



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0039514

(51)⁷ A61K 39/12; C07K 14/005 (13) B

(21) 1-2015-02744 (22) 16/12/2013

(86) PCT/CU2013/000008 16/12/2013 (87) WO2014/101903 03/07/2014

(30) 2012-0179 27/12/2012 CU

(45) 25/04/2024 433 (43) 26/10/2015 331A

(73) CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA (CU)
Avenida 31 entre 158 y 190, Cubanacán, Playa, 11600 La Habana, Cuba

(72) HERMIDA CRUZ, Lisset (CU); GIL GONZÁLEZ, Lázaro (CU); IZQUIERDO OLIVA, Alienys (CU); MARCOS LÓPEZ, Ernesto (CU); SUZARTE PORTAL, Edith (CU); GUILLÉN NIETO, Gerardo, Enrique (CU); GUZMÁN TIRADO, María, Guadalupe (CU); VALDÉS PRADO, Iris (CU); LAZO VAZQUEZ, Laura (CU); GARCÍA ARECHA VALETA (CU); ALVAREZ VERA, Mayling (CU); CASTRO VELAZCO, Jorge (CU); LÓPEZ FERNÁNDEZ, Lázaro (CU); RAMÍREZ BARTUTIS, Rosa, Liset (CU); PÉREZ FUENTES, Yusleidi, de la Caridad (CU); PÉREZ, GUEVARA, Olga, Lidia (CU); ROMERO FERNÁNDEZ, Yaremy (CU).

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

(54) CHẾ PHẨM VACXIN CHỐNG VIRUT DENGUE VÀ OLIGONUCLEOTIT

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm vaccin mà chứa ít nhất một kháng nguyên trên cơ sở protein capsit của virus Dengue (dengue virus: DV) và oligonucleotit được nhận diện là SEQ ID NO 1. Chế phẩm vaccin này chứa protein dung hợp được tạo ra từ capsit của DV2 và miền III của protein vỏ ngoài thuộc cùng một typ huyết thanh, cùng với oligonucleotit được nhận diện là SEQ ID NO. 1, cho mức đáp ứng miễn dịch tế bào và bảo vệ cao hơn ở chuột nhất khi so với vaccin được tạo ra từ dạng chế phẩm cũng của kháng nguyên này cùng với các oligonucleotit có tiềm năng hỗ trợ đã biết trước đây. Hiệu quả của các chế phẩm chứa oligonucleotit SEQ ID NO. 1 đã được minh chứng ở các động vật linh trưởng không phải là người. Các chế phẩm này có thể là đơn trị, lưỡng trị hoặc tứ trị và được phối hợp với nhau theo các chế độ gây miễn dịch khác nhau với mục đích gây ra đáp ứng miễn dịch chức năng với cả bốn typ huyết thanh của virus.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực công nghệ sinh học và công nghệ dược phẩm, đặc biệt đề cập đến phương pháp thu nhận dạng bào chế vacxin chống lại virus Dengue (DV) trên cơ sở kháng nguyên protein tái tổ hợp và oligonucleotit có trình tự xác định.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Sốt Dengue là bệnh do virus qua trung gian động vật chân khớp phân bố rộng rãi gây ảnh hưởng đến con người. Theo các báo cáo, mỗi năm có trong khoảng từ 50 đến 100 triệu ca bệnh Dengue, 500 000 người trong số đó mắc dạng nặng nhất của bệnh này, còn được gọi là sốt xuất huyết Dengue (Guzman et al., Lancet Infect.Dis. 2002; 2:33-42). Tác nhân gây bệnh này là DV, là virus thuộc họ *Flaviviridae*, giống *Flavivirus*. DV là virus phức tạp gồm bốn typ huyết thanh. Đó là virus có vỏ ngoài với màng lipid chứa hai trong số ba protein cấu trúc của nó là: protein vỏ ngoài và protein màng. Vỏ ngoài lipoprotein bao quanh nucleocapsit khối hai mươi mốt cấu thành từ protein cấu trúc thứ ba của nó, protein capsit. (Leyssen et al., Clin.Microbiol.Rev. 2000; 13:67-82).

Trong những thập kỷ gần đây, có sự gây nhiễm trên diện rộng trên toàn cầu virus này nên việc phát triển của vacxin hữu hiệu, là một ưu tiên cho sức khỏe cộng đồng. Mục đích này bị hạn chế bởi một số yếu tố. Trước hết, việc gây nhiễm bằng một typ huyết thanh không tạo ra bảo vệ chéo kéo dài đối với các typ huyết thanh còn lại (Leyssen et al., Clin.Microbiol.Rev. 2000; 13:67-82) và, đồng thời, gây nhiễm lần hai khác typ là yếu tố nguy cơ chính dẫn đến sự phát triển của của dạng trầm trọng của bệnh này (Guzman et al., Lancet Infect.Dis. 2002; 2:33-42; Mongkolsapaya et al., Nat.Med. 2003; 9:921-927). Do đó, một vacxin lý tưởng chống lại DV cần phải tạo ra miễn dịch bảo vệ lâu dài đối với cả bốn typ huyết thanh của virus (DV1, DV2, DV3 và DV4).

Các vaccin dự tuyển thế hệ mới nhất là trên cơ sở chủng virus giảm độc lực đã qua các lần cấy chuyển liên tiếp trong dịch nuôi cấy tế bào, hoặc được thu nhận bằng cách tái tổ hợp. Sự can thiệp của virus, trong số bốn typ huyết thanh trong dạng bào chế tứ trị, là hạn chế chủ yếu của các vaccin dự tuyển này dẫn đến việc khó gây ra đáp ứng miễn dịch chức năng chống lại bốn typ huyết thanh; ngoài ra, các vaccin này cần được cấp ở các chế độ cách quãng dài giữa hai hoặc ba liều vaccin được đề xuất. (Bhamarapravati et al., *Vaccine*. 2000; 18:44-47; Kanesa-Thanan et al., *Vaccine*. 2001; 19:3179-3188; Morrison et al., *J.Infect.Dis.* 2010; 201:370-377). Ngoài ra, do có bản chất là virus sống, nên vaccin này không dùng được cho trẻ con nhỏ hơn một tuổi.

Như là một phương án thay thế được chú ý, hàng loạt nghiên cứu tiền lâm sàng trên cơ sở vaccin cấu trúc siêu phân tử đã được phát triển. Phương pháp này có ba ưu điểm chính so với việc dùng vaccin chứa virus sống đã được làm suy giảm độc lực: 1) chúng có tiềm năng là vaccin an toàn, 2) hiện tượng can thiệp bằng virus sẽ không xảy ra do tác nhân gây miễn dịch không có khả năng sao chép và 3) có thể có phác đồ dùng vaccin trong thời gian ngắn, khác với khi dùng virus sống đã được làm suy giảm độc lực đòi hỏi chế độ cách quãng trong thời gian dài giữa các liều dùng vaccin để có được tác động nhắc lại.

Một trong các vaccin dự tuyển có cấu trúc siêu phân tử hứa hẹn nhất, được công ty phát triển Hawaii Biotech/Merck (Hombach, *Rev.Panam.Salud Publica*. 2007; 21:254-260). Vaccin dự tuyển này được tạo ra từ mỗi protein vỏ ngoài của virus từ bốn typ huyết thanh, được biểu hiện trong các tế bào côn trùng. Dạng bào chế đơn trị và tứ trị đã được đánh giá ở chuột nhắt và khỉ với các kết quả về tính sinh miễn dịch tương tự với các kết quả thu được từ virus đã được làm suy giảm độc lực (Clements et al., *Vaccine*. 2010; 28:2705-2715). Tuy nhiên, để gây ra đáp ứng miễn dịch thích hợp, dạng bào chế đơn trị này đòi hỏi phải bổ sung các tá chất hữu hiệu, mà được cấp phép sử dụng cho người. Còn dạng bào chế tứ trị được đánh giá ở các động vật linh trưởng không phải là người chưa không chỉ tá chất chưa được cấp phép sử dụng, mà còn cả protein NS1 từ DV2, là protein có một số tính tương đồng với tế bào nội mô người và kết quả là, nó có thể gây ra rối loạn miễn dịch tự miễn. Ngoài ra, chưa có số liệu về

việc cảm ứng miễn dịch qua trung gian tế bào khi sử dụng vacxin dự tuyển này, là một phần quan trọng trong miễn dịch, mà gần đây được nhận diện là có vai trò bảo vệ đối với Dengue. (Gil et al., *Viral Immunol.* 2009; 22:23-30; Yauch et al., *J.Immunol.* 2009; 182:4865-4873; Yauch et al., *J.Immunol.* 2010; 185:5405-5416).

Trong khi muốn có các ưu điểm của việc dùng vacxin cấu trúc siêu phân tử, và, đồng thời, muốn tìm ra dạng bào chế miễn dịch an toàn hơn chứa phenol là tá chất cơ sở, nhóm các nhà nghiên cứu Cuban đã tiến hành nghiên cứu trên cơ sở protein capsit và miê III của protein vỏ ngoài của virut Dengue (Guzman et al., *Exp.Rev.Vaccines.* 2010; 9:137-147).

Protein capsit từ DV là thiết yếu trong quá trình lắp ghép của virion và bảo vệ hệ gen virut có chức năng chính của nó. Phân tử lượng của nó là 9-12 kDa (112-127 axit amin) và có cấu trúc cơ bản với 25% axit amin của nó là Arginin và Lysin. Protein này nằm trong cấu trúc virion, mà không có vùng lộ ra ngoài (Kuhn et al., *Cell.* 2002; 108:717-725), nên rất thích hợp để đưa vào vacxin, do nó không thể là đích của kháng thể có tác dụng tăng cường miễn dịch. Mặt khác, biểu vị CTL ở người khác nhau đã được nhận diện trên trình tự, mang lại miễn dịch qua trung gian tế bào hữu hiệu chống lại virut này (Gagnon et al., *J.Virol.* 1996; 70:141-147; Gagnon et al., *J.Virol.* 1999; 73:3623-3629).

Mặc dù có một số nghiên cứu về các đặc tính cấu trúc của protein capsit này, cho đến tận năm 2007 thì lần đầu tiên nó mới được đánh giá về khả năng sinh miễn dịch ở chuột nhắt. Trong nghiên cứu này, capsit từ DV2, thu được dưới dạng protein tái tổ hợp trong *Escherichia coli*. Trong quá trình bán tinh chế, chế phẩm thu được được đánh giá ở chuột nhắt, và thu được tác dụng bảo vệ một phần sau thử thách DV2 mà không cảm ứng kháng thể trung hoà. (Lazo et al., *Vaccine.* 2007; 25:1064-1070). Sau đó, quá trình tinh chế và tạo kết tụ *in vitro* được thực hiện ở quy mô phòng thí nghiệm, và tiếp tục protein thu được được đánh giá ở chuột nhắt để đánh giá chức năng bảo vệ của nó (Lopez et al., *Arch.Virol.* 2009; 154:695-698). Phân tích khả năng sinh miễn dịch đã cho thấy có sự cảm ứng miễn dịch qua trung gian tế bào được đo bởi sự tiết gamma interferon (TNF- γ), bởi tế bào lách của chuột nhắt nhận protein đã

được tạo kết tụ. Như vậy sự tiết là phụ thuộc vào các tế bào $CD4^+$ và $CD8^+$. Đến lượt mình, khi thử thách bằng DV2, thu được tác dụng bảo vệ đáng kể ở động vật được gây miễn dịch bằng protein đã được tạo kết tụ này và như vậy tác dụng bảo vệ cũng phụ thuộc vào các tế bào $CD4^+$ và $CD8^+$ (Gil et al., *Int.Immunol.* 2009; 21:1175-1183). Trên cơ sở các kết quả nêu trên, đã có đề xuất kết hợp, trong cùng một cấu trúc di truyền, protein capsit và vùng DomIII của protein vỏ ngoài, cả hai loại này đều từ DV2. DomIII đã được mô tả nhiều là một vùng gắn kết thụ thể (Chen et al., *J.Virol.* 1996; 70:8765-8772) và, ngoài ra, nó đã được báo cáo gây ra kháng thể trung hoà và bảo vệ ở chuột nhắt được gây miễn dịch bằng protein dung hợp chứa vùng virus này. (Crill et al., *J.Virol.* 2001; 75:7769-7773; Hermida et al., *J.Virol.Methods.* 2004; 115:41-49; Simmons et al., *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 2001; 65:159-161). Tiếp đó, ở các thử nghiệm trên động vật linh trưởng không phải là người, đã minh chứng được sự gây ra đáp ứng miễn dịch bảo vệ chỉ bằng cách sử dụng tá chất Freund (Hermida et al., *Vaccine.* 2006; 24:3165-3171).

Kết hợp của capsit của virus và DomIII của protein vỏ ngoài của virus cho phép có mặt hai vùng có tiềm năng bảo vệ trong cùng một phân tử, có khả năng đồng thời gây ra sự kháng thể trung hoà (DomIII) và đáp ứng miễn dịch tế bào (capsit). Khi đó thu được cấu trúc di truyền có tên DIIC-2 (DomIII dung hợp với vùng đầu tận N của protein capsit, typ huyết thanh 2), mà được biểu hiện trong *E. coli*; và protein thu được được tinh chế ở phòng thí nghiệm, và được xử lý tạo khối kết tụ với hỗn hợp gồm các oligonucleotit có trình tự chưa biết. Sau khi tiêm chủng ba liều ở chuột nhắt, phát hiện được kháng thể kháng virus và trung hoà. Theo cách tương tự, phát hiện được sự tiết $TNF-\gamma$ đáng kể ở tế bào lách của động vật được gây miễn dịch bằng protein đã được tạo kết tụ này. Phù hợp với quá trình miễn dịch qua trung gian tế bào, thu được tác dụng bảo vệ đáng kể khi thử thách trong sọ, và tác dụng bảo vệ như vậy là qua trung gian các tế bào $CD4^+$ và $CD8^+$ được cảm ứng trong quá trình gây miễn dịch (Valdes et al., *Virology.* 2009; 394:249-258). Khi xét cùng nhau, các kết quả nêu trên cho phép chọn lọc dạng tạo kết tụ của DIIC-2 cho các nghiên cứu sau đó ở các động vật linh trưởng không phải là người. Nghiên cứu đầu tiên ở động vật linh trưởng không phải là người được thực hiện bằng cách sử dụng động vật được gây nhiễm bằng

DV2 từ trước, với mục đích chính là biết được khả năng nhắc lại DIIC2. Như được dự tính, sau khi cấp DIIC-2, ba tháng sau khi gây nhiễm bằng virus này, động vật phát triển mức cao kháng thể kháng virus và trung hoà đối với virus tương đồng, điều này chứng tỏ sự có mặt của biểu vị chức năng trong protein tái tổ hợp (Valdes et al., Clin.Vaccine Immunol. 2011; 18:455-459).

Trước khi tìm ra sáng chế, đã biết rằng việc đưa vào các oligodeoxynucleotit để tạo ra các biến thể kết tụ của protein DIIC-2 tạo thuận lợi cho miễn dịch qua trung gian tế bào và bảo vệ chống lại virus tương đồng ở chuột nhắt (Valdes et al., Clin.Vaccine Immunol. 2011; 18:455-459). Tuy nhiên, vẫn chưa biết liệu trình tự này có thể ảnh hưởng đến chất lượng của đáp ứng miễn dịch được gây ra.

Dựa theo các nội dung được nêu trên, nhận thấy rằng sự phát triển của vaccine chống lại DV mà có thể mang lại đáp ứng miễn dịch an toàn và hữu hiệu đối với bốn typ huyết thanh là vấn đề chưa được giải quyết. Sáng chế đã giải quyết được chính vấn đề này.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế giả quyết vấn đề nêu trên, đề xuất chế phẩm vaccine chứa: a) ít nhất một kháng nguyên chứa ít nhất 50% trình tự protein capsit từ DV và b) oligodeoxynucleotit được nhận diện là SEQ ID NO. 1. Theo một phương án theo sáng chế, chế phẩm vaccine này được có đặc trưng vì kháng nguyên chứa ít nhất 50% trình tự protein capsit từ DV là kháng nguyên tái tổ hợp chứa các axit amin từ 1 đến 99 của kháng nguyên như vậy. Theo một phương án theo sáng chế, chế phẩm vaccine này chứa kháng nguyên thể khảm chứa các axit amin 1 đến 99 của protein capsit và axit amin 286 đến 426 của vùng DomIII của protein vỏ ngoài của virus. Theo một phương án cụ thể các kháng nguyên tái tổ hợp nêu trên được chọn trong nhóm bao gồm SEQ ID NO. 5 (kháng nguyên DIIC-1), SEQ ID NO. 6 (kháng nguyên DIIC-2), SEQ ID NO. 7 (kháng nguyên DIIC-3) và SEQ ID No. 8 (kháng nguyên DIIC-4).

Để thể hiện xem liệu oligonucleotit được sử dụng để tạo khối kết tụ protein có ảnh hưởng đến việc tạo ra đáp ứng miễn dịch tốt hơn, chế phẩm typ huyết thanh 2

được chọn làm mẫu. Protein DIIC-2 (kháng nguyên thể khảm chứa DomIII của protein vỏ ngoài của virus và các axit amin 1 đến 99 của protein capsit từ DV2) được kết tủa với sự có mặt của các oligonucleotit khác nhau có trình tự đã biết, như được mô tả trong tình trạng kỹ thuật. Đã được biết đến rằng một số các oligonucleotit này có khả năng bổ trợ (Klinman, *Int.Rev.Immunol.* 2006; 25:1-20; Vollmer, *Int.Rev.Immunol.* 2006; 25:125-134). Một oligonucleotit mới ngoài ra cũng được đưa vào nghiên cứu này, được tạo ra từ dung hợp của hai oligonucleotit được đề cập trên đây (Krug et al., *Eur.J.Immunol.* 2001; 31:2154-2163; Verthelyi et al., *J.Immunol.* 2001; 166:2372-2377). Khi đánh giá ở chuột nhắt, các tác giả sáng chế đã được minh chứng được rằng oligonucleotit mới (SEQ ID NO. 1) cho miễn dịch qua trung gian tế bào tốt nhất, được đo bằng sự tiết TNF- γ ; do đó, được chọn để thực hiện thử nghiệm bảo vệ bằng cách sử dụng mô hình bệnh viêm não chuột nhắt với virus tương đồng. Kết quả là, dạng bào chế DIIC-2 chứa oligonucleotit SEQ ID NO. 1 và được cho tá chất là phen, tạo ra đáp ứng miễn dịch bảo vệ tiềm năng được đo phần trăm sống sót và hiệu giá virus ở não.

Do đó, theo sáng chế điều đã được minh chứng, lần đầu tiên là bản chất của oligonucleotit là thiết yếu để gây ra đáp ứng miễn dịch tế bào phù hợp, và kết quả là khả năng bảo vệ của protein tái tổ hợp. Cho dù đã thử nghiệm một số oligonucleotit, chỉ có một trong số đó là oligonucleotit có trình tự được nhận diện là SEQ ID NO. 1, là tốt nhất trong việc gây ra đáp ứng miễn dịch tế bào và bảo vệ. Một số oligonucleotit tổng hợp có trình tự khác nhau được thử nghiệm, chứa hoặc không chứa motif CpG và có mối liên kết phosphodiester trong cấu trúc của mình. Yếu tố cuối cùng này khác với các oligonucleotit có hoạt tính tiềm năng miễn dịch như được mô tả trong tài liệu, vì các mối liên kết, mà được sử dụng cho quá trình tổng hợp các oligonucleotit này, là thuộc dạng phosphorothioat, để bảo vệ chúng khỏi sự thoái biến do exonuclease. Ngoài ra, một số kích cỡ khác được thử nghiệm như 19, 20 và 39 bazơ. Oligonucleotit gồm 39 bazơ cuối cùng chứa một số motif CpG, và việc đưa vào trong trình tự này, mà là không được phép bao gồm trong các nhóm được mô tả cho các oligonucleotit có hoạt tính có tiềm năng miễn dịch trong tình trạng kỹ thuật.

Mặt khác, trong tất cả các trường hợp trong đó các phân tử này được sử dụng để tạo khối kết tụ các kháng nguyên tái tổ hợp, do đó lượng tối thiểu chúng được cho vào. Điều này là một yếu tố khác biệt giữa các oligonucleotit được sử dụng là các chất kích thích hệ miễn dịch, một số lớn trong đó là cần thiết để mang lại chức năng (Riedl et al., J.Immunol. 2002; 168:4951-4959).

Như đã nêu trên, khi đánh giá miễn dịch ở chuột nhất các tác giả sáng chế bắt ngờ phát hiện được rằng oligonucleotit có trình tự được nhận diện là SEQ ID NO. 1, có tiềm năng đáng kể gây ra đáp ứng miễn dịch tế bào và bảo vệ được gây ra bởi protein tái tổ hợp DIIC-2, với khác biệt so với các oligonucleotit được sử dụng còn lại.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig 1. Đáp ứng của kháng thể kháng virus ở động vật đã được gây miễn dịch. Ở trục Y log hiệu giá kháng DV2 được thể hiện thành đồ thị, ở trục X các nhóm động vật nhận các chế phẩm biến thể DIIC-2 khác nhau. Hiệu giá được xác định bằng cách sử dụng ELISA bắt giữ được khuếch đại bằng cách sử dụng virus này làm kháng nguyên. Phép phân tích thống kê được thực hiện bằng cách sử dụng Kruskal-Wallis và so sánh nhiều biến bằng cách sử dụng kiểm định Dunn *một hậu nghiệm*. Các chữ số khác nhau biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm. Số liệu được thể hiện là trung bình \pm độ lệch chuẩn.

Fig 2. Nồng độ của TNF- γ được đo bằng ELISA, sau khi kích thích *in vitro* được đo ở tế bào lách từ chuột nhất được gây miễn dịch bằng dạng bào chế khác nhau của DIIC-2 được nuôi cấy với DV2 hoặc chế phẩm mẫu đối chứng âm tính (giả). Trên trục Y nồng độ của TNF- γ (pg/ml) được chỉ ra. Ở trục X các nhóm mà nhận dạng bào chế khác nhau của DIIC-2 được thể hiện. Phần trăm phản ánh mỗi tập hợp các điểm nêu trên là giá trị phần trăm của người đáp ứng. Đường vạch vạch biểu thị giá trị cao hơn mà được xem là đáp ứng dương tính. Phép phân tích thống kê được thực hiện bằng cách sử dụng kiểm định ANOVA phân loại một yếu tố, và so sánh nhiều biến giữa các nhóm được thực hiện thông qua kiểm định Tukey. Các chữ số khác nhau biểu

thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm. Số liệu được thể hiện là trung bình \pm độ lệch chuẩn ($n = 8$).

Fig 3. Các thử nghiệm bảo vệ chống lại DV2. A. Các đường cong sống sót với chuột nhất đã được gây miễn dịch sau thử thách trong sọ bằng chủng DV2 gâu tử vong. Trục Y thể hiện giá trị phần trăm của sống sót và trục X thể hiện thời gian theo dõi sau khi thử thách trong sọ. B. định lượng virut ở các tế bào VERO, được đo từ não được gây nhiễm vào ngày 7 sau khi thử thách. Trục Y thể hiện số pfu/ml thu được sau đếm vết tan trên các tế bào VERO từ dịch đồng tính não của chuột nhất được gây nhiễm. Trục X thể hiện các nhóm nghiên cứu. Đối với đường cong sống sót, phép phân tích thống kê được thực hiện theo thử nghiệm sống sót cấp độ log. Các chữ số khác nhau biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm. Số liệu là đại diện của hai thử nghiệm độc lập ($n = 10$). Đối với tải lượng virut, phép phân tích thống kê được thực hiện bằng cách sử dụng Kruskal-Wallis và so sánh nhiều biến bằng cách sử dụng kiểm định Dunn *một hậu nghiệm*. Các chữ số khác nhau biểu thị sự khác biệt thống kê giữa các nhóm. Số liệu được thể hiện là trung bình \pm độ lệch chuẩn ($n = 5$). đường vạch vạch biểu thị 100 pfu/ml.

Fig 4. động học của kháng thể kháng DIIC-2 được tạo ra ở khí và được đo bằng ELISA. Trục Y thể hiện hiệu giá logarit và trục X thể hiện thời gian theo ngày trong quá trình thử nghiệm. Mũi tên đen biểu thị thời điểm của mỗi lần gây miễn dịch.

Fig 5. động học của kháng thể kháng DV, được đo bằng ELISA bắt giữ ở khí được gây miễn dịch bằng thuốc vờ (A), bằng protein đã được tạo kết tụ DIIC-2 (B) hoặc bằng NLPs-2 (C). Trục Y thể hiện $\log 1/\text{title}$, và trục X thể hiện thời gian theo ngày trong quá trình thử nghiệm. Mũi tên đen biểu thị thời điểm của mỗi lần gây miễn dịch và mũi tên gạch gạch biểu thị ngày thử thách virut.

Fig 6. Nồng độ của TNF- γ được đo bằng ELISA sau kích thích *in vitro* các tế bào đơn nhân máu ngoại biên từ khí, nhận chế phẩm thuốc vờ hoặc protein DIIC-2. Trên trục Y nồng độ của TNF- γ (pg/ml) được thể hiện và ở trục X thời gian của thử nghiệm được chỉ ra. PBMC từ khí đã được gây miễn dịch được nuôi cấy với DV2

hoặc chế phẩm mẫu đối chứng âm tính (giả). Số liệu được thể hiện là trung bình \pm độ lệch chuẩn ($n = 3$). Đường vạch vạch biểu thị giá trị nêu trên mà được xem là đáp ứng dương tính.

Fig 7. Tải lượng virus trong huyết thanh của khỉ được gây miễn dịch bằng chế phẩm thuốc vờ (A), protein đã được tạo kết tụ DIIC-2 (B) hoặc NLPs-2 (C), được đo bằng trực tiếp đếm vết tan trên các tế bào VERO. Trục bên phải tương ứng với lượng nạp được phát hiện ở khỉ 2, 5 và 9 (đường vạch vạch). Trục bên trái tương ứng với lượng nạp được phát hiện ở các động vật còn lại. Trên trục X thời gian (theo ngày) sau thử thách được chỉ ra.

Fig 8. Phương pháp nhân dòng vô tính để thu nhận các cấu trúc di truyền pDIIC-1 pDIIC-2, pDIIC-3 và pDIIC-4.

Fig 9. Mức nhận biết của các protein thể ghép DIIC ở điều kiện khử và không khử bởi kháng thể đa dòng ở chuột nhất với hiệu giá trung hoà cao với typ huyết thanh tương đồng, như được xác định bằng ELISA. Trên trục Y các giá trị hấp thu được thể hiện thành đồ thị, và trục X thể hiện các protein được thử nghiệm.

Fig 10. đáp ứng của kháng thể kháng virus ở động vật đã được gây miễn dịch, được đo 15 ngày sau lần gây miễn dịch cuối. Trục Y thể hiện hiệu giá logarit kháng DV, và trục X thể hiện các nhóm động vật nhận mỗi dạng bào chế. (A) đáp ứng kháng DV1 của kháng thể; (B) đáp ứng kháng DV2 của kháng thể; (C) đáp ứng kháng DV3 của kháng thể và (D) đáp ứng kháng DV4 của kháng thể. Hiệu giá được xác định bằng cách sử dụng ELISA bắt giữ được khuếch đại bằng cách sử dụng mỗi virus làm kháng nguyên. Phép phân tích thống kê được thực hiện bằng cách sử dụng Kruskal-Wallis và so sánh nhiều biến bằng cách sử dụng kiểm định Dunn *một hậu nghiệm*. Các chữ số khác nhau biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm. Số liệu được thể hiện là trung bình \pm độ lệch chuẩn ($n = 10$).

Fig 11. Nồng độ của TNF- γ được đo bằng ELISA, sau kích thích *in vitro* tế bào lách từ chuột nhất được gây miễn dịch bằng dạng bào chế đơn trị và tứ trị DIIC (bao gồm oligonucleotit của SEQ ID NO. 1) hoặc bằng chế phẩm thuốc vờ và đã được

kích thích bằng mỗi protein DIIIC. trên trục Y nồng độ của TNF- γ (pg/ml) được chỉ ra. Trên trục X các nhóm nghiên cứu được thể hiện. Số liệu được thể hiện là trung bình \pm độ lệch chuẩn.

Fig 12. Các đường cong sống sót của chuột nhắt đã được gây miễn dịch sau thử thách trong sọ bằng chủng gây tử vong DV1 (A) và DV4 (B). Trục Y thể hiện giá trị phần trăm của sống sót và trục X thể hiện thời gian theo dõi sau thử thách trong sọ. Phép phân tích thống kê được thực hiện theo thử nghiệm sống sót cấp độ log. Các chữ số khác nhau biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm. Số liệu là đại diện của hai thử nghiệm độc lập (n = 9).

Fig 13. đáp ứng của kháng thể kháng virus đối với tất cả bốn typ huyết thanh của DV như được xác định bằng ELISA bắt giữ, sau ba liều của dạng bào chế tứ trị DIIIC với oligonucleotit SEQ ID NO. 1 ở các động vật linh trưởng không phải là người bằng cách sử dụng đường cấp dưới da (SC), nội bì (ID) và qua bắp (IM). Trục Y thể hiện Log Kháng DV tiêu đề và trục X các nhóm động vật.

Fig 14. Tần số các tế bào sản xuất TNF- γ từ các tế bào lympho máu ngoại biên được kích thích *in vitro* bằng các protein tái tổ hợp DIIIC sau ba liều dạng bào chế tứ trị DIIIC với oligonucleotit SEQ ID NO. 1, ở các động vật linh trưởng không phải là người. Ở trục Y tần số các tế bào sản xuất TNF- γ được thể hiện bằng số đếm/ml. Trên trục X các nhóm động vật được thể hiện.

Fig 15. đáp ứng của kháng thể kháng virus ở động vật đã được gây miễn dịch, được đo 15 ngày sau lần gây miễn dịch cuối. Trục Y thể hiện hiệu giá logarit kháng DV, và trục X các nhóm động vật nhận mỗi dạng bào chế được chỉ ra. (A) đáp ứng kháng DV1 của kháng thể; (B) đáp ứng kháng DV2 của kháng thể; (C) đáp ứng kháng DV3 của kháng thể và (D) đáp ứng kháng DV4 của kháng thể. Hiệu giá được xác định bằng cách sử dụng ELISA bắt giữ được khuếch đại bằng cách sử dụng mỗi virus làm kháng nguyên. Phép phân tích thống kê được thực hiện bằng cách sử dụng Kruskal-Wallis và so sánh nhiều biến bằng cách sử dụng kiểm định Dunn *một hậu nghiệm*. Các

chữ số khác nhau biểu thị sự khác biệt thống kê giữa các nhóm. Số liệu được thể hiện là trung bình \pm độ lệch chuẩn ($n = 10$).

Fig 16. Nồng độ của TNF- γ được đo bằng ELISA, sau kích thích *in vitro* tế bào lách từ chuột nhắt đã được gây miễn dịch và đã được kích thích bằng mỗi protein DIIIC. trên trục Y nồng độ của TNF- γ (pg/ml) được chỉ ra. Trên trục X các nhóm nghiên cứu được thể hiện. Số liệu được thể hiện là trung bình \pm độ lệch chuẩn ($n = 5$).

Mô tả chi tiết sáng chế

Khi đó, đã chứng tỏ được tác động đến Dengue ở các động vật linh trưởng không phải là người. Động vật nhận bốn liều dạng bào chế DIIIC-2 đã được tạo kết tụ với oligonucleotit của SEQ ID NO. 1, và được cho tá chất là phen. Ngoài ra, nhóm động vật khác được cho tham gia vào nghiên cứu này, nhận kháng nguyên tái tổ hợp chứa axit amin 1-99 của protein capsit từ DV2, được ủ trước bằng oligonucleotit của SEQ ID NO. 1 và tạo ra các hạt như nucleocapsit (NLPs-2).

Xác định đáp ứng của kháng thể kháng virus và kháng protein ngoài chức năng của đáp ứng này, bằng thử nghiệm trung hoà, bằng cách sử dụng chủng DV2 khác nhau và dòng tế bào khác nhau. Ngoài ra, cũng đánh giá miễn dịch qua trung gian tế bào bằng cách xác định sự tiết TNF- γ , sau khi kích thích *in vitro* các tế bào đơn nhân máu ngoại biên (PBMC) bằng DV2 gây nhiễm. Sau đó, động vật được thử thách bằng DV2, và với sự có mặt của virus trong máu được xác định. Kết quả là, protein này gây ra đáp ứng của kháng thể với hoạt tính trung hoà mạnh, được đo bằng sáu hệ khác nhau (sự chuyển hóa huyết thanh 100%), cũng như miễn dịch qua trung gian tế bào phù hợp, qua trung gian sự tiết TNF- γ , trước khi và sau thử thách bằng virus này ở khi. Phù hợp với các kết quả của tính sinh miễn dịch, động vật đã được chủng ngừa đáng kể được bảo vệ đáng kể chống lại thử thách virus, vì hai trong số ba động vật đã được gây miễn dịch không phân lập được virus vào ngày bất kỳ sau khi thử thách, và con thứ ba cho thấy là đến một ngày với các giá trị virus huyết nhỏ hơn 10 đơn vị tạo khuẩn lạc trên mililit (pfu/ml).

Nghiên cứu này ở các loại linh trưởng không phải là người, trước đây là âm tính với Dengue, là nghiên cứu đầu tiên về khả năng bảo vệ của protein tái tổ hợp chứa vùng capsit của virus DV. Phát hiện này cho phép ngoại suy các điều kiện với các protein thể ghép khác thu được, tương ứng với các typ huyết thanh 1, 3 và 4.

Tiếp theo, các tác giả sáng chế đã thiết kế và thu được các protein tái tổ hợp tương ứng với các typ huyết thanh 1, 3 và 4, mà lần lượt được gọi là DIIC-1 DIIC-3 và DIIC-4. Tất cả các phân tử là thu được từ *E. coli* với phần trăm biểu hiện thích hợp. Đến lượt mình, các phân tử này được tinh chế và được nhận biết bởi kháng thể đa dòng của chuột đặc hiệu đối với typ huyết thanh tương đồng. Ngoài ra, xác định được sự tạo ra liên kết disulfua chính xác trên mỗi protein, cả bằng phổ khối (đối với DIIC-1 DIIC-2, DIIC-3 và DIIC-4) và cả bằng sự mất nhận biết đối với huyết thanh đa dòng chuột khi carboxymetyl hóa khử xystein của liên kết disulfua giữa các mạch của DomIII (với DIIC-1 DIIC-2 và DIIC-4).

Trong các nghiên cứu được đưa vào theo sáng chế điều đã được minh chứng là các protein thể ghép DIIC của các typ huyết thanh này (1, 3 và 4), mà được mô tả lần đầu, cũng gây ra đáp ứng miễn dịch chức năng và bảo vệ ở chuột nhất đối với các typ huyết thanh tương đồng. Ngoài ra, đã phát hiện được rằng hỗn hợp của bốn protein thể ghép, được bào chế trước cùng với oligonucleotit SEQ ID NO. 1 và được cho tá chất là phèn, gây ra đáp ứng với tất cả bốn typ huyết thanh, cả về mặt tế bào và thể dịch, và có tác dụng bảo vệ ở chuột nhất, không có tính chất cạnh tranh kháng nguyên.

Bốn protein thể ghép DIIC-1, DIIC-2, DIIC-3 và DIIC-4 được tạo kết tụ khi bổ sung oligonucleotit SEQ ID NO. 1; sau đó được cho bổ trợ phèn để đánh giá tiếp ở chuột nhất. Sau khi cấp ba liều, có thể phát hiện sự có mặt của kháng thể kháng virus đối với tất cả bốn typ huyết thanh ở mức 100% với động vật đã được gây miễn dịch. Tương tự, hoạt tính trung hoà được phát hiện trong huyết thanh của các chuột nhất này, đo được đối với bốn typ huyết thanh. Phù hợp với kết quả này, khi thực hiện thử thách trong sọ với các typ huyết thanh của virus 1 và 4, thu được tác dụng bảo vệ

đáng kể trong cả hai trường hợp và do đó, cho thấy bằng chứng của chức năng của dạng bào chế đơn trị và tứ trị được đánh giá ở chuột nhất đã được minh chứng.

Dạng bào chế tứ trị còn có khả năng gây ra đáp ứng miễn dịch chức năng, cả hai thể dịch và tế bào, ở khí. Để đánh giá tính sinh miễn dịch của dạng bào chế này nghiên cứu thứ hai ở các loại linh trưởng không phải là người âm tính với Dengue được thực hiện. Các động vật này nhận ba liều dạng bào chế tứ trị qua các đường khác nhau, theo nhóm nghiên cứu, và một tháng sau liều cuối, đáp ứng miễn dịch thể dịch và tế bào gây ra được xác định. Kết quả là, đã nhận thấy là 100% khí có đáp ứng miễn dịch kháng virut của kháng thể trung hoà đối với tất cả các typ huyết thanh của virut. Ngoài ra, thử nghiệm đáp ứng miễn dịch tế bào cho thấy sự cảm ứng đáp ứng dương tính ở tất cả động vật được thử nghiệm.

Công trình này, xét về mặt toàn thể, thể hiện khả năng bảo vệ của bốn protein DIIC với oligonucleotit SEQ ID NO. 1 đã được tạo kết tụ đối với tất cả bốn typ huyết thanh DV.

Sáng chế còn đề cập chế phẩm vaccin đặc trưng ở chỗ chứa hai kháng nguyên thể khảm được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 7 và SEQ ID No. 8. Một đối tượng nữa theo sáng chế là chế phẩm vaccin đặc trưng ở chỗ chứa bốn kháng nguyên thể khảm được nhận diện là SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 7 và SEQ ID No. 8.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất axit nucleic đặc trưng ở chỗ trình tự được nhận diện là SEQ ID NO. 1. Như được thể hiện đầy đủ trong sáng chế, axit nucleic nêu trên là hữu ích cho sự tăng đáp ứng miễn dịch đối với kháng nguyên của vaccin mà chứa ít nhất 50% trình tự của protein capsit của DV. Theo một phương án theo sáng chế, điều đã được minh chứng là sử dụng axit nucleic được nhận diện là SEQ ID NO.1 để gia tăng đáp ứng miễn dịch cho kháng nguyên tái tổ hợp chứa axit amin 1 đến 99 của protein capsit của DV. Theo một phương án đặc biệt, sử dụng axit nucleic được nhận diện là SEQ ID NO. 1 để gia tăng đáp ứng miễn dịch đối với kháng

nguyên thể khảm này được nhận diện là SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 7 và SEQ ID No. 8 được bộc lộ.

Ngoài ra, một đối tượng của sáng chế là phương pháp gây ra đáp ứng miễn dịch chống lại DV khác biệt ở chỗ đối tượng được cho dùng chế phẩm vacxin chứa a) ít nhất một kháng nguyên chứa ít nhất 50% trình tự protein từ capsit của DV và b) oligonucleotit được nhận diện là SEQ ID NO. 1. Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp gây ra đáp ứng miễn dịch chống lại DV khác biệt ở chỗ chế phẩm như vậy chứa kháng nguyên tái tổ hợp chứa axit amin 1 đến 99 của protein nêu trên. Theo một phương án của phương pháp nêu trên, kháng nguyên tái tổ hợp là kháng nguyên thể khảm có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 7 và SEQ ID No. 8.

Theo sáng chế nghiên cứu được thực hiện ở chuột nhắt với mục đích làm giảm tổng liều của mỗi protein DIIC trong lịch trình gây miễn dịch. Để cho mục đích này, hai dạng bào chế lưỡng trị khác nhau được cấp liên tiếp, và liều nhắc lại thứ ba được cấp. Kết quả là, không nhận thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm được thử nghiệm về bất kỳ trong số bốn typ huyết thanh của virut, mà cho thấy là có thể, bằng cách việc cấp liên tiếp dạng bào chế lưỡng trị và nhắc lại bằng dạng bào chế tứ trị của DIIC, chứa oligonucleotit SEQ ID NO. 1, để thu được cùng mức sinh miễn dịch so với ba liều dạng bào chế tứ trị DIIC, với oligonucleotit SEQ ID NO. 1. Do đó, một đối tượng theo sáng chế là phương pháp gây ra đáp ứng miễn dịch chống lại DV trong đó chế phẩm vacxin chứa kháng nguyên thể khảm này được nhận diện là SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 7 và SEQ ID No. 8 được cho sử dụng theo trình tự trong các chế phẩm lưỡng trị. Sáng chế còn đề xuất phương pháp trong đó ngoài ra, cấp chế phẩm nhắc lại chứa hế phẩm tứ trị của bốn kháng nguyên thể khảm được nhận diện là SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 7 và SEQ ID No. 8.

Như được chỉ ra trong các ví dụ, các chế phẩm chứa ít nhất một kháng nguyên mà chứa ít nhất 50% trình tự của protein capsit của DV và oligonucleotit được nhận diện là SEQ ID NO. 1 có tính miễn dịch khi dùng qua các đường khác nhau, nên các

phương pháp theo sáng chế chế phẩm vaccin này được cấp theo các đường đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong “lĩnh vực kỹ thuật được đề cập”, ví dụ qua đường dưới da, nội bì hoặc qua bắp.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. đánh giá tính sinh miễn dịch ở chuột nhắt của protein đã được tạo kết tụ DIIC-2 với các oligonucleotit khác nhau có trình tự xác định

Trên cơ sở bằng chứng của khái niệm ở chuột nhắt bằng protein DIIC-2 bằng cách sử dụng hỗn hợp gồm các oligonucleotit khoảng 50 b, có trình tự không biết, bằng cách được lựa chọn ngẫu nhiên cho sự tạo khối kết tụ protein (Valdes et al, Virology 2009; 394:249-258), các oligonucleotit khác nhau có trình tự xác định được thử nghiệm. Ngược lại với các báo cáo trong tài liệu liên quan đến khả năng dùng làm tá chất của các oligonucleotit, các nghiên cứu được thử nghiệm trong nghiên cứu này được thực hiện chỉ bằng các mối liên kết phosphodiester. Hai oligonucleotit gồm 39 bazơ cũng được đưa vào, mà không được phân loại trong các oligonucleotit thể hiện hoạt tính tá chất, như được xác định trong tài liệu.

Các oligonucleotit được thử nghiệm là:

Oligonucleotit K3 (SEQ ID NO. 2): ATCGACTCTCGAGCGTTCTC, 20 me (nó chứa motif CpG cho người và khỉ. Khung chính của các mối liên kết phosphodiester)

Oligonucleotit 2216 (SEQ ID NO. 3): GGGGGACGATCGTCGGGGG, 19 me (nó chứa motif CpG cho chuột nhắt và khỉ. Khung chính của các mối liên kết phosphodiester)

Oligonucleotit hỗn hợp (SEQ ID NO. 1): ATCGACTCTCGAGCGTTCTCGGGGGACGATCGTCGGGGG, 39 me (nó chứa trình tự của các oligonucleotit K3 và 2216, khung chính của các mối liên kết phosphodiester)

Oligonucleotit OriC (SEQ ID NO. 4):

CATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTG 39 me. (khung chính của các mối liên kết phosphodiester)

Poly I:C khung chính của ARN: ICICICICICICICICICICICICIC 26 me.

(khung chính của các mối liên kết phosphodiester)

Poly I:C khung chính của ADN: ICICICICICICICICICICICICIC 26 me.

(khung chính của các mối liên kết phosphodiester)

Phản ứng tạo khối kết tụ được thực hiện với tỷ số khối lượng của protein so với khối lượng oligonucleotit để cho phép kết tủa 50% của protein để có thông số ổn định: lượng tương đương của protein hòa tan và đã được tạo kết tụ trong chế phẩm.

Protein kết tụ DIIC-2 với các oligonucleotit khác nhau được đánh giá ở chuột nhắt BALB/c. Các nhóm này là:

Nhóm 1: DIIC-2 hòa tan (không kết tụ và mà không oligonucleotit) (20 µg protein)

Nhóm 2: DIIC-2 với oligonucleotit hỗn hợp (SEQ ID NO. 1): (20 µg protein + 2 µg oligonucleotit)

Nhóm 3: DIIC-2 với oligonucleotit poly:IC, ARN (20 µg protein + 2 µg oligonucleotit)

Nhóm 4: DIIC-2 với oligonucleotit poly:IC, ADN (20 µg protein + 2 µg oligonucleotit)

Nhóm 5: DIIC-2 với oligonucleotit 2216 (SEQ ID NO. 3) (20 µg protein + 2 µg oligonucleotit)

Nhóm 6: DIIC-2 với oligonucleotit K3 (SEQ ID NO. 2) (20 µg protein + 2 µg oligonucleotit)

Nhóm 7: DIIC-2 với oligonucleotit OriC (SEQ ID NO. 4) (20 µg protein + 2 µg oligonucleotit)

Nhóm 8: DIIC-2 được gia nhiệt (đối chứng của kết tủa mà không có oligonucleotit) (nó chứa một nửa protein kết tủa (10 µg) và một nửa hòa tan (10 µg))

Nhóm 9: Thuốc vờ với oligonucleotit hỗn hợp (SEQ ID NO. 1) (2 µg)

Nhóm 10: 10^2 pfu của gây nhiễm DV2

Tất cả các biến thể được bào chế trên phèn là tá chất cơ bản và động vật này nhận ba liều cứ cách 15 ngày đường trong màng bụng. Sau liều thứ ba, việc phát hiện kháng thể dễ phản ứng với DV2 được xác định bằng ELISA bắt giữ, theo đó các hiệu giá ở pha loãng điểm cuối của huyết thanh của các động vật này được xác định. Như được chỉ ra trên Fig 1, hiệu giá cao của kháng thể kháng virus cho tất cả các nhóm được thử nghiệm được phát hiện, mà không có sự khác biệt thống kê giữa chúng ($p > 0,05$), điều này chứng tỏ rằng sự tạo khối kết tụ của protein thể khảm DIIC - 2 không ảnh hưởng đến đáp ứng của kháng thể kháng virus.

Với mục đích xác định chức năng của các kháng thể được tạo ra bằng cách gây miễn dịch, thử nghiệm trung hoà virus *in vitro* cũng được thực hiện. Bảng 1 thể hiện hiệu giá trung hoà chống lại DV2. Hiệu giá trung hoà được định nghĩa là pha loãng cao nhất mà tại đó sự giảm 50% ở một số đĩa đạt được. Như có thể được nhận thấy, động vật ở tất cả các nhóm này là dương tính bằng cách trung hoà bằng 100% sự chuyển hóa huyết thanh và giá trị trung bình hình học (GMT) là cao hơn 1:70.

Bảng 1. Sự phát triển của kháng thể trung hoà đối với DV2 ở các nhóm được thử nghiệm

Nhóm	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
GMT	153	121	149	73	149	98	107	111	<10	69

Khả năng của protein đã được tạo kết tụ DIIC-2 với các oligonucleotit khác nhau cũng đánh giá theo sơ đồ này, để tạo ra đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào.

để thực hiện điều này, các tế bào lá lách của động vật được gây miễn dịch bằng mỗi biến thể được chiết và sự tiết của IFN- γ trong môi trường nuôi cấy dịch nổi trên bề mặt của tế bào lách được đo sau kích thích bằng DV2 gây nhiễm. Fig 2 thể hiện các giá trị của sự tiết xytokin của mỗi nhóm và giá trị phần trăm của đáp ứng động vật. Mặc dù lượng đáng kể sự tiết thu được ở tất cả các nhóm, chỉ nhóm được gây miễn dịch bằng protein đã được tạo kết tụ này với protein oligonucleotit SEQ ID NO. 1 cho thấy có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê đối với nhóm mẫu đối chứng âm tính. Ngoài ra, ở nhóm đó 100% số động vật đáp ứng dương tính. Xem xét cả giá trị phần trăm của đáp ứng động vật và giá trị trung bình của nồng độ của IFN- γ trong thử nghiệm đáp ứng miễn dịch tế bào, chế phẩm của protein đã được tạo kết tụ DIIC-2 với các oligonucleotit: được trộn (SEQ ID NO. 1), 2216 (SEQ ID NO. 3), K3 (SEQ ID NO. 2), và Ori C (SEQ ID NO. 4) được lựa chọn cho thử nghiệm bảo vệ.

Để thực hiện nghiên cứu này, các nhóm 15 chuột nhất sau đây được tạo ra:

Nhóm 1: DIIC-2 oligonucleotit hỗn hợp (SEQ ID NO. 1) (5 μ g protein + 0,5 μ g oligonucleotit)

Nhóm 2: DIIC-2 oligonucleotit 2216 (SEQ ID NO. 3) (5 μ g protein + 0,5 μ g oligonucleotit)

Nhóm 3: DIIC-2 oligonucleotit K3 (SEQ ID NO. 2) (5 μ g protein + 0,5 μ g oligonucleotit)

Nhóm 4: DIIC-2 oligonucleotit OriC (SEQ ID NO. 4) (5 μ g protein + 0,5 μ g oligonucleotit)

Nhóm 5: Thuốc vờ với oligonucleotit hỗn hợp (SEQ ID NO. 1) (0,5 μ g)

Nhóm 6: 10^2 pfu DV2 gây nhiễm

Tất cả các biến thể được bào chế trên phèn là tá chất cơ bản và động vật này nhận ba liều cứ cách 15 ngày qua đường trong màng bụng. Hai tháng sau khi bắt đầu

gây miễn dịch, 10 động vật ở mỗi nhóm được thử thách bằng liều lượng gây chết trung bình 50 (LD₅₀) virus thích hợp thần kinh tương đồng, và nhận thấy là đối với 21 ngày để đo lường sự sống sót. Fig 3A đề xuất phần trăm sống sót thu được. Như được nhận thấy, hơn 80% chuột nhất nhận chế phẩm DIIC-2 với oligonucleotit SEQ ID NO. 1 sống sót qua thử thách virus mà không sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm đối chứng dương tính được gây miễn dịch bằng DV2 ($p > 0,05$). Ngược lại, chỉ 10% động vật từ nhóm mẫu đối chứng âm tính sống sót qua thử thách virus, với sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở nhóm được gây miễn dịch bằng DIIC-2 và oligonucleotit SEQ ID NO. 1, và đối chứng dương tính ($p < 0,05$). Ngoài ra, động vật được gây miễn dịch bằng dạng bào chế chứa các oligonucleotit 2216, K3 và OriC không đến mức sống sót với sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm thuốc vờ.

Năm động vật còn lại ở mỗi nhóm nhận 500 LD₅₀ của cùng virus, và 7 ngày sau thử thách virus tất cả động vật được giết chết để loại bỏ não, và tải lượng virus được đo ở các tế bào VERO. Phù hợp với sự sống sót nhận thấy trên Fig 3A, chuột nhất được gây miễn dịch bằng chế phẩm DIIC-2 với oligonucleotit SEQ ID NO. 1 có tải lượng virus trong não thấp ($< 10^2$ pfu/ml), mà không sự khác biệt thống kê so với nhóm đối chứng dương tính ($p > 0,05$), trong khi đó chuột nhất ở nhóm nhận chế phẩm thuốc vờ nhận tải lượng virus cao hơn 10^4 pfu/ml là giá trị trung bình (Fig 3B). Động vật được gây miễn dịch bằng dạng bào chế chứa các oligonucleotit 2216, OriC và K3 nhận mức trung gian tải lượng virus nằm trong khoảng đạt được với chế phẩm DIIC-2 và oligonucleotit SEQ ID NO. 1, và chế phẩm thuốc vờ, không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa chúng.

Ví dụ 2. Bằng chứng ở không phải là người các loại linh trưởng được gây miễn dịch bằng protein đã được tạo kết tụ DIIC-2 và các hạt như nucleocapsit thu được từ protein capsit DV2 tái tổ hợp

Trên cơ sở các nghiên cứu tiền lâm sàng ở chuột nhất, các tác giả sáng chế được đánh giá protein đã được tạo kết tụ này DIIC-2 với oligonucleotit SEQ ID NO. 1, và dùng tá chất phen ở các động vật linh trưởng không phải là người âm tính với DV. Ngoài ra, một nhóm nhận NLPs-2 (chứa oligonucleotit SEQ ID NO 1.) được

đánh giá. Ngược lại, nhóm thuốc vờ nhận dạng bào chế chứa lượng tối đa oligonucleotit SEQ ID NO. 1, được sử dụng trong quá trình tạo khối kết tụ protein tái tổ hợp được cho tá chất là phen. Ba động vật được bao gồm ở tất cả các nhóm trong lịch trình gây miễn dịch.

Liều được lựa chọn cho DIIC -2 là 100 μ g protein và 10 μ g oligonucleotit SEQ ID NO. 1, trong khi đó với NLPs-2 liều này là 50 μ g protein và 10 μ g oligonucleotit SEQ ID NO. 1. Khi nhận bốn liều dưới da, cứ cách 2 tháng. Máu được thu gom ở thời điểm của mỗi liều và mười lăm ngày sau, để đo thể dịch đáp ứng miễn dịch sinh ra. Fig 4 thể hiện các thông số động học của sự xuất hiện của kháng thể kháng DIIC-2. Như có thể được nhận thấy, ở khi mà nhận chế phẩm DIIC-2 kháng thể bắt đầu được phát hiện 15 ngày sau khi cấp liều đầu tiên. Hiệu giá được tăng lên sau khi tiêm chủng liều thứ hai, ở các giá trị lớn hơn 10000. Sau liều thứ ba, hiệu giá được tăng lên đôi chút, và sau liều thứ tư chúng được giữ ở cùng một mức (giá trị trung bình: 80000). Đáp ứng của kháng thể kháng capsit ở nhóm được gây miễn dịch bằng NLPs-2 là tương tự (Fig 4). Việc phát hiện kháng thể kháng DV2 để phản ứng được xác định bằng ELISA bắt giữ, theo đó các hiệu giá ở pha loãng điểm cuối của huyết thanh của các động vật này được xác định. Kết quả của nghiên cứu động học của sự phát triển của kháng thể kháng virus được thể hiện ở Fig 5. Kháng thể kháng virus ở khi mà nhận chế phẩm DIIC -2 với oligonucleotit SEQ ID NO. 1, bắt đầu được phát hiện 15 ngày sau khi cấp liều thứ hai (giá trị trung bình: 6000), và giảm xuống đến mức không thể phát hiện được ở thời điểm liều thứ ba, tức là 2 tháng sau nhận sự tiêm chủng thứ hai tác nhân gây miễn dịch. Sau đó, sau khi cấp liều thứ ba, các hiệu giá được tăng lên tới mức tương tự với mức thu được 15 ngày sau liều thứ hai, nhưng ở thời điểm này chúng được giữ có thể phát hiện được (trung bình: 800) khi liều thứ tư, mà tương ứng với 2 tháng sau liều thứ ba. Hơn nữa, khi nhận sự tiêm chủng thứ tư động vật phát triển kháng thể với các giá trị đôi chút cao hơn các giá trị được phát hiện ở thời điểm việc cấp, và các giá trị được giữ cho đến thời gian thử thách virus với giá trị trung bình 5000. Khi liều virus được đưa ra, có thể phát hiện sự tăng nhẹ hiệu giá kháng thể ở 20 và 27 ngày sau thử thách, với các giá trị trung bình bằng 12000.

Đáp ứng trung hoà của kháng thể cũng được đo trong nghiên cứu này, vì nó thể hiện mối liên hệ có thể có của bảo vệ đối với virus này. Bảng 2 thể hiện các giá trị thu được đối với mỗi mẫu, ở thời điểm chỉ ra bằng cách sử dụng dòng tế bào Vero và chủng SB8553 DV2.

Như được nhận thấy, kháng thể trung hoà có thể được phát hiện sau khi cấp liều thứ hai DIIC-2. 15 ngày sau sự tiêm chủng thứ ba hiệu giá cao hơn được phát hiện, mà được giữ ở thời điểm cấp thứ tư. Sau 15 ngày, các hiệu giá được tăng lên, cho thấy tác dụng nhắc lại rõ ràng. Ngược lại, một tháng sau liều cuối, ở thời điểm thử thách virus, mức cao của kháng thể trung hoà ở tất cả động vật được gây miễn dịch bằng DIIC-2 được phát hiện. Đối với nhóm nhận NLPs-2, như được dự tính, đáp ứng trung hoà không được phát hiện ở thời điểm bất kỳ được đánh giá trước thử thách virus (hiệu giá trung hoà nhỏ hơn 10, số liệu không được thể hiện.) Nhóm thuộc về thể hiện tương tự với hiệu giá trung hoà nhỏ hơn 10 (số liệu không được thể hiện).

Bảng 2. Sự phát triển của kháng thể trung hoà với DV2 trong lịch trình gây miễn dịch ở khi bằng protein DIIC-2 đã được tạo kết tụ và PSNs-2.

	Liều 2	15	Liều 3	15	Liều 4	15	Thử
	Tháng	ngày	Tháng	ngày	Tháng	ngày	thách
	2		4		6		Tháng 7
	<10	150,4	<10	620,5	207,1	888,1	1219,8
DIIC-2	<10	<10	<10	23,6	26,2	79,8	57,7
	<10	13	<10	146,2	146,5	297,7	670,3
GMT	<10	26,9	<10	128,9	92,6	276,3	361,3
Chuyển hóa huyết thanh	0%	66,7%	0%	100%	100%	100%	100%

Một tháng sau liều cuối, đối với nhóm DIIC-2, kháng thể trung hoà cũng được xác định, bằng cách sử dụng ba chủng virus và ba dòng tế bào khác nhau. Ở tất

cả các trường hợp các tác giả sáng chế được phát hiện 100% sự chuyển hóa huyết thanh, điều này chứng tỏ sự cảm ứng đáp ứng trung hoà mạnh (Bảng 3).

Bảng 3. Hiệu giá kháng thể trung hoà được gây ra bởi protein đã được tạo kết tụ DIIC-2 với oligonucleotit SEQ ID NO. 1, ở thời điểm thử thách, bằng cách sử dụng ba dòng tế bào khác nhau và chủng virut

Hiệu giá trung hoà của mỗi động vật độc lập được thể hiện, cũng như GMT và giá trị phần trăm của sự chuyển hóa huyết thanh đạt được bằng hệ thử nghiệm được sử dụng.

Dòng tế bào	BHK-21		Vero		LLC-MK2	
	Chủng DV-2	A15	SB8553	WHO	SB8553	SB8553
DIIC-2		110	415,2	3861,4	1219,8	1143,8
		55	14,9	169,6	57,7	62,1
		150	156,2	669,7	670,3	216,1
GMT		96,8	98,9	759,8	361,3	248,5
Sự chuyển hóa huyết thanh		100%	100%	100%	100%	100%

Đáp ứng miễn dịch tế bào là các thông số được đo trong nghiên cứu này. Các tế bào lympho máu ngoại biên, được phân lập ở bốn thời điểm: ngày liều thứ tư, 15 ngày sau liều thứ tư, ngày thử thách virut, và 27 ngày sau thử thách virut, đã được kích thích bằng DV2 gây nhiễm, và sự tiết của TNF- γ được đo trong môi trường nuôi cấy dịch nổi trên bề mặt. Fig 6 thể hiện các giá trị thu được ở mỗi điểm được thử nghiệm. Trong số ba động vật được gây miễn dịch bằng DIIC -2 và oligonucleotit SEQ ID NO. 1, một (khí 6) tạo ra sự tiết TNF- γ ở ba điểm được bàn luận, trước khi

thử thách virut. Ngược lại, sau khi gây nhiễm, vào ngày 27, một khi khác của nhóm này cũng là dương tính, điều này chứng tỏ đo lường của đáp ứng tế bào.

Hơn nữa, trong số ba con nhận NLPs-2, hai con là dương tính với TNF- γ vào ngày thử thách virut. Ngược lại, sau khi gây nhiễm, vào ngày 27, ba khi ở nhóm này là dương tính, điều này chứng tỏ trong trường hợp này còn đo lường đáp ứng tế bào. Điều quan trọng là, không có động vật nhận chế phẩm thuốc vờ nào có sự tiết kháng virut các xytokin ngay cả sau thử thách virut.

Để đo lường bảo vệ chống lại DV2, tất cả thử nghiệm động vật được thử thách bằng liều gây nhiễm liều virut, một tháng sau liều cuối. Với sự có mặt của virut trong máu được xác định bằng đo trực tiếp trong dòng tế bào VERO. Fig 7 thể hiện các kết quả thu được; động vật mà nhận chế phẩm thuốc vờ phát triển virut huyết trong giá trị trung bình 3,6 ngày, và với tải lượng virut trung bình 10^2 pfu/ml. Ngược lại, hai con khi nhận dạng bào chế protein DIIC-2 với oligonucleotit SEQ ID NO. 1, không phát triển virut huyết và do đó được phân loại là được bảo vệ hoàn toàn. Ở động vật (khi 5), virut được phát hiện vào ngày 5, và với tải lượng virut rất thấp (<10 pfu), cũng biểu thị mức bảo vệ đáng kể.

Trong trường hợp nhóm nhận NLP -2, sự có mặt của virut được phát hiện ở tất cả khi, nhưng tải lượng virut là tải lượng so với tải lượng được phát hiện ở nhóm đối chứng. Thực tế, khi 9 nhận rất thấp tải lượng virut (<10 pfu), điều này cũng chứng tỏ mức bảo vệ đáng kể.

Nhìn chung, các tác giả sáng chế có thể nói rằng protein đã được tạo kết tụ trên cơ sở capsit của virut với oligonucleotit SEQ ID NO. 1, cảm ứng đáp ứng có tác dụng bảo vệ ở khi.

Ví dụ 3. Thu nhận và xác định đặc điểm của protein: DIIC-1 DIIC-3 và DIIC-4

Mảnh gen BamHI/HindIII chứa DomIII từ protein vỏ ngoài của typ huyết thanh DV 1, 3 và 4 (axit amin 286-426) được tách dòng vào vị trí đa nhân dòng vô tính của plasmit pET28, dung hợp với protein capsit của cùng virut. Vật truyền biểu

hiện này được cải biến trước, làm giảm trình tự gen giữa vị trí NcoI và BamHI, ngoại trừ nhãn Histidin, để tách sự dịch mã axit amin không có mối liên hệ với protein tách dòng. Cấu trúc di truyền của plasmit này được thể hiện ở Fig 8.

Trong tất cả các trường hợp, protein dung hợp với nhãn Histidin ở đầu tận N của nó, và được biểu hiện dưới sự điều hoà của gen khởi đầu T7 lac. Điều này cho phép, một khi được biểu hiện, phát triển quy trình tinh chế của protein nêu trên bằng cách kết hợp phương pháp sắc ký trao đổi ion và phương pháp sắc ký ái lực bằng các chelat kim loại. Cùng một phương pháp được sử dụng để tinh chế protein DIIC-2 thu được trước đây. Khi cả bốn protein tái tổ hợp được tinh chế, các tác giả sáng chế tiến hành đặc tả chúng. Trước hết, khả năng phản ứng của mỗi protein được phân tích đối với huyết thanh đa dòng từ chuột nhất được gây miễn dịch bằng mỗi chế phẩm virut, cụ thể dịch siêu miễn dịch kháng DV của mỗi typ huyết thanh (HMAF). Như được chỉ ra trên Fig 9, khả năng phản ứng thu được bằng ELISA của mỗi protein đối với HMAF từ virut tương đồng typ huyết thanh, điều này chứng tỏ sự trình diện đúng của vùng DomIII liên quan đến capsit, vì phần lớn các kháng thể này được sinh ra chống lại protein vỏ ngoài của virut là cấu dạng. Hơn nữa, trạng thái của liên kết disulfua (S-S) trong vùng DomIII được nghiên cứu, mà phải có mặt trong mỗi thể khảm phân tử. Trước hết, nó được kiểm tra bằng phổ khối cho mỗi protein, và cấu dạng chính xác của mỗi liên kết được kiểm tra. Sau đó, trên cơ sở là liên kết S-S tham gia trực tiếp vào khả năng phản ứng của DomIII đối với huyết thanh đa dòng kháng DV, khả năng phản ứng của mỗi protein tái tổ hợp đối với HMAF từ typ huyết thanh tương đồng được phân tích lại trong điều kiện khử và không khử. Như được chỉ ra trên Fig 9, đối với DIIC-1, 2 và 4 protein, có sự giảm khả năng phản ứng với HMAF tương đồng khi protein được khử ngược bởi quá trình alkyl hoá. Với DIIC-3 cũng nhận thấy có sự giảm, mặc dù kém hơn so với các protein còn lại. Các kết quả này khẳng định cấu hình chính xác của liên kết S-S và vai trò có thể có của nó trong khả năng phản ứng của DomIII với kháng thể đa dòng kháng DV.

Ví dụ 4. đánh giá miễn dịch của dạng bào chế đơn trị và tứ trị DIIC ở chuột nhắt

Mỗi protein thể khảm đã được tạo kết tụ trước với oligonucleotit SEQ ID NO. 1 và hỗn hợp tứ trị của bốn phân tử đã được tạo kết tụ được đánh giá ở chuột nhắt BALB/c. Tất cả các chế phẩm được bào chế trên phen là tá chất cơ bản, và được cấp ở động vật theo ba liều cứ cách 15 ngày trong màng bụng. Làm đối chứng dương tính, bao gồm bốn nhóm được gây miễn dịch bằng mỗi typ huyết thanh virus. Làm mẫu đối chứng âm tính, một nhóm nhận thuốc vờ với cùng lượng các oligonucleotit trong dạng bào chế tứ trị, và được cho tá chất là phen. Lượng protein cho dạng bào chế tứ trị là 20 µg mỗi và 8 µg tổng oligonucleotit SEQ ID NO. 1. Dạng bào chế đơn trị chứa 20 µg protein và 2 µg oligonucleotit SEQ ID NO. 1.

Sau liều thứ ba, việc phát hiện kháng thể dễ phản ứng với mỗi virus được xác định bằng ELISA bắt giữ (Fig 10), thông qua đó các hiệu giá được xác định ở pha loãng điểm cuối của huyết thanh của các động vật này. Động vật nhận dạng bào chế đơn trị có hiệu giá cao với kháng thể kháng virus đối với các typ huyết thanh 1, 2 và 3, trong khi đó động vật được gây miễn dịch bằng DIIC-4, không có hiệu giá đối với typ huyết thanh tương đồng (DV4). Tuy nhiên, động vật nhận dạng bào chế tứ trị Tetra-DIIC phát triển kháng thể chống lại DV4, nhưng có hiệu giá thấp hơn so với typ huyết thanh kia. Kết quả này cho thấy là hỗn hợp của bốn protein tạo thuận lợi cho sự cảm ứng kháng thể với DV4, có thể thông qua một số mức phản ứng chéo với các typ huyết thanh khác.

Với mục đích xác định chức năng của các kháng thể được tạo ra bằng cách gây miễn dịch bằng dạng bào chế tứ trị Tetra-DIIC, thử nghiệm trung hoà virus *in vitro* (Bảng 4) đối với typ huyết thanh 1, 2, 3 và 4 được thực hiện. Thử nghiệm được thực hiện theo hướng dẫn của World Health Organization (WHO), và bằng cách sử dụng chủng tham khảo. Chuột nhắt được gây miễn dịch bằng DIIC-1, 2 và 3 protein nhận hiệu giá cao của kháng thể trung hoà đối với virus tương đồng, có thể so sánh được với mức thể hiện bởi virus có thể sao chép ở chuột nhắt của nhóm đối chứng. Động vật được gây miễn dịch bằng protein DIIC-4 không thể hiện đáp ứng này, trong đó phù hợp với các kết quả của đáp ứng kháng virus, không có kháng thể trung hoà

được phát hiện chống lại DV4. Tuy nhiên, dạng bào chế tứ trị, ngoài việc gây ra kháng thể trung hoà chống lại typ huyết thanh 1, 2 và 3, nó cũng gây ra kháng thể chức năng chống lại DV4.

Bảng 4. Hiệu giá kháng thể trung hoà ở chuột nhất được gây miễn dịch bằng dạng bào chế đơn trị và tứ trị của các protein thể ghép DIIC

DV để làm trung hoà				
Các nhóm	DV1	DV2	DV3	DV4
DIIC-1	>500	-	-	-
DIIC-2	-	>500	-	-
DIIC-3	-	-	>500	-
DIIC-4	-	-	-	<10
Tetra DIIC	347,1	>100 0	>100 0	166,34
Đối chứng DV1	188,6	-	-	-
Đối chứng DV2	-	>500	-	-
Đối chứng DV3	-	-	>500	-
Đối chứng DV4	-	-	-	>250

Trong tất cả các trường hợp hỗn hợp gồm huyết thanh từ chuột nhất được phân tích. (-): Không được xác định.

Đáp ứng miễn dịch tế bào là các thông số được đo trong nghiên cứu này. Để thực hiện điều này, các tế bào lá lách của động vật được gây miễn dịch bằng dạng bào chế tứ trị Tetra-DIIC 30 ngày sau liều cuối được chiết và sự tiết IFN- γ trong môi trường nuôi cấy dịch nổi trên bề mặt của tế bào lách được đo sau kích thích bốn protein tái tổ hợp. Như là mẫu đối chứng âm tính, tế bào lách của chuột nhắt được cấy chế phẩm thuốc vờ được sử dụng. Các kết quả thu được được thể hiện ở Fig 11. Như được nhận thấy, mức cao TNF- γ được phát hiện sau kích thích bằng bốn protein tái tổ hợp, điều này chứng tỏ tương đương đáp ứng tế bào thu được với mỗi typ huyết thanh.

Cuối cùng, thử nghiệm bảo vệ được thực hiện trên mô hình bệnh do virus viêm não ở chuột nhắt. Để thực hiện thử nghiệm này, động vật được gây miễn dịch bằng dạng bào chế tứ trị Tetra-DIIC, dạng bào chế đơn trị DIIC-1 và DIIC -4, các động vật đối chứng dương tính (được gây miễn dịch bằng DV1 và DV4, lần lượt) và các động vật được gây miễn dịch bằng chế phẩm thuốc vờ được lựa chọn. Ngược lại, thử thách virus được sử dụng là DV1 và DV4, có khả năng làm chết động vật. Như được chỉ ra trên Fig 12, mức cao bảo vệ thu được đối với typ huyết thanh 1 và 4, cả hai dạng bào chế đơn trị và tứ trị, ở tất cả các trường hợp không có sự khác biệt thống kê so với virus nhóm đối chứng ($p>0,05$). Các kết quả này cho thấy khả năng bảo vệ của chế phẩm được thử nghiệm đối với typ huyết thanh 1 và 4, trên cơ sở protein đã được tạo kết tụ này DIIC với oligonucleotit SEQ ID NO. 1.

Ví dụ 5. Đánh giá miễn dịch ở các động vật linh trưởng không phải là người của dạng bào chế tứ trị Tetra-DIIC

Dạng bào chế tứ trị Tetra DIIC được đánh giá ở chuột nhắt là được đánh giá tương tự ở các động vật linh trưởng không phải là người. Ba nhóm nghiên cứu ba động vật mỗi được tạo ra để nhận dạng bào chế tứ trị thông qua ba đường cấp kháng nguyên khác nhau: Nhóm 1: dưới da, Nhóm 2: Nội bì và Nhóm 3: qua bắp. Các nhóm 1 và 3 được cho 50 μ g mỗi protein thể khảm, đã được tạo kết tụ trước bằng 5 μ g oligonucleotit SEQ ID NO. 1; tất cả được phối trộn và được cho tá chất là phèn. Nhóm 2 nhận 10 lần ít hơn tác nhân gây miễn dịch qua nội bì hơn là hai đường kia; nó là 5 μ g cho mỗi protein và 2 μ g tổng oligonucleotit SEQ ID NO. 1, tất cả được phối

trộn và được cho tá chất là phèn. Nhóm thuốc vờ nhận cùng một lượng oligonucleotit SEQ ID NO. 1 như các nhóm này 1 và 3, được cho tá chất là phèn và qua hấp. Máu được thu gom ở thời điểm mỗi liều, và một tháng sau đo đo đáp ứng miễn dịch thể dịch và tế bào gây ra.

Việc phát hiện kháng thể dễ phản ứng với mỗi typ huyết thanh virus được xác định bằng ELISA bắt giữ, theo đó các hiệu giá ở pha loãng điểm cuối của huyết thanh của các động vật này được xác định. Fig 13 thể hiện đáp ứng của kháng thể kháng virus được tạo ra ở khi sau ba liều dạng bào chế Tetra-DIIC bao gồm oligonucleotit SEQ ID NO. 1. Như được nhận thấy, bất kể đường cấp kháng nguyên nào, khi thể hiện đáp ứng của kháng thể có khả năng nhận biết bốn typ huyết thanh của virus trong Hệ thống ELISA bắt giữ. Ngoài ra, đáp ứng này cho thấy là kiểu mức tương đồng cho bốn DV; là một bước quan trọng cho sự phát triển của vacxin đối với sinh bệnh của người, mà đòi hỏi đáp ứng miễn dịch cân bằng.

Việc đo kháng thể trung hoà được thực hiện bằng cách sử dụng kỹ thuật thử nghiệm trung hoà khử đĩa (PRNT) ở các tế bào VERO, và bằng cách sử dụng chủng virus Jamaica DV1, SB8553 DV2, Nicaragua DV3 và Dominica DV4. Các giá trị thu được sau gây miễn dịch thứ ba được trình bày ở Bảng 5.

Bảng 5. Hiệu giá của kháng thể trung hoà ở các động vật linh trưởng không phải là người được gây miễn dịch bằng dạng bào chế tứ trị bao gồm Tetra DIIC với oligonucleotit SEQ ID NO. 1.

Đường dùng	DV đến làm trung hoà			
	DV1	DV2	DV3	DV4
Dưới da	77,4	215,9	146,5	46,7
	253,7	186,9	138,3	102
	88,5	192,9	668,1	86,1
GMT	120,2	198,2	238,3	74,3
Nội bì	57,1	153,1	617,8	35,6
	44,6	184,3	165,2	42,5
	49,3	88,6	200	494,2
GMT	50,1	135,7	273,3	90,8
Qua bắp	247,2	472,7	254,3	113,1
	47,7	111,4	390,3	121,6
	231,6	215,9	577,5	798,5
GMT	139,8	224,9	385,6	222,3

Tất cả động vật được gây miễn dịch bằng chế phẩm Tetra DIIC tạo ra đáp ứng của kháng thể có khả năng trung hoà virus gây nhiễm *in vitro*, bất kể đường cấp kháng nguyên nào. Việc tạo ra đáp ứng trung hoà của kháng thể với 100% động vật đáp ứng với tất cả bốn typ huyết thanh hiện nay là tiền đề cho sự phát triển của vaccin chống lại Dengue. Trong nhóm thuốc vờ, hiệu giá trung hoà là nhỏ hơn 20 ở tất cả động vật đã được gây miễn dịch.

Đáp ứng miễn dịch tế bào là một trong số các thông số được đo. PBMC được kích thích bằng mỗi trong số các protein tái tổ hợp DIIC, và tần số các tế bào sản xuất TNF- γ được đo bằng thử nghiệm ELISPOT. Fig 14 thể hiện các giá trị thu được. Sau khi cấp ba liều dạng bào chế tứ trị Tetra-DIIC, động vật tạo ra các tế bào có khả năng tiết xytokin kháng virus, kích thích các protein tái tổ hợp, đáp ứng này là tương đối

mạnh hơn ở động vật đã được gây miễn dịch qua bắp. Ở tất cả các nhóm được đánh giá có 100% động vật đáp ứng với bốn protein được thử nghiệm.

Ví dụ 6. Đánh giá miễn dịch ở chuột nhắt cấp phối hợp dạng bào chế lưỡng trị và tứ trị protein DIIC và oligonucleotit SEQ ID NO. 1, trong chế độ căn bản-nhắc lại

Với mục đích chỉ cho hai liều mỗi protein dạng bào chế DIIC trong cùng lịch trình gây miễn dịch, các thiết kế thử nghiệm sau đây được thực hiện:

Nhóm liên tiếp I liều 1: Dạng bào chế lưỡng trị DIIC-1/DIIC-2

liều 2: Dạng bào chế lưỡng trị DIIC-3/DIIC-4

liều 3: Dạng bào chế tứ trị Tetra DIIC

Nhóm liên tiếp II liều 1: Dạng bào chế lưỡng trị DIIC-1/DIIC-3

liều 2: Dạng bào chế lưỡng trị DIIC-2/DIIC-4

liều 3: Dạng bào chế lưỡng trị Tetra DIIC

Nhóm Tetra DIIC: Tất cả liều dạng bào chế tứ trị Tetra DIIC

Các protein thể ghép DIIC, đã được tạo kết tụ trước với oligonucleotit SEQ ID NO. 1, được trộn để tạo ra cả hai dạng bào chế lưỡng trị và tứ trị. Tác nhân gây miễn dịch chứa 20 µg mỗi protein và 4 µg oligonucleotit SEQ ID NO. 1, cho mỗi dạng bào chế lưỡng trị. Lượng protein cho dạng bào chế tứ trị là 20 µg mỗi và 8 µg tổng oligonucleotit SEQ ID NO. 1. Tất cả các biến thể được bào chế trên phèn là tá chất, và được cấp cứ cách 15 ngày trong màng bụng. Nhóm mà chỉ nhận dạng bào chế tứ trị Tetra-DIIC được sử dụng làm đối chứng dương tính và nhóm thuốc vờ làm mẫu đối chứng âm tính.

Sau liều thứ ba, việc phát hiện kháng thể dễ phản ứng với mỗi virus được xác định bằng ELISA bắt giữ (Fig 15), qua đó các hiệu giá ở pha loãng điểm cuối của huyết thanh của các động vật này được xác định. Kết quả là, các tác giả sáng chế đã

phát hiện ra rằng không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm được thử nghiệm cho bất kỳ trong số bốn typ huyết thanh của virus, điều này chứng tỏ rằng có thể thực hiện, thông qua việc cấp liên tiếp dạng bào chế lưỡng trị và nhắc lại bằng tứ trị Tetra-DIIC, để thu được cùng một mức tính sinh miễn dịch mà cấp ba liều với dạng bào chế tứ trị.

Ngoài ra, còn đo đáp ứng miễn dịch tế bào. Các tế bào lá lách từ động vật đã được gây miễn dịch từ mỗi nhóm của nghiên cứu này được tách 30 ngày sau liều cuối, và sự tiết của IFN- γ trong môi trường nuôi cấy dịch nổi trên bề mặt của tế bào lách được đo sau kích thích bằng bốn protein tái tổ hợp. Như là mẫu đối chứng âm tính, tế bào lách của chuột nhất được cấy chế phẩm thuốc vờ được sử dụng. Các kết quả thu được được thể hiện ở Fig 16. Như có thể được nhận thấy, mức cao của TNF- γ được phát hiện sau kích thích bằng bốn protein tái tổ hợp ở tất cả các nhóm (ngoại trừ thuốc vờ), điều này chứng tỏ thu được đáp ứng tế bào tương đương, bất kể chế độ gây miễn dịch được sử dụng và dạng bào chế lưỡng trị được cấp trong hai liều đầu.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm vaccin; khác biệt ở chỗ chế phẩm này chứa a) ít nhất một kháng nguyên tái tổ hợp chứa các axit amin 1 đến 99 của protein capsit của virus Dengue (DV: *dengue virus*) và b) oligonucleotit có trình tự SEQ ID NO. 1.

2. Chế phẩm vaccin theo điểm 1, trong đó kháng nguyên tái tổ hợp chứa axit amin 1 đến 99 của protein capsit là kháng nguyên thể khảm có trình tự được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO. 5 (kháng nguyên DIIC-1), SEQ ID NO. 6 (kháng nguyên DIIC-2), SEQ ID NO. 7 (kháng nguyên DIIC-3), và SEQ ID No. 8 (kháng nguyên DIIC- 4).

3. Chế phẩm vaccin theo điểm 1, đặc trưng ở chỗ nó chứa hai kháng nguyên thể khảm có trình tự được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 7 và SEQ ID NO. 8.

4. Chế phẩm vaccin theo điểm 1, đặc trưng ở chỗ nó chứa bốn kháng nguyên thể khảm có trình tự SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 7 và SEQ ID NO. 8.

5. Oligonucleotit đặc trưng ở chỗ trình tự được nhận diện là SEQ ID NO. 1.

Figure 1

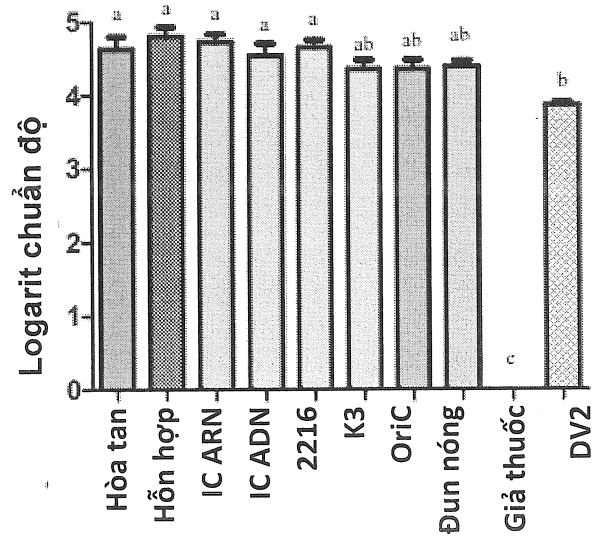


Figure 2

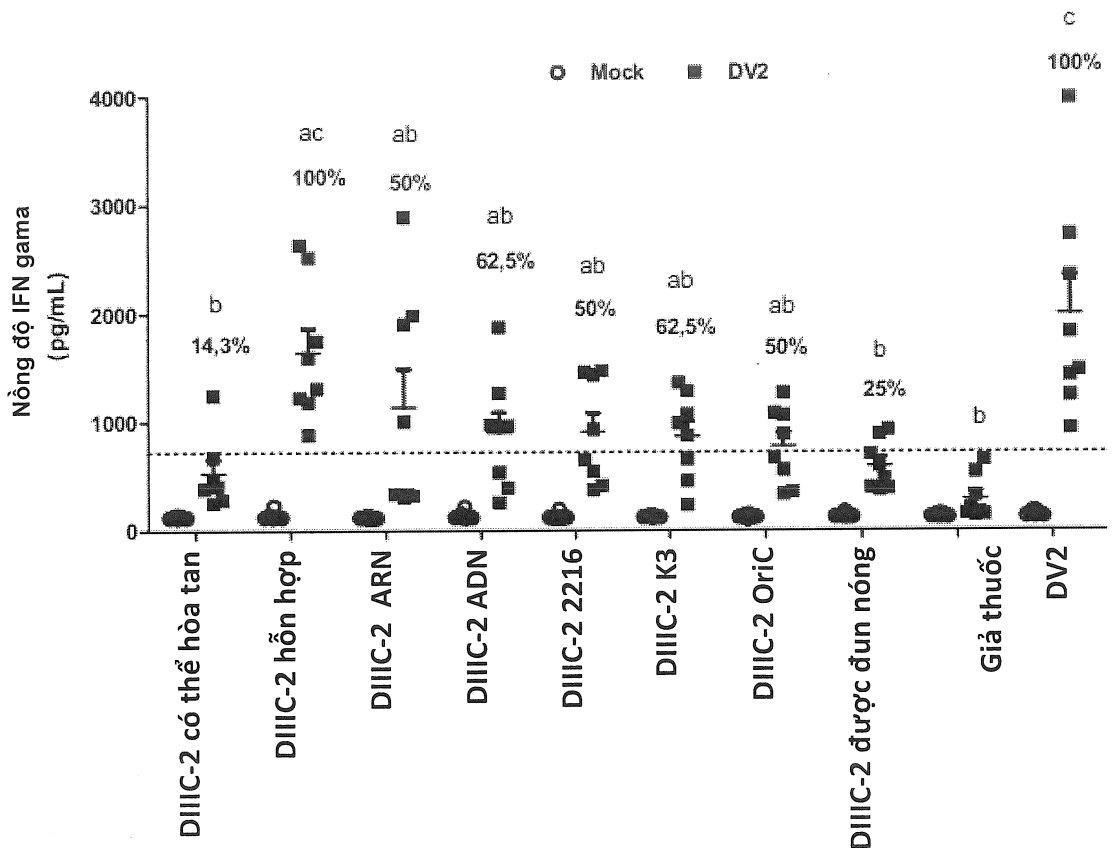


Figure 3

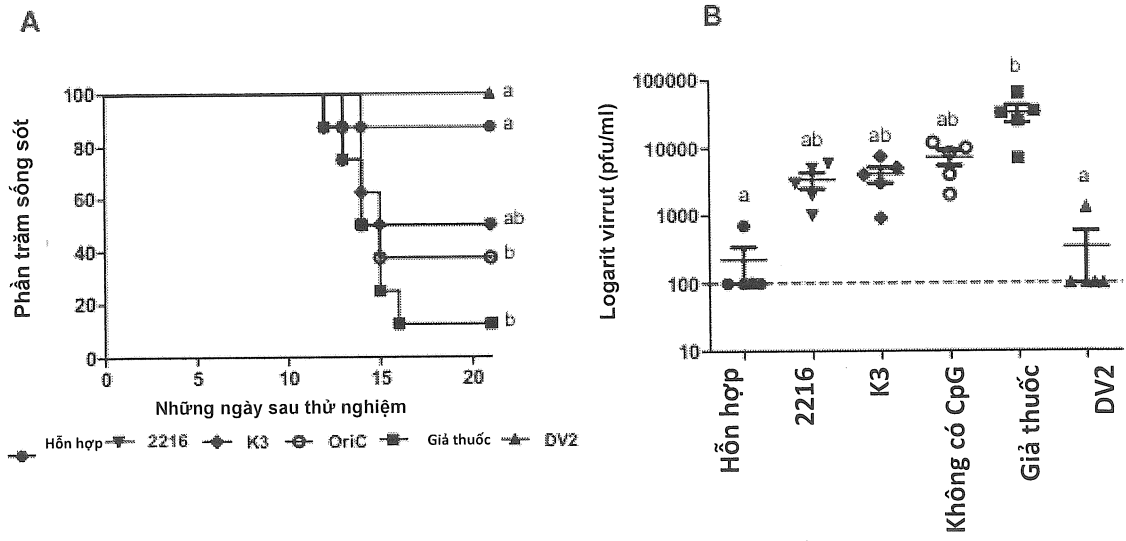


Figure 4

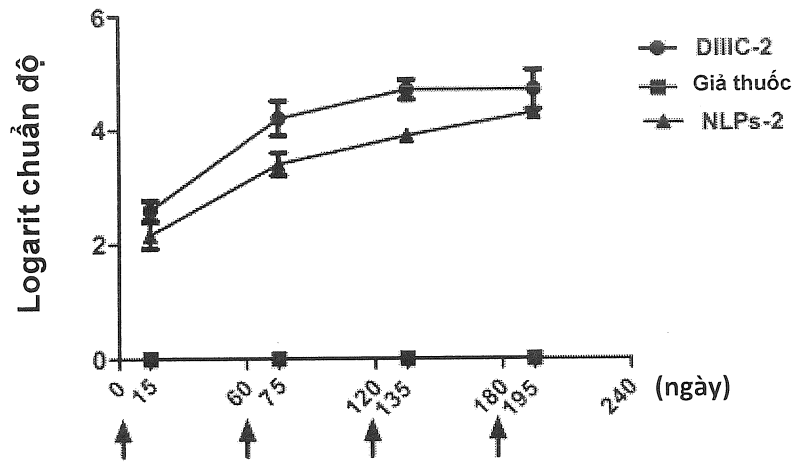


Figure 5

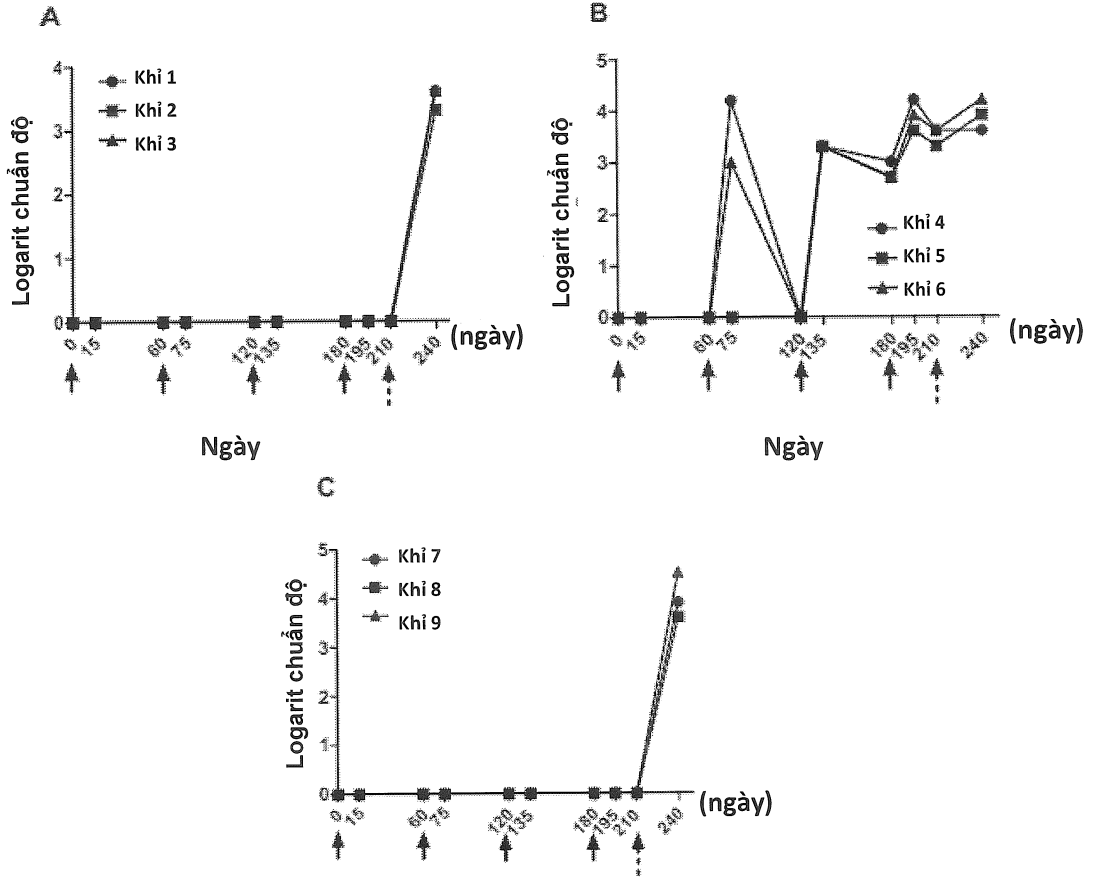


Figure 6

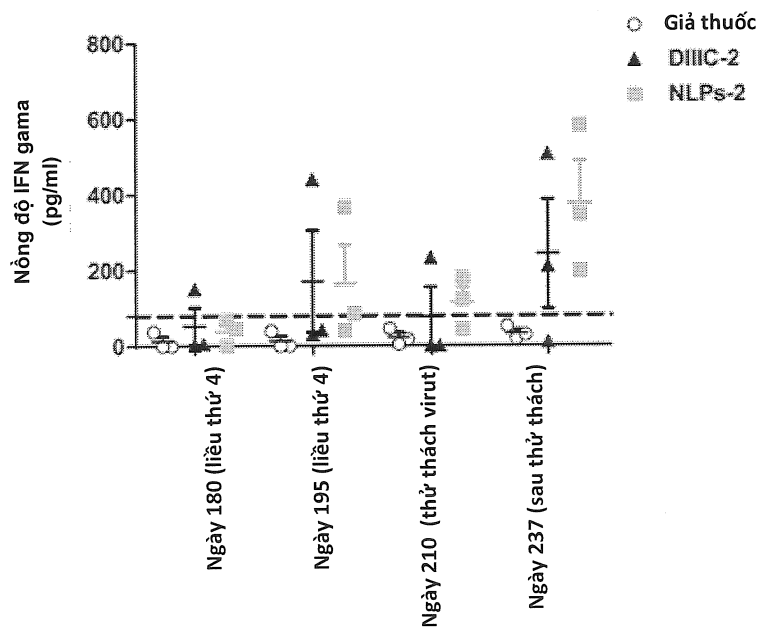


Figure 7

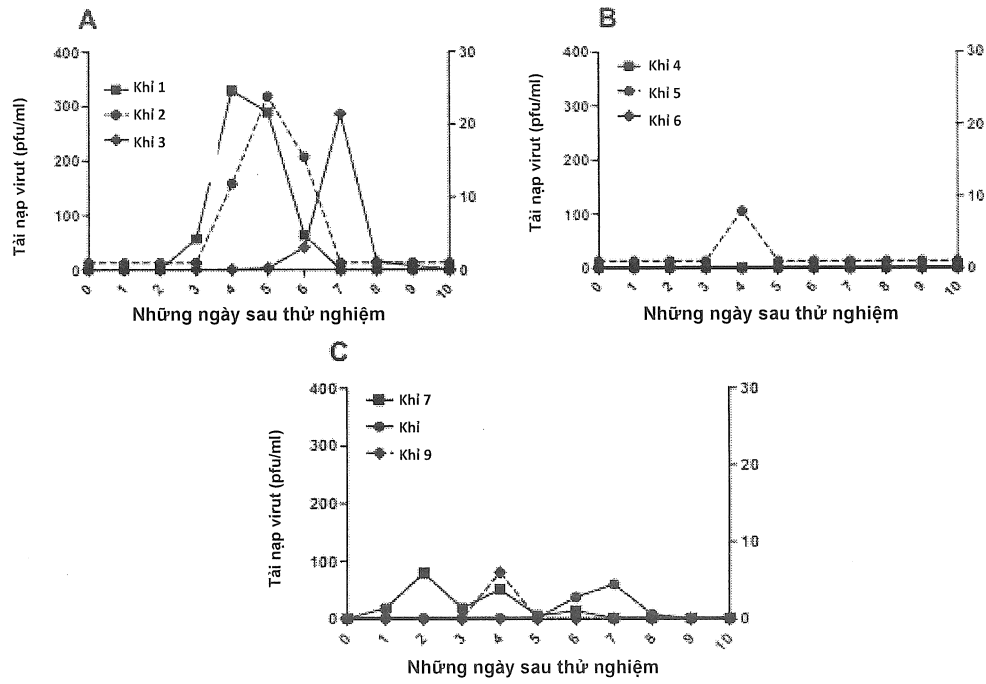


Figure 8

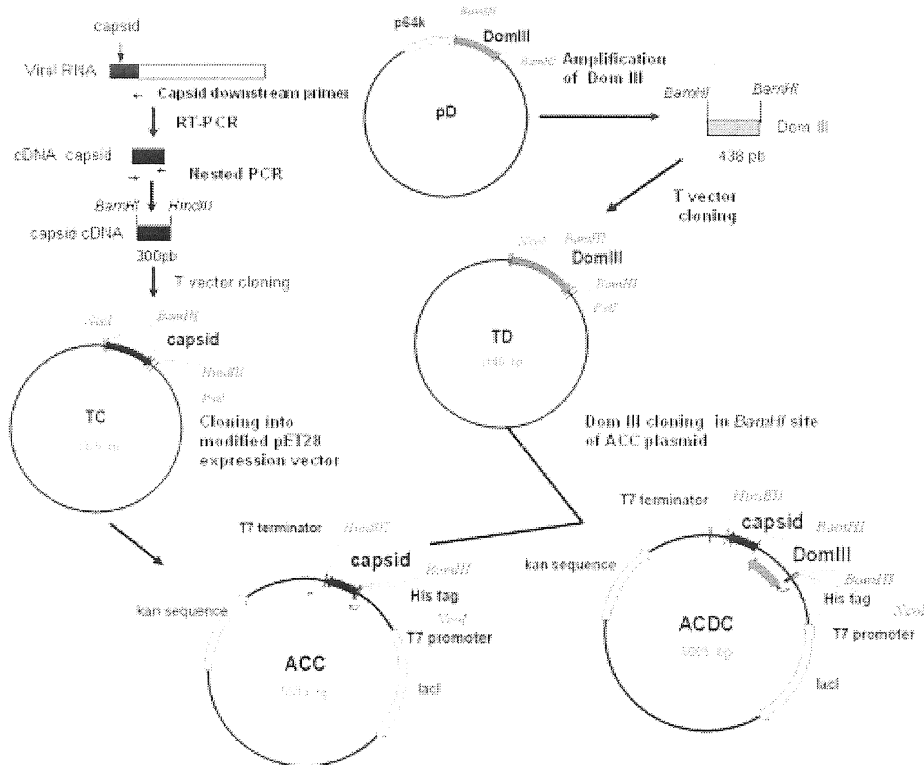


Figure 9

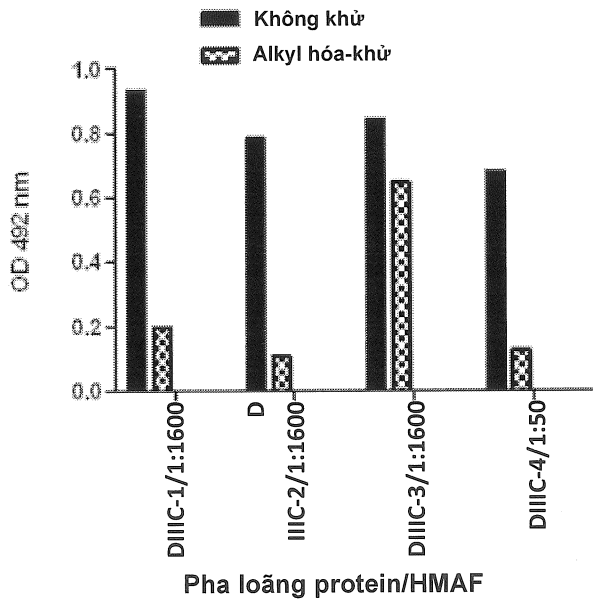


Figure 10

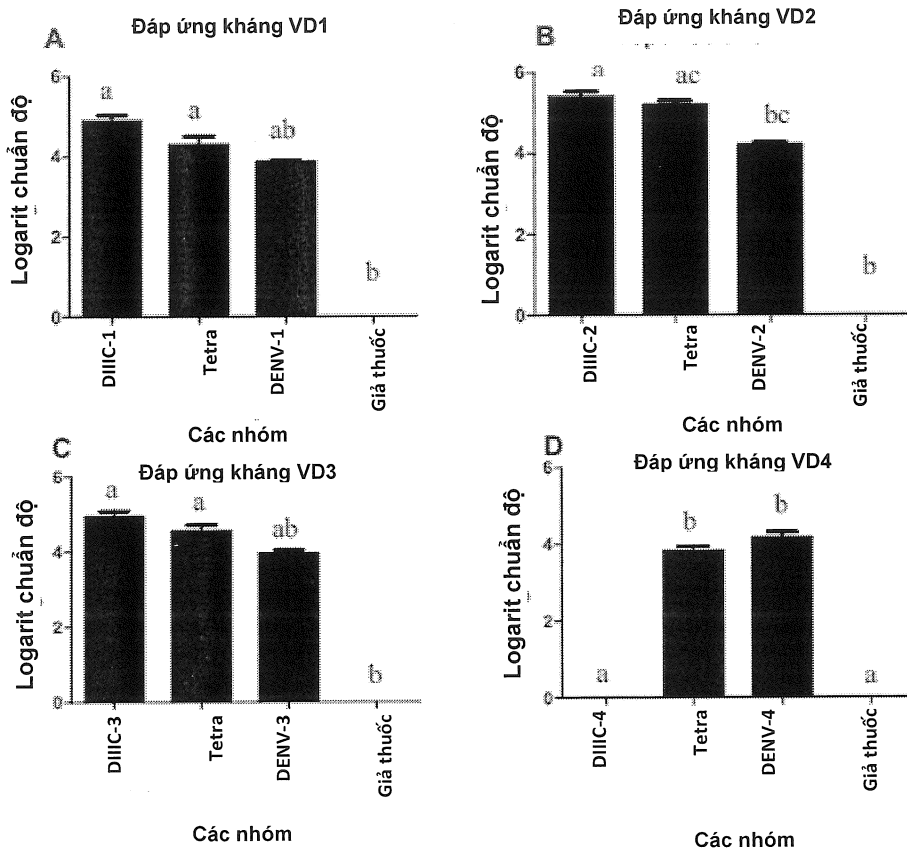


Figure 11

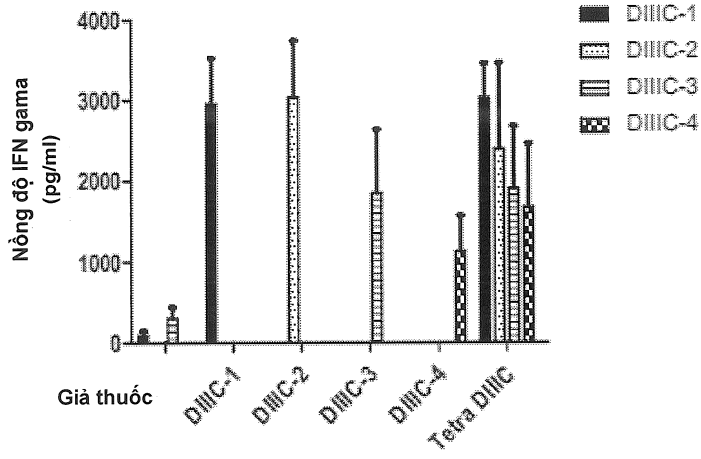


Figure 12

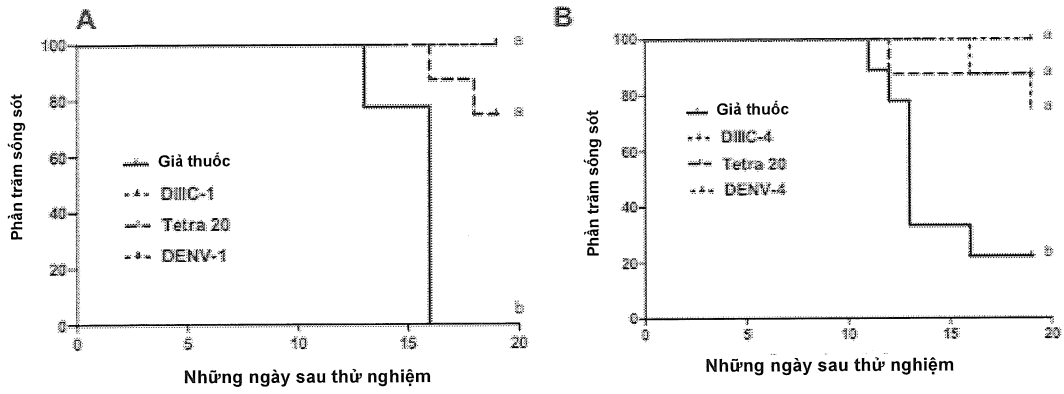


Figure 13

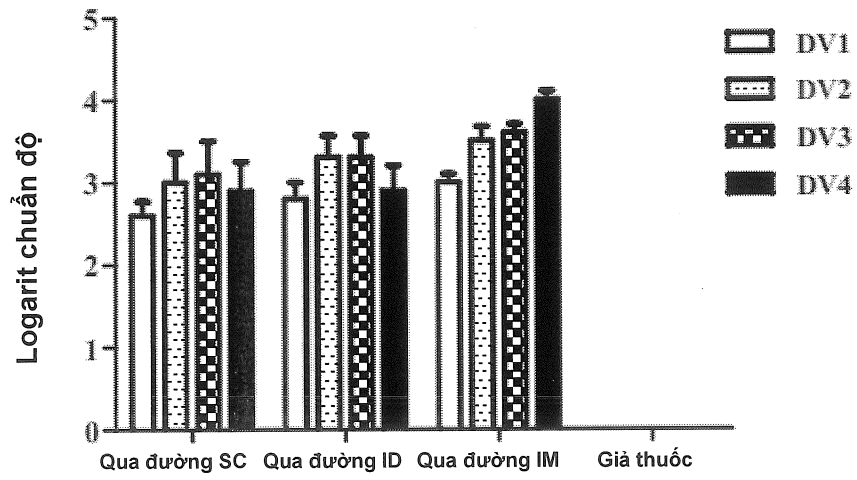


Figure 14

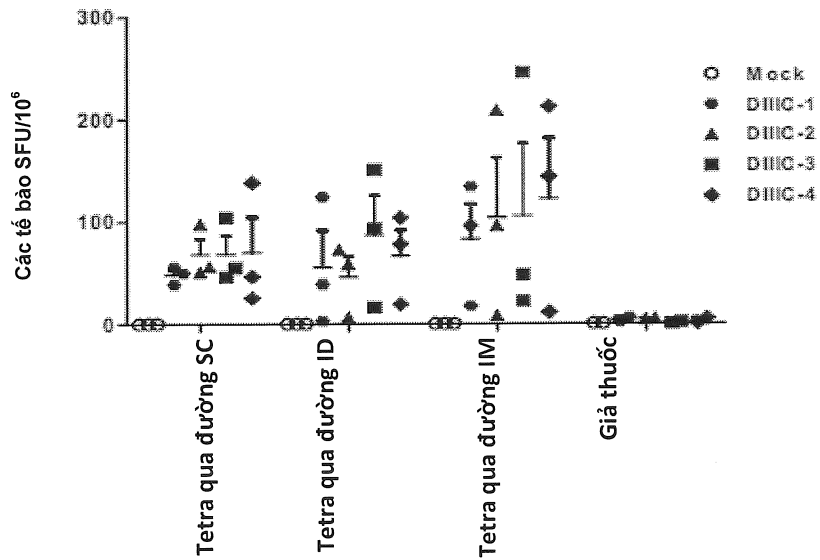


Figure 15

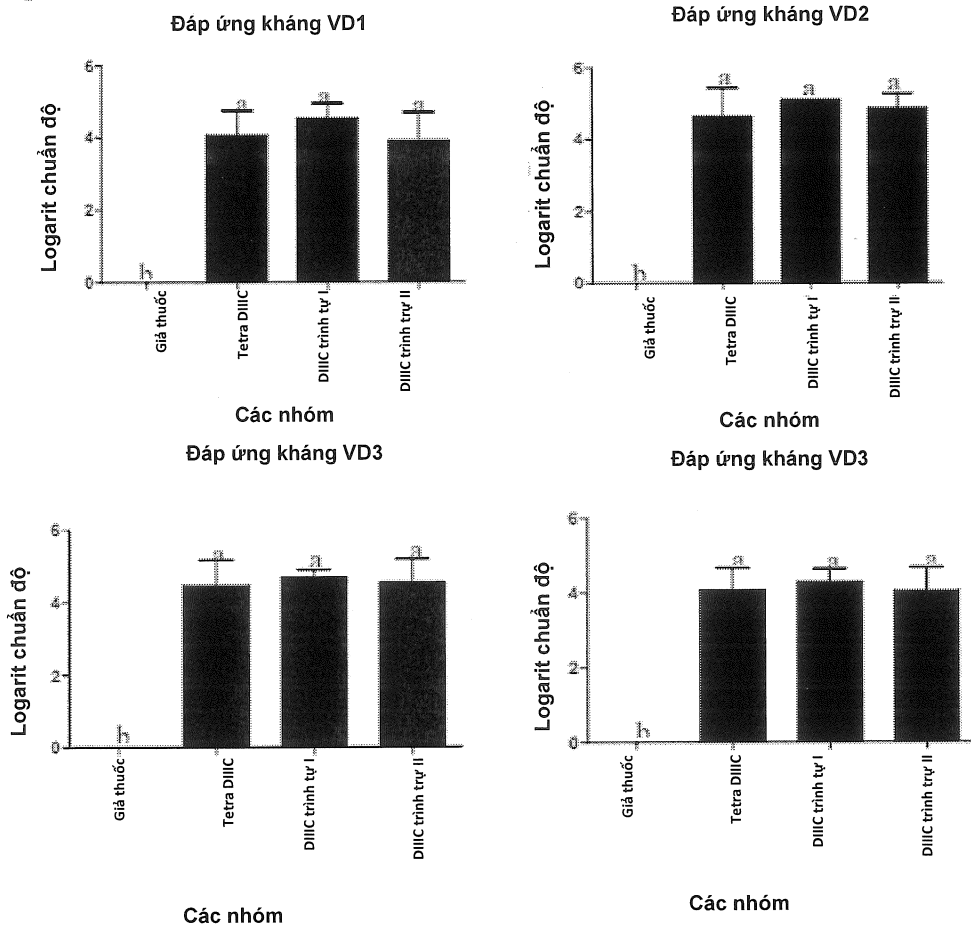
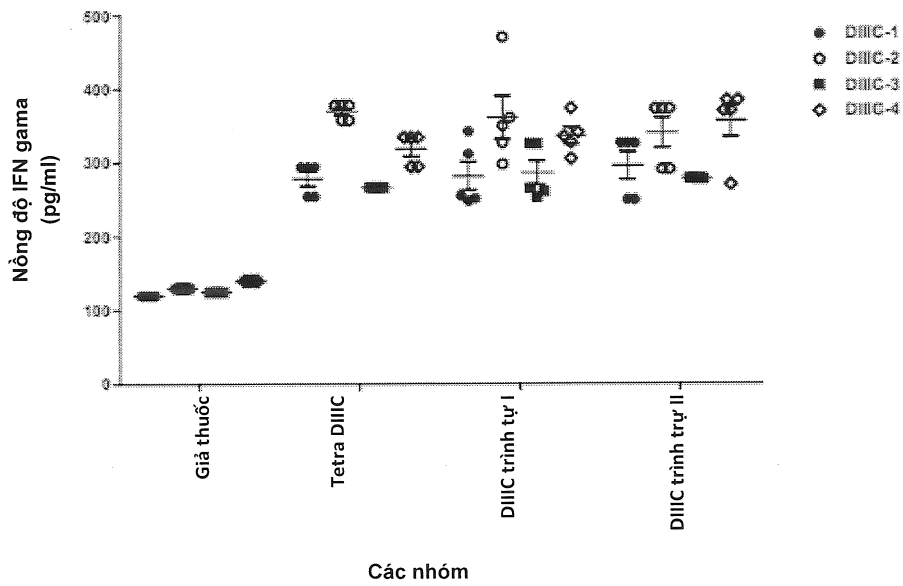


Figure 16



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Center for Genetic Engineering and Biotechnology	
<120> Chế phẩm vacxin chống virus Dengue và oligonucleotit	
<130> Thẻ tú trị Dengue	
<140> CU 2012-0179	
<141> 27.12.2012	
<160> 8	
<170> PatentIn Ver. 2.1	
<210> 1	
<211> 39	
<212> DNA	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> Mô tả trình tự Nhân tạo: Oligonucleotit hỗn hợp	
<400> 1 atcgactctc gagcgttctc gggggacgat cgtcggggg	39
<210> 2	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> Mô tả trình tự Nhân tạo: Oligonucleotit K3	
<400> 2 atcgactctc gagcgttctc	20
<210> 3	
<211> 19	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> Mô tả trình tự Nhân tạo: Oligonucleotit 2216	
<400> 3 gggggacgat cgtcggggg	19
<210> 4	
<211> 39	
<212> ADN	
<213> <i>Escherichia coli</i>	
<400> 4 catacctcgc tctgctaatac ctgttaccag tggctgctg	39

<210> 5
 <211> 252
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: protein thể khảm
 DIIIC-1

<400> 5
 Met Gly His His His His His His Gly Ser Arg Leu Lys Met Asp Lys
 1 5 10 15
 Leu Thr Leu Lys Gly Met Ser Tyr Val Met Cys Thr Gly Ser Phe Lys
 20 25 30
 Leu Glu Lys Glu Val Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Val Leu Val Gln
 35 40 45
 Val Lys Tyr Glu Gly Thr Asp Ala Pro Cys Lys Ile Pro Phe Ser Thr
 50 55 60
 Gln Asp Glu Lys Gly Val Thr Gln Asn Gly Arg Leu Ile Thr Ala Asn
 65 70 75 80
 Pro Ile Val Thr Asp Lys Glu Lys Pro Val Asn Ile Glu Thr Glu Pro
 85 90 95
 Pro Phe Gly Glu Ser Tyr Ile Val Val Gly Ala Gly Glu Lys Ala Leu
 100 105 110
 Lys Leu Ser Trp Phe Lys Lys Gly Ser Ser Ile Gly Lys Met Phe Glu
 115 120 125
 Ala Thr Ala Arg Gly Ala Arg Arg Met Ala Ile Leu Gly Asp Thr Ala
 130 135 140
 Trp Asp Phe Gly Ser Ile Gly Gly Gly Ser Asn Gln Arg Lys Lys Thr
 145 150 155 160
 Ala Arg Pro Ser Phe Asn Met Leu Lys Arg Ala Arg Asn Arg Val Ser
 165 170 175
 Thr Val Ser Gln Leu Ala Lys Arg Phe Ser Lys Gly Leu Leu Ser Gly
 180 185 190
 Gln Gly Pro Met Lys Leu Val Met Ala Phe Ile Ala Phe Leu Arg Phe
 195 200 205
 Leu Ala Ile Pro Pro Thr Ala Gly Ile Leu Ala Arg Trp Gly Ser Phe
 210 215 220
 Lys Lys Ser Gly Ala Ile Lys Val Leu Arg Gly Phe Lys Lys Glu Ile
 225 230 235 240
 Ser Asn Met Leu Asn Ile Met Asn Arg Arg Lys Arg
 245 250

<210> 6
 <211> 253
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: protein thể khảm
 DIIIIC-2

<400> 6
 Met Gly His His His His His His Gly Ser Arg Leu Arg Met Asp Lys
 1 5 10 15
 Leu Gln Leu Lys Gly Met Ser Tyr Ser Met Cys Thr Gly Lys Phe Lys
 20 25 30
 Ile Val Lys Glu Ile Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Ile Val Ile Arg
 35 40 45
 Val Gln Tyr Glu Gly Asp Gly Ser Pro Cys Lys Ile Pro Phe Glu Ile
 50 55 60
 Met Asp Leu Glu Lys Arg His Val Leu Gly Arg Leu Ile Thr Val Asn
 65 70 75 80
 Pro Ile Val Thr Glu Lys Asp Ser Pro Val Asn Ile Glu Ala Glu Pro
 85 90 95
 Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Ile Ile Gly Val Glu Pro Gly Gln Leu
 100 105 110
 Lys Leu Asn Trp Phe Lys Lys Gly Ser Ser Ile Gly Gln Met Phe Glu
 115 120 125
 Thr Thr Met Arg Gly Ala Lys Arg Met Ala Ile Leu Gly Asp Thr Ala
 130 135 140
 Trp Asp Phe Gly Ser Leu Gly Gly Gly Ser Asn Asn Gln Arg Lys Lys
 145 150 155 160
 Ala Arg Ser Thr Pro Phe Asn Met Leu Lys Arg Glu Arg Asn Arg Val
 165 170 175
 Ser Thr Val Gln Gln Leu Thr Lys Arg Phe Ser Leu Gly Met Leu Gln
 180 185 190
 Gly Arg Gly Pro Leu Lys Leu Phe Met Ala Leu Val Ala Phe Leu Arg
 195 200 205
 Phe Leu Thr Ile Pro Pro Thr Ala Gly Ile Leu Lys Arg Trp Gly Thr
 210 215 220
 Ile Lys Lys Ser Lys Ala Ile Asn Val Leu Arg Gly Phe Arg Lys Glu
 225 230 235 240
 Ile Gly Arg Met Leu Asn Ile Leu Asn Arg Arg Arg Arg
 245 250

<210> 7
 <211> 252

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: protein thể khảm
DIIIC-3

<400> 7

```

Met Gly His His His His His His Gly Ser Arg Leu Lys Met Asp Lys
 1                               5                               10           15

Leu Glu Leu Lys Gly Met Ser Tyr Ala Met Cys Thr Asn Thr Phe Val
                20                               25           30

Leu Lys Lys Glu Val Ser Glu Thr Gln His Gly Thr Ile Leu Ile Lys
                35                               40           45

Val Glu Tyr Lys Gly Glu Asp Val Pro Cys Lys Ile Pro Phe Ser Thr
 50                               55           60

Glu Asp Gly Gln Gly Lys Ala His Asn Gly Arg Leu Ile Thr Ala Asn
 65                               70           75           80

Pro Val Val Thr Lys Lys Glu Glu Pro Val Asn Ile Glu Ala Glu Pro
                85                               90           95

Pro Phe Gly Glu Ser Asn Ile Val Ile Gly Ile Gly Asp Asn Ala Leu
 100                              105           110

Lys Ile Asn Trp Tyr Lys Lys Gly Ser Ser Ile Gly Lys Met Phe Glu
 115                              120           125

Ala Thr Ala Arg Gly Ala Arg Arg Met Ala Ile Leu Gly Asp Thr Ala
 130                              135           140

Trp Asp Phe Gly Ser Val Gly Gly Gly Ser Asn Gln Arg Lys Lys Thr
 145                              150           155           160

Gly Lys Pro Ser Ile Asn Met Leu Lys Arg Val Arg Asn Arg Val Ser
                165                              170           175

Thr Gly Ser Gln Leu Ala Lys Arg Phe Ser Lys Gly Leu Leu Asn Gly
                180                              185           190

Gln Gly Pro Met Lys Leu Val Met Ala Phe Ile Ala Phe Leu Arg Phe
 195                              200           205

Leu Ala Ile Pro Pro Thr Ala Gly Val Leu Ala Arg Trp Gly Thr Phe
 210                              215           220

Lys Lys Ser Gly Ala Ile Lys Val Leu Lys Gly Phe Lys Lys Glu Ile
 225                              230           235           240

Ser Asn Met Leu Ser Ile Ile Asn Lys Arg Lys Lys
                245                              250

```

<210> 8

<211> 252

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: protein thể khảm
DIIIC-4

<400> 8

```

Met Gly His His His His His His Gly Ser Lys Val Arg Met Glu Lys
 1           5           10           15
Leu Arg Ile Lys Gly Met Ser Tyr Thr Met Cys Ser Gly Lys Phe Ser
      20           25           30
Ile Asp Lys Glu Met Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Thr Val Val Lys
      35           40           45
Val Lys Tyr Glu Gly Ala Gly Ala Pro Cys Lys Val Pro Ile Glu Ile
      50           55           60
Arg Asp Val Asn Lys Glu Lys Val Val Gly Arg Ile Ile Ser Ser Thr
      65           70           75           80
Pro Leu Ala Glu Asn Thr Asn Ser Val Thr Asn Ile Glu Leu Glu Pro
      85           90           95
Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Val Ile Gly Val Gly Asn Ser Ala Leu
      100          105          110
Thr Leu His Trp Phe Arg Lys Gly Ser Ser Ile Gly Lys Met Phe Glu
      115          120          125
Ser Thr Tyr Arg Gly Ala Lys Arg Met Ala Ile Leu Gly Glu Thr Ala
      130          135          140
Trp Asp Phe Gly Ser Val Gly Gly Gly Ser Asn Gln Arg Lys Lys Val
      145          150          155          160
Val Arg Pro Pro Phe Asn Met Leu Lys Arg Glu Arg Asn Arg Val Ser
      165          170          175
Thr Pro Gln Gly Leu Val Lys Arg Phe Ser Thr Gly Leu Phe Ser Gly
      180          185          190
Lys Gly Pro Leu Arg Met Val Leu Ala Phe Ile Thr Phe Leu Arg Val
      195          200          205
Leu Ser Ile Pro Pro Thr Ala Gly Ile Leu Lys Arg Trp Gly Gln Leu
      210          215          220
Lys Lys Asn Lys Ala Ile Lys Ile Leu Ile Gly Phe Arg Lys Glu Ile
      225          230          235          240
Gly Arg Met Leu Asn Ile Leu Asn Gly Arg Lys Arg
      245          250

```