2,3$.

Các kỹ thuật di truyền ngược cho phép tạo ra các virus tái tổ hợp có các thay đổi nhỏ về cấu trúc kháng nguyên nhưng được “tối ưu hóa” về khả năng nhận dạng của các chất nền tế bào khác nhau. Ưu tiên là, các axit amin (91, từ 130 đến 134, 149, 151, 179, 186, 190-191, từ 220 đến 225 đối với phân tử HA thuộc phân nhóm H5) được đột biến, đây là các vị trí gần hoặc là một phần của vị trí liên kết thụ thể. Plasmid có phân tử HA đột biến gen có thể được tạo cấu trúc và các virus có thể được sản xuất bằng quá trình đồng chuyển nhiễm (cotransfection). Các virus tái tổ hợp có thể được kiểm tra theo các phân tích HA bằng cách sử dụng các tế bào hồng cầu gà và các tế bào hồng cầu ngựa một cách song song. Các virus phân tích làm ngưng kết tế bào hồng cầu gà nhưng không làm ngưng kết tế bào hồng cầu ngựa sẽ được tiếp tục kiểm tra bằng phân tích HI. Trong các phân tích khác, các virus được sản xuất ra lại làm ngưng kết tế bào hồng cầu ngựa mà không làm ngưng kết tế bào hồng cầu ngựa. Việc tổ hợp các virus tiềm năng này có các thay đổi axit amin đơn có thể làm tăng độ nhạy hơn nữa. Dự kiến là, việc đánh giá các virus tiềm năng sẽ phân loại ra được các virus đối chứng chuẩn đoán có khả năng phản ứng đặc hiệu với các thụ thể có liên kết đặc hiệu $2,3$.

Bảng Ia. Các virut tái tổ hợp H5-PR/8/34 được sản xuất để sử dụng trong nghiên cứu của sáng chế

Virut tái tổ hợp	Vị trí axit amin trong HAI											
	36	83	86	120	155	156	189	212	223	263		
A/HK/213/03 ΔH5N1 x PR/8/34	T	A	A	N	N	A	R	K	N	A		
A/Vietnam/1203/04 ΔH5N1 x PR/8/34		K	T	V	S	T	K	R	S	T		
A/Vietnam/1203/04 ΔH5 x PR/8/34		K	T	V	S	T	K	R	S	T		
A/Vietnam/1203/04 ΔH5 _{S155-N} , T156→A x PR/8/34		T	A	V	S	N	A	K	R	S		
A/Vietnam/1203/04 ΔH5 _{S120-N} x PR/8/34		T	A	V	N	S	T	K	R	S		
A/Vietnam/1203/04 ΔH5 _{R212-K} x PR/8/34		T	A	V	S	T	K	K	S	T		
A/Vietnam/1203/04 ΔH5 _{S223-N} x PR/8/34		T	A	A	S	S	T	K	R	N		
A/Vietnam/1203/04 ΔH5 _{S120-N} , S155→N, T156→A x PR/8/34		T	A	A	N	N	A	K	R	S		
A/HK/213/03 ΔH5 _{N223-S} x PR/8/34		T	A	A	N	N	A	R	K	S		
A/duck/Singapore/3/97 H5 x PR/8/34		T	D	V	S	N	A	K	E	S		
A/duck/Singapore/3/97 H5 _{S223-N} x PR/8/34		T	D	V	S	N	A	K	E	N		

*: Δ: các axit amin đa bazơ trong phân tử HA thuộc phân nhóm H5 được thay đổi bằng kỹ thuật di truyền

†: Chủng A/duck/Singapore/3/97 kiểu hoang không có các axit amin đa bazơ

Bảng 1b. Sự khác nhau về trình tự ở protein HA1 của các virus cúm H5N1

Amino acid position in HA1											
Virus	36	83	86	120	155	189	212	223	263	Vị trí axit amin trong HA1	
Virut											
A/HK/213/04	T	A	A	N	N	A	R	K	N	A	
A/Vietnam/1203/04	K	T	V	S	S	T	K	R	S	T	
A/Vietnam /3046/04	T	A	V	S	S	T	K	R	S	T	
A/Vietnam /3062/04	T	A	V	S	S	T	K	R	S	T	
A/chicken/Vietnam /39/04	T	A	V	S	S	T	K	R	S	T	
A/falcon/HK-D0028/04	T	A	A	S	S	A	K	K	S	A	
A/duck/Singapore/3/97	T	D	V	S	N	A	K	E	S	A	
A/HK/156/97	T	A	A	S	S	A	K	E	S	T	

Bảng 2. Kết quả thử nghiệm HI của các virus tái tổ hợp Δ H5 với các kháng thể đơn dòng kháng HA thuộc phân nhóm H5

Virus	Các kháng thể đơn dòng kháng HA phân nhóm H5 (giá trị hiệu giá HI)				
	VN04-6*	HK03-3†	CP24‡	CP46‡	CP58‡ 406/7‡
Δ H5N1/03	51200	6400	1600	100	1600
					800
Δ H5/04	12800	<100	800	<100	1600
					<100
Δ H5 _{S155→N, T156→A} /04	3200	<100	800	<100	800
					100
Δ H5 _{S120→N} /04	12800	200	800	<100	1600
					<100
Δ H5 _{R212→K} /04	12800	100	1600	<100	6400
					<100
Δ H5 _{S223→N} /04	51200	3200	12800	<100	25600
					<100
Δ H5 _{S120→N, S155→N, T156→A} /04	12800	1600	3200	<100	1600
					200
Δ H5 _{N223→S} /03	12800	800	≤100	<100	200
					≤100

Thử nghiệm HI được thực hiện trong các khay vi hiệu giá chứa 0,5% tế bào hồng cầu gà. Các hiệu giá tính toán được là nghịch đảo tỉ lệ pha loãng nhất của các kháng thể đơn dòng mà tại tỉ lệ pha loãng đó các kháng thể đơn dòng này vẫn ức chế được sự ngưng kết hồng cầu gây ra bởi 04 đơn vị ngưng kết hồng cầu (HAU) của virus.

* kháng thể đơn dòng kháng HA của chủng virus A/Vietnam/1203/04;

† kháng thể đơn dòng kháng HA của chủng virus A/HK/213/03;

‡ kháng thể đơn dòng kháng HA của chủng virus A/chicken/Pennsylvania/1370/83.

Bảng 3. Khả năng sinh miễn dịch của các virus tái tổ hợp $\Delta H5$ HA được tạo ra từ chủng virus A/Vietnam/1203/04 thử nghiệm trên chồn sương

Virus	Hiệu giá HI của các huyết thanh sau khi được tạo miễn dịch bằng											
	$\Delta H5/04$			$\Delta H5_{S155 \rightarrow N, T156 \rightarrow A}/04$			$\Delta H5_{S120 \rightarrow N}/04$			$\Delta H5_{S223 \rightarrow N}/04$		
$\Delta H5N1/03$	20	20	10	160	80	160	20	20	10	20	10	10
$\Delta H5/04$	<u>20</u>	<u>20</u>	<u>20</u>	20	20	20	20	20	20	20	20	20
$\Delta H5_{S155 \rightarrow N, T156 \rightarrow A}/04$				<u>20</u>	<u>10</u>	<u>20</u>						
$\Delta H5_{S120 \rightarrow N}/04$							<u>80</u>	<u>80</u>	<u>20</u>			
$\Delta H5_{S223 \rightarrow N}/04$	160	320	320	160	320	160	320	320	320	<u>640</u>	<u>640</u>	<u>640</u>

Các con chồn sương bảy tuần tuổi có huyết thanh âm tính với virus cúm được chủng ngừa bằng cách tiêm hai lần trong cơ bằng chế phẩm vaccine virus được cô đặc, tinh chế, và bất hoạt chứa $7\mu\text{g}$ HA trong $250\mu\text{l}$ PBS, với khoảng thời gian giữa hai lần chủng ngừa là 3 tuần. Số liệu về hiệu giá HI khảo sát được từ 3 con chồn sương được trình bày riêng rẽ. Các phân tích HI sử dụng 0,5% tế bào hồng cầu gà.

Bảng 4. Hiệu giá trung hòa virus của huyết thanh được lấy từ các con chồn sương sau khi được chủng ngừa bằng các virus chứa phân tử HA được cải biến từ HA của chủng virus A/Vietnam/1203/04

Virus	Hiệu giá kháng thể trung hòa sau khi được tạo miễn dịch bằng:													
	$\Delta H5N1/04$				$\Delta H5/04$				$\Delta H5_{S155 \rightarrow N, T156 \rightarrow A}/04$				$\Delta H5_{S223 \rightarrow N}/04$	mock
$\Delta H5N1/03$	1280	1280	320	640	320	640	1280	1280	320	640	640	640	640	<80
$\Delta H5N1/04$	<u>2560</u>	<u>1280</u>	<u>640</u>	1280	640	640	1280	1280	640	640	1280	1280	1280	<80
$\Delta H5/04$	1280	1280	640	<u>1280</u>	<u>640</u>	<u>640</u>	1280	1280	640	640	1280	1280	1280	<80
$\Delta H5_{S155 \rightarrow N, T156 \rightarrow A}/04$	1280	1280	640	1280	640	640	<u>1280</u>	<u>1280</u>	<u>640</u>	1280	1280	1280	1280	<80
$\Delta H5_{S223 \rightarrow N}/04$	1280	1280	1280	1280	1280	640	1280	1280	320	<u>1280</u>	<u>1280</u>	<u>1280</u>	1280	<80
$\Delta H5_{S223 \rightarrow N}N1/04$	1280	1280	640	1280	640	640	1280	1280	640	1280	1280	1280	1280	<80

Phân tích trung hòa được thực hiện trong các tế bào MDCK. Hiệu giá được tính là nghịch đảo của giá trị tỉ lệ pha loãng nhất của huyết thanh mà tại tỉ lệ pha

loãng đó, huyết thanh vẫn ức chế hoàn toàn virus với lượng bằng 100 TCID₅₀. Hiệu giá cùng dạng là các giá trị được gạch chân. Các giá trị hiệu giá trung hòa thu được từ phân tích trên 3 con chồn sương được trình bày riêng rẽ.

Bảng 5. Thử nghiệm HI của các kháng huyết thanh kháng virus 2003 H5N1 đối với các virus đột biến

Kháng huyết thanh đa dòng kháng :		
Virut	vacxin Δ H5N1/03	A/HK/213/03 (H5N1)
Δ H5N1/03	2560	2560
Δ H5/04	160	160
Δ H5 _{S155→N; T156→A}	80	320
Δ H5 _{S120→N/04}	320	320
Δ H5 _{S223→N/04}	1280	640

Thử nghiệm HI được tiến hành trong các khay vi hiệu giá chứa 0,5% tế bào hồng cầu gà (Palmer và các đồng tác giả, thuộc US Department of Health, Education and Welfare, Immunology series No.6, Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention, 1975). Hiệu giá là nghịch đảo tỉ lệ pha loãng nhất mà tại tỉ lệ pha loãng đó kháng huyết thanh vẫn ức chế được sự ngưng kết hồng cầu gây ra bởi 04 đơn vị ngưng kết hồng cầu (HAU) của virus

Bảng 6. Phân tích tính kháng nguyên của các virus H5/97 và H5_{S223→N}/97 đối với các kháng thể đơn dòng và đa dòng

Virus	Hiệu giá HI của các kháng huyết thanh đa dòng						Hiệu giá HI của các kháng thể đơn dòng					
	A/ck/Hid algo/94	A/HK/15 6/97	A/Gs/HK /497-4/97	A/ck/HK/ YU22/02	A/HK/21 3/03	ΔH5/03	VN04-6*	HK03-3†	CP58†	CP24†	CP46†	CP406/7†
ΔH5/03	20	320	5120	12 800	160	5 120	25 600	6 400	1 600	12 800	<100	1 600
H5/97	40	640	640	320	<10	10	3 200	<100	3 200	1 600	<100	3 200
H5 _{S223→N} /97	320	10 240	10 240	2 560	80	1 280	25 600	<100	25 600	51 200	200	25 600

*: kháng thể đơn dòng kháng HA của chủng virus A/Vietnam/1203/04;

†: kháng thể đơn dòng kháng HA của chủng virus A/HK/213/03;

: kháng thể đơn dòng kháng HA của chủng virus A/chicken/Pennsylvania/1370/03;

Các thử nghiệm HI được thực hiện trong các khay vi hiệu giá chứa 0,5% tế bào hồng cầu gà (14). Hiệu giá là nghịch đảo tỉ lệ pha loãng nhất của kháng huyết thanh mà tại tỉ lệ pha loãng đó kháng huyết thanh vẫn ức chế được sự ngưng kết hồng cầu của 4 đơn vị ngưng kết hồng cầu (HAU) của virus.

Phạm vi của sáng chế không bị giới hạn bởi các phương án cụ thể đã được nêu trong bản mô tả này. Trên thực tế, ngoài các phần được trình bày trong bản mô tả này, các biến thể của sáng chế sẽ là hiển nhiên đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này dựa vào phần mô tả và các hình vẽ kèm theo. Các biến thể như vậy của sáng chế sẽ nằm trong phạm vi của phần Yêu cầu bảo hộ dưới đây.

Cũng cần phải hiểu rằng, các giá trị sử dụng trong bản mô tả sáng chế này là các giá trị xấp xỉ, và chỉ nhằm mục đích minh họa, mô tả.

Tất cả các patent và đơn sáng chế được trích dẫn trên đây được đưa vào đây hoàn toàn bằng cách viện dẫn.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm có khả năng sinh miễn dịch chứa:

(a) phân tử ngưng kết tố hồng cầu (HA: hemagglutinin) virus cúm H5 tái tổ hợp trong đó phân tử HA H5 tái tổ hợp này:

(i) có một hoặc nhiều thay đổi trình tự axit amin so với phân tử HA có trong tự nhiên chứa axit amin không phải là asparagin ở vị trí axit amin tương ứng với vị trí axit amin 223 trong HA H5;

(ii) chứa asparagin ở vị trí axit amin tương ứng với vị trí axit amin 223 trong HA H5;

(iii) có khả năng phản ứng gia tăng với kháng huyết thanh được lấy từ động vật đã bị phơi nhiễm virus cúm H5 hoặc vắc xin cúm H5 so với phân tử HA có trong tự nhiên nêu trên; và

(iv) không phải là phân tử HA A/HK/213/03, và

(b) chất mang.

2. Chế phẩm có khả năng sinh miễn dịch theo điểm 1, trong đó chế phẩm có khả năng sinh miễn dịch này chứa chất bổ trợ.

3. Chế phẩm có khả năng sinh miễn dịch theo điểm 1, trong đó chế phẩm có khả năng sinh miễn dịch này chứa phân tử kích thích miễn dịch.

4. Chế phẩm có khả năng sinh miễn dịch theo điểm 1, trong đó chế phẩm có khả năng sinh miễn dịch này chứa các vi nang và/hoặc chất mang kiểu màng tăng cường miễn dịch.

5. Chế phẩm có khả năng sinh miễn dịch theo điểm 1, trong đó chế phẩm có khả năng sinh miễn dịch này chứa tế bào hồng cầu (rbc), các tế bào hồng cầu đã tách bỏ hemoglobin (RBC ghost), hoặc kháng nguyên gây triệu chứng lưỡi xanh (blue tongue antigen).

6. Chế phẩm có khả năng sinh miễn dịch theo điểm 1, trong đó chế phẩm có khả năng sinh miễn dịch này có thể được phân phối trong cơ.
7. Chế phẩm có khả năng sinh miễn dịch theo điểm 1, trong đó chế phẩm có khả năng sinh miễn dịch này có thể được phân phối qua đường miệng.
8. Chế phẩm có khả năng sinh miễn dịch theo điểm 1, trong đó chế phẩm có khả năng sinh miễn dịch này có thể được phân phối qua niêm mạc.
9. Chế phẩm có khả năng sinh miễn dịch theo điểm 1, trong đó một hoặc nhiều thay đổi trình tự axit amin làm thay đổi vị trí glycosyl hóa.
10. Chế phẩm có khả năng sinh miễn dịch theo điểm 1, trong đó phân tử HA có trong tự nhiên nêu trên là từ virus cúm A ở người.
11. Chế phẩm có khả năng sinh miễn dịch theo điểm 10, trong đó virus cúm A ở người là chủng virus thuộc phân nhóm H5.
12. Chế phẩm có khả năng sinh miễn dịch theo điểm 1, trong đó phân tử HA có trong tự nhiên nêu trên là từ virus cúm ở loài chim.
13. Chế phẩm có khả năng sinh miễn dịch theo điểm 1, trong đó asparagin ở vị trí axit amin 223 của phân tử HA này làm thay đổi tính đặc hiệu đối với thụ thể axit sialic.
14. Chế phẩm có khả năng sinh miễn dịch theo điểm 1, trong đó phân tử HA này là một phần của virus tái tổ hợp hoặc đã được làm giảm độc lực.
15. Chế phẩm có khả năng sinh miễn dịch chứa:
 - (a) virus cúm tái tổ hợp chứa phân tử ngưng kết tổ hồng cầu (HA) của virus cúm H5 tái tổ hợp, trong đó phân tử HA H5 tái tổ hợp này:
 - (i) có một hoặc nhiều thay đổi trình tự axit amin so với phân tử HA có trong tự nhiên chứa axit amin không phải là asparagin ở vị trí axit amin tương ứng với vị trí axit amin 223 trong HA H5;

(ii) chứa asparagin ở vị trí axit amin tương ứng với vị trí axit amin 223 trong HA H5;

(iii) có khả năng phản ứng gia tăng với kháng huyết thanh được lấy từ động vật đã bị phơi nhiễm virus cúm H5 hoặc vắc xin cúm H5 so với phân tử HA có trong tự nhiên nêu trên; và

(iv) không phải là phân tử HA A/HK/213/03, và

(b) chất mang.

16. Chế phẩm có khả năng sinh miễn dịch theo điểm 15, trong đó một hoặc nhiều thay đổi trình tự axit amin làm thay đổi vị trí glycosyl hóa.

17. Chế phẩm có khả năng sinh miễn dịch theo điểm 15, trong đó phân tử HA có trong tự nhiên nêu trên là từ virus cúm A ở người.

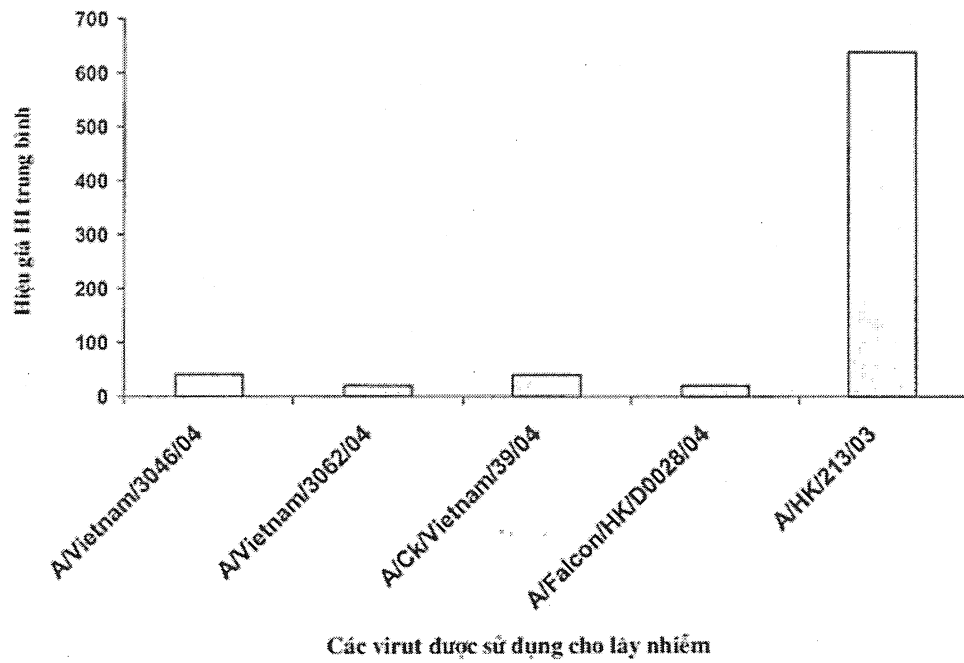
18. Chế phẩm có khả năng sinh miễn dịch theo điểm 17, trong đó virus cúm A ở người này là chủng virus thuộc phân nhóm H5.

19. Chế phẩm có khả năng sinh miễn dịch theo điểm 15, trong đó phân tử HA có trong tự nhiên nêu trên là từ virus cúm ở loài chim.

20. Chế phẩm có khả năng sinh miễn dịch theo điểm 15, trong đó asparagin ở vị trí axit amin 223 của phân tử HA này làm thay đổi tính đặc hiệu đối với thụ thể axit sialic.

FIG.1.

A



B

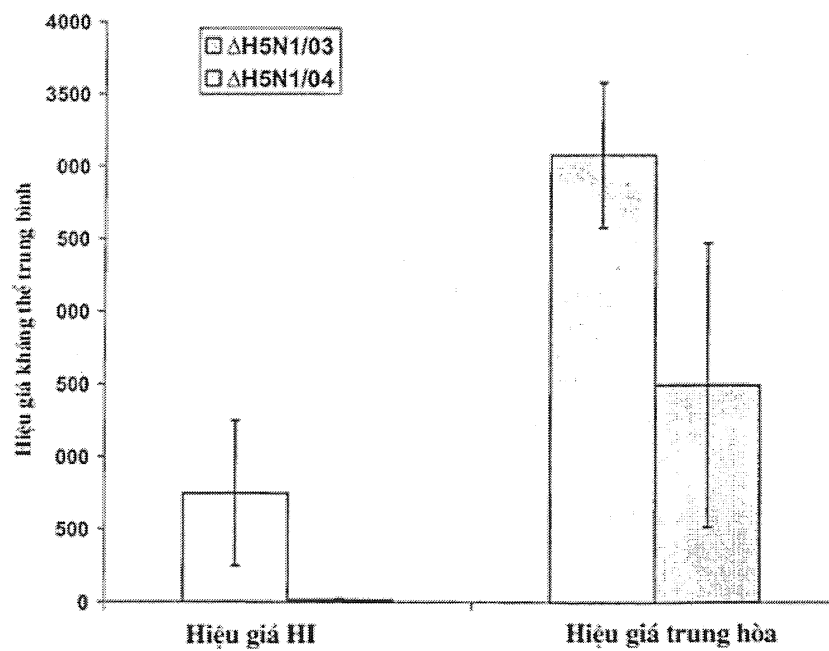


FIG.2.

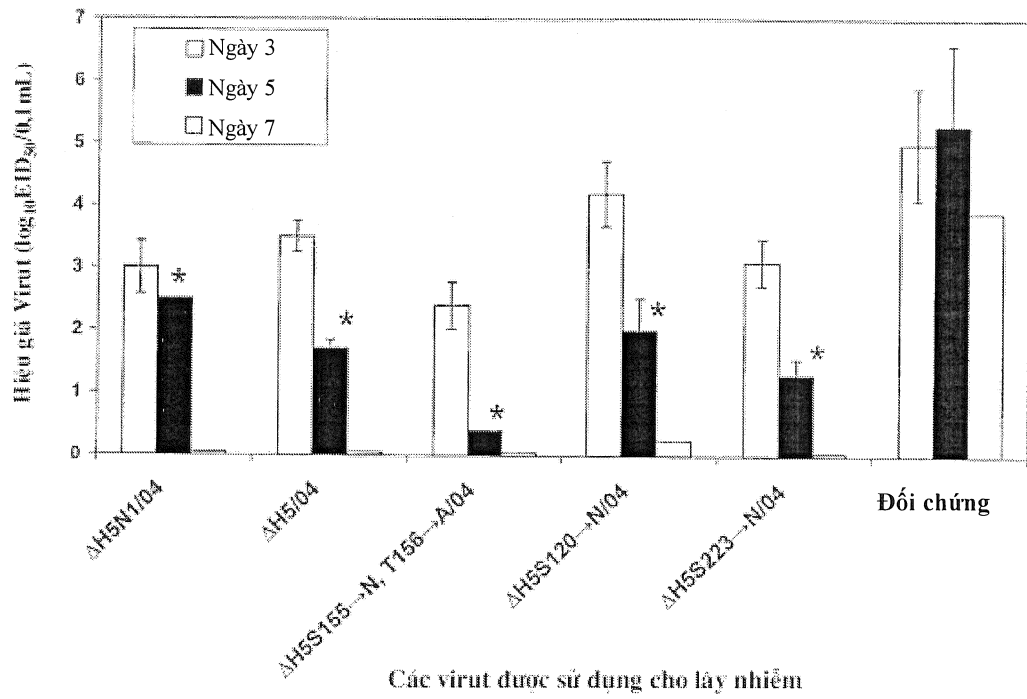


FIG.3.

