



(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



1-0039515

(51)<sup>8</sup> C07K 14/135 (13) B

---

(21) 1-2018-05315 (22) 29/05/2017  
(86) PCT/EP2017/062875 29/05/2017 (87) WO/2017/207480 07/12/2017  
(30) 16172008.1 30/05/2016 EP  
(45) 25/04/2024 433 (43) 25/04/2019 373A  
(73) Janssen Vaccines & Prevention B.V. (NL)  
Archimedesweg 4, 2333 CN Leiden, the Netherlands  
(72) LANGEDIJK, Johannes, Petrus, Maria (NL).  
(74) Công ty Cổ phần Sở hữu công nghiệp INVESTIP (INVESTIP)

---

(54) PROTEIN RSV F TRƯỚC DUNG HỢP, PHÂN TỬ AXIT NUCLEIC, VECTƠ,  
CHẾ PHẨM CHỨA PROTEIN RSV F TRƯỚC DUNG HỢP

(57) Sáng chế đề xuất protein F virus hợp bào hô hấp (RSV) trước-dung hợp ổn định, phân tử axit nucleic, vectơ, và chế phẩm sinh miễn dịch chứa protein này để phòng ngừa và/hoặc điều trị nhiễm RSV.

### Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực dược phẩm. Sáng chế cụ thể là liên quan đến protein RSV F trước dung hợp tái tổ hợp, phân tử axit nucleic mã hóa protein RSV F, và sử dụng chúng, ví dụ trong vắc xin.

### Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Sau khi phát hiện ra virus hợp bào hô hấp (RSV) vào những năm 1950, virus này sớm trở thành tác nhân gây bệnh được công nhận có liên quan đến các ca lây nhiễm đường hô hấp dưới và trên ở người. Trên toàn thế giới, ước tính 64 triệu ca nhiễm RSV xảy ra hàng năm gây ra 160.000 trường hợp tử vong (Cập nhật của WHO về Nhiễm khuẩn hô hấp cấp tính tháng 9 năm 2009). Bệnh nặng nhất đặc biệt xảy ra ở trẻ sơ sinh đẻ non, người già và người bị suy giảm miễn dịch. Trẻ dưới 2 tuổi, RSV là bệnh lây nhiễm qua đường hô hấp phổ biến nhất, tính xấp xỉ 50% ca nhập viện do bệnh lây nhiễm qua đường hô hấp, và nhập viện nhiều nhất là ở độ tuổi 2-4 tháng. Đã có báo cáo rằng hầu hết trẻ nhỏ đã bị nhiễm RSV trước hai tuổi. Sự nhiễm lặp lại trong cả cuộc đời là do miễn dịch tự nhiên không có hiệu quả. Khi có tuổi, gánh nặng bệnh tật do RSV tương tự với gánh nặng gây ra do nhiễm virus cúm A không dịch.

RSV là paramyxovirus, thuộc họ phụ pneumovirinae. Bộ gen của nó mã hóa cho nhiều protein khác nhau, bao gồm protein màng được biết là Glycoprotein (G) RSV và protein dung hợp (F) RSV là đích kháng nguyên chính để trung hòa kháng thể. Các kháng thể kháng phân trung gian dung hợp của protein F1 có thể ngăn ngừa virus xâm nhập vào tế bào và do đó có hiệu quả trung hòa.

RSV F dung hợp màng tế bào virus và tế bào chủ bằng cách gấp lại protein không thể đảo ngược từ cấu dạng trước dung hợp không ổn định thành cấu dạng sau dung hợp ổn định. Cấu trúc của cả hai cấu dạng được xác định đối với RSV F (McLellan JS, *et al. Science* **342**, 592-598 (2013); McLellan JS, *et al. Nat Struct Mol Biol* **17**, 248-250 (2010); McLellan JS, *et al. Science* **340**, 1113-1117 (2013); Swanson KA, *et al. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 9619-9624 (2011)), cũng như đối với protein

dung hợp từ các paramyxovirus liên quan, tạo ra bên trong thành cơ chế của bộ máy dung hợp phức. Giống như các protein dung hợp loại I khác, tiền chất bất hoạt, RSV F<sub>0</sub>, đòi hỏi sự phân cắt trong quá trình đột biến nội bào bằng proteaza tương tự furin. RSV F chứa hai vị trí furin, mà dẫn đến ba protein: F2, p27 và F1, với protein sau chứa peptid dung hợp (FP) kỵ nước ở đầu N. Để gấp từ cấu dạng trước dung hợp thành cấu dạng sau dung hợp, vùng gấp 1 (RR1) giữa gốc 137 và 216, mà bao gồm FP và lặp bộ bảy A (HRA) phải biến nạp từ bộ lặp của phần xoắn, vòng và chuỗi vào xoắn liên tục dài. FP, nằm ở vùng đầu N của RR1, sau đó có khả năng mở rộng ra xa màng tế bào virus và chèn vào màng lân cận của tế bào đích. Tiếp theo, vùng gấp 2 (RR2), mà tạo ra thân đầu C trong đầu F trước dung hợp và bao gồm lặp bộ bảy B (HRB), di chuyển đến bên còn lại của đầu RSV F và liên kết trime cuộn xoắn HRA với vùng HRB để tạo thành bọc sáu phần xoắn. Sự tạo thành cuộn xoắn RR1 và di chuyển lại của RR2 để hoàn thành bọc sáu phần xoắn là thay đổi cấu trúc đột ngột nhất xảy ra trong quá trình gấp lại.

Vắc xin kháng nhiễm RSV hiện không có sẵn, nhưng được mong muốn do gánh nặng bệnh cao. Glycoprotein dung hợp RSV (RSV F) là kháng nguyên vắc xin hấp dẫn nó là đích trung hòa kháng thể chính trong huyết thanh của người. Kháng thể trung hòa nhất trong huyết thanh của người nhắm đến cấu dạng trước dung hợp, nhưng do tính bất ổn định của nó cấu dạng trước dung hợp có xu hướng gấp lại sớm thành cấu dạng sau dung hợp, cả ở trong dung dịch và trên bề mặt của virus. Như được thể hiện ở trên, các cấu trúc tinh thể đã bộc lộ thay đổi cấu dạng lớn giữa các trạng thái trước-dung hợp và sau-dung hợp. Tầm quan trọng của việc tái sắp xếp đề xuất rằng chỉ một phần của các kháng thể được hướng tới cấu dạng sau-dung hợp của RSV-F sẽ có thể phản ứng chéo với cấu dạng tự nhiên của gai trước-dung hợp trên bề mặt của virus. Theo đó, các nỗ lực để sản xuất vắc xin chống RSV đã tập trung vào phát triển vắc xin chứa các dạng trước-dung hợp của protein RSV F (xem, chẳng hạn, WO2010/1149745, WO2010/1149743, WO2009/1079796, WO2012/158613). Tuy nhiên, các nỗ lực này chưa tạo ra protein RSV F trước dung hợp ổn định mà có thể được sử dụng làm ứng viên để thử nghiệm ở con người.

Do đó, vẫn có nhu cầu đối với vắc xin có hiệu quả chống RSV, cụ thể là vắc xin chứa protein RSV F ở cấu dạng trước dung hợp. Sáng chế nhằm đề xuất protein RSV F trước dung hợp ổn định này để dùng trong vắc xin chống RSV theo cách an toàn và hiệu quả.

### **Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

Sáng chế đề xuất protein dung hợp (F) của virus hợp bào hô hấp (RSV) trước-dung hợp, tái tổ hợp, ổn định, cụ thể là, protein RSV F tái tổ hợp được ổn định ở cấu dạng trước dung hợp, và đoạn của chúng. Protein RSV F, hoặc đoạn của chúng, bao gồm ít nhất một epitop mà đặc hiệu với protein F cấu dạng trước-dung hợp. Theo các phương án nhất định, protein RSV F trước dung hợp là protein tan được. Theo các phương án nhất định, protein RSV F là trime. Theo các phương án nhất định protein RSV F là multime của protein RSV F trime. Sáng chế còn đề xuất phân tử axit nucleic mã hóa protein RSV F trước dung hợp, hoặc đoạn của chúng, cũng như vectơ chứa phân tử axit nucleic này.

Sáng chế còn liên quan đến chế phẩm, tốt hơn là chế phẩm sinh miễn dịch, bao gồm protein RSV F, phân tử axit nucleic và/hoặc vectơ, và to sử dụng chúng để gây phản ứng miễn dịch chống protein RSV F, cụ thể là sử dụng chúng làm vắc xin. Sáng chế còn đề cập đến phương pháp gây đáp ứng miễn dịch kháng virus hợp bào hô hấp (RSV) ở đối tượng, bao gồm việc dùng cho đối tượng lượng có hiệu quả của protein RSV F trước dung hợp, phân tử axit nucleic mã hóa protein RSV F này, và/hoặc vectơ bao gồm phân tử axit nucleic này. Tốt hơn là, phản ứng miễn dịch được gây khác biệt bởi các kháng thể trung hòa đối với RSV và/hoặc độ miễn dịch bảo vệ chống RSV. Theo khía cạnh cụ thể, sáng chế liên quan đến phương pháp để tạo ra các kháng thể F kháng virus hợp bào hô hấp (RSV) ở đối tượng, bao gồm việc dùng cho đối tượng lượng có hiệu quả của chế phẩm sinh miễn dịch chứa protein RSV F trước dung hợp, phân tử axit nucleic mã hóa protein RSV F này, và/hoặc vectơ chứa phân tử axit nucleic này.

### **Mô tả vắn tắt các hình vẽ**

HÌNH 1: Tinh chế protein F với các đột biến N67I, S215P, T357K, N371Y, và D486N. Sắc phổ lọc gel Superdex200 của chất rửa giải từ cột trao đổi-ion. Mũi tên chỉ đỉnh gom.

HÌNH 2: A) Phân tích SDS-PAGE của mẫu protein F N67I, S215P, T357K, N371Y, D486N chứa đỉnh từ sắc phổ SEC dưới dạng rút gọn (R) và không rút gọn (NR). Các gel được nhuộm bằng Coomassie Brilliant Blue.

**HÌNH 3:** Nồng độ protein của protein RSV F được tinh chế F N67I, S215P, T357K, N371Y, D486N được đo bằng thử nghiệm Q Octet với kháng thể đơn dòng CR9501 và CR9503. CR9501 chỉ liên kết với RSV F ở cấu dạng trước dung hợp. CR9503 liên kết RSV F cả ở cấu dạng trước dung hợp và cấu dạng sau dung hợp. Được tạo đồ thị là Trung bình $\pm$ SE.

**HÌNH 4:** Tính ổn định nhiệt của protein RSV F F N67I, S215P, T357K, N371Y, D486N. Nhiệt độ nóng chảy ( $T_m$  °C ) được xác định bằng thử nghiệm xác định hàm lượng flo quét vi sai (DSF) bằng thuốc nhuộm huỳnh quang SyproOrange. Đưa thể T357K và N371Y vào làm tăng  $T_m$  của PRPM thêm 3,5 độ đến 68,5 độ.

### **Mô tả chi tiết sáng chế**

Protein dung hợp (F) của virus hợp bào hô hấp (RSV) tham gia vào dung hợp màng tế bào virus với màng tế bào chủ, mà cần cho lây nhiễm. mARN của RSV F được dịch mã vào protein tiền chất axit amin 574 được chỉ định là F0, mà chứa trình tự peptit tín hiệu ở đầu N (ví dụ gốc axit amin 1-26 nêu ở SEQ ID NO: 13) mà được loại bỏ bởi peptidaza tín hiệu trong mạng lưới nội chất. F0 được phân tách ở hai vị trí (giữa gốc axit amin 109/110 và 136/137) bởi các proteaza tế bào (cụ thể là furin, hoặc tương tự furin)) loại bỏ trình tự can thiệp ngăn được glycosyl hóa (còn gọi là vùng p27, bao gồm gốc axit amin từ 110 đến 136, và tạo ra hai vùng hoặc khối phụ được chỉ định là F1 và F2. Vùng F1 (gốc axit amin 137-574) chứa peptit dung hợp kỵ nước ở đầu N và đầu C chứa vùng xuyên màng (TM) (gốc axit amin 530-550) và vùng tế bào chất (gốc axit amin 551-574). Vùng F2 (các phần axit amin 27-109) được liên kết cộng hóa trị với F1 bởi hai cầu disulfit. Các dime khác loại F1-F2 được ghép thành trime cùng loại trong hạt virus.

Vắc xin chống nhiễm RSV hiện vẫn chưa sẵn có. Một giải pháp tiềm năng để sản xuất vắc xin là vắc xin khối phụ dựa trên protein RSV F được tinh chế. Tuy nhiên, đối với giải pháp này mong muốn là protein RSV F được tinh chế ở trong cấu dạng mà giống với cấu dạng của trạng thái trước dung hợp của protein RSV F, mà ổn định theo thời gian, và có thể được sản xuất với số lượng vừa đủ. Ngoài ra, đối với vắc xin dựa trên khối phụ, protein RSV F cần được cắt bớt bằng cách loại bỏ vùng xuyên màng (TM) và vùng tế bào chất để tạo ra protein F được bài tiết tan được (sF). Vì vùng TM chịu trách nhiệm về neo màng và tính ổn định, protein F tan được không neo không bền hơn đáng kể so với protein dài-đầy đủ và sẽ

sẵn sàng gấp lại thành trạng thái-cuối sau-dung hợp. Để thu được protein F tan được trong cấu dạng trước-dung hợp ổn định mà thể hiện các mức biểu hiện cao và độ ổn định cao, cấu dạng trước-dung hợp do đó cần được ổn định. Do protein RSV F chiều dài đầy đủ (liên kết màng) cũng giả ổn định, sự ổn định của cấu dạng trước dung hợp cũng được mong muốn đối với protein RSV F chiều dài đầy đủ, ví dụ đối với bất kỳ nghiên cứu vắc xin trên cơ sở vectơ hoặc vắc xin sống giảm độc lực.

Đối với sự ổn định RSV F tan được, tức là được phân cắt thành nhóm phụ F1 và F2, ở cấu dạng trước dung hợp, vùng trime hóa trên cơ sở fibritin được dung hợp vào đầu C của đầu C của RSV-F tan được (McLellan et al., *Nature Struct. Biol.*17: 2-248-250 (2010); McLellan et al., *Science* 340(6136):1113-7 (2013)). Vùng fibritin này hoặc 'Foldon' thu được từ T4 fibritin và đã được mô tả trước đây là vùng trime hóa tự nhiên nhân tạo (Letarov et al., *Biochemistry Moscow* 64: 817-823 (1993); S-Guthe et al., *J. Mol. Biol.* 337: 905-915. (2004)). Tuy nhiên, vùng trime hóa không tạo ra protein RSV-F trước dung hợp ổn định (Krarup et al., *Nature Comm.* 6:8143, (2015)). Ngoài ra, những nỗ lực này chưa có kết quả ở các đối tượng phù hợp để thử nghiệm ở người.

Gần đây, tác giả mô tả sự kết hợp của một vài đột biến mà có khả năng là ổn định protein RSV F ở cấu dạng trước dung hợp (WO2014/174018 và WO2014/202570). Do đó, protein RSV F trước dung hợp ổn định đã được mô tả bao gồm đột biến của gốc axit amin trên vị trí 67 và/hoặc đột biến của gốc axit amin trên vị trí 215, tốt hơn là đột biến của gốc axit amin N/T trên vị trí 67 thành I và/hoặc đột biến của gốc axit amin S trên vị trí 215 thành P. Ngoài ra, protein RSV F trước dung hợp tan được đã được mô tả bao gồm vùng F1 bị cắt cụt, và bao gồm đột biến của gốc axit amin trên vị trí 67 và/hoặc đột biến của gốc axit amin trên vị trí 215, tốt hơn là đột biến của gốc axit amin N/T trên vị trí 67 thành I và/hoặc đột biến của gốc axit amin S trên vị trí 215 thành P, trong đó protein bao gồm vùng trime hóa khác loại liên kết với vùng F1 bị cắt cụt này. Protein RSV F trước dung hợp bổ sung đã được mô tả, trong đó protein bao gồm ít nhất một đột biến nữa, như đột biến của gốc axit amin D trên vị trí 486 thành N.

Theo sáng chế phát hiện ra rằng việc đưa hai đột biến khác vào, cụ thể là trên vị trí 357 và 371 (đánh số theo SEQ ID NO: 13) cũng làm ổn định protein ở cấu dạng trước dung hợp.

Sáng chế do đó đề xuất protein F trước dung hợp tái tổ hợp bao gồm đột biến của gốc axit amin trên vị trí 215, cụ thể là đột biến của axit amin S trên vị trí 215 thành P (S215P), kết hợp với đột biến của axit amin trên vị trí 357, cụ thể là đột biến của axit amin T trên vị trí 357 thành K (T357K) và đột biến của axit amin trên vị trí 371, cụ thể là đột biến của axit amin N trên vị trí 371 thành Y (N371Y).

Sáng chế do đó đề xuất kết hợp duy nhất của các đột biến để tạo ra protein RSV F trước dung hợp ổn định tái tổ hợp, cụ thể là protein RSV F mà được làm ổn định ở cấu dạng trước dung hợp, hoặc đoạn của chúng. Protein RSV F trước dung hợp ổn định theo sáng chế, hoặc đoạn của chúng, là ở cấu dạng trước dung hợp, cụ thể là chúng bao gồm (thể hiện) ít nhất một epitop mà đặc hiệu với protein F cấu dạng trước-dung hợp. Epitop mà đặc hiệu với protein F cấu dạng trước-dung hợp là epitop mà không có mặt trong cấu dạng sau dung hợp. Không bị giới hạn bởi lý thuyết cụ thể bất kỳ, tin rằng cấu dạng trước dung hợp của protein RSV F có thể chứa các epitop mà giống các epitop trên protein RSV F được biểu hiện trên các hạt virus RSV tự nhiên, và do đó có thể tạo ra các ưu điểm để tạo ra kháng thể trung hòa bảo vệ.

Theo các phương án nhất định, protein RSV F trước dung hợp theo sáng chế, hoặc đoạn của chúng, bao gồm ít nhất một epitop mà được nhận ra bởi kháng thể đơn dòng đặc hiệu trước dung hợp, chứa vùng chuỗi nặng CDR1 nêu ở SEQ ID NO: 1, vùng chuỗi nặng CDR2 có SEQ ID NO: 2, vùng chuỗi nặng CDR3 có SEQ ID NO: 3 và vùng chuỗi nhẹ CDR1 có SEQ ID NO: 4, vùng chuỗi nhẹ CDR2 có SEQ ID NO: 5, và vùng chuỗi nhẹ CDR3 có SEQ ID NO: 6 (sau đây được gọi là CR9501) và/hoặc kháng thể đơn dòng đặc trưng trước-dung hợp, bao gồm vùng CDR1 chuỗi nặng có SEQ ID NO: 7, vùng chuỗi nặng CDR2 có SEQ ID NO: 8, vùng chuỗi nặng CDR3 có SEQ ID NO: 9 và vùng chuỗi nhẹ CDR1 có SEQ ID NO: 10, vùng chuỗi nhẹ CDR2 có SEQ ID NO: 11, và vùng chuỗi nhẹ CDR3 có SEQ ID NO: 12 (được gọi là CR9502). CR9501 và CR9502 bao gồm các vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ, và do đó, các đặc trưng gắn kết lần lượt của các kháng thể 58C5 và 30D8, mà đã được thể hiện trước đây để gắn kết một cách cụ thể vào protein RSV F trong cấu dạng trước-dung hợp của nó và không phải vào cấu dạng sau-dung hợp (xem WO2012/006596).

Theo các phương án nhất định, protein RSV F trước dung hợp tái tổ hợp là trime.

Như được sử dụng trong toàn bộ sáng chế, các trình tự nucleotit được cung cấp theo hướng từ 5' đến 3', và trình tự axit amin từ các đầu N đến đầu C, như thông lệ trong lĩnh vực kỹ thuật.

Như được thể hiện ở đây, các đoạn protein RSV F trước dung hợp cũng bao hàm trong sáng chế. Đoạn có thể thu được từ một trong số hoặc cả loại bỏ đầu amin (ví dụ bằng cách cắt bỏ trình tự tín hiệu) và đầu carboxy (ví dụ bằng cách loại bỏ vùng xuyên màng và/hoặc đuôi tế bào chất). Đoạn có thể được chọn để chứa đoạn hoạt tính miễn dịch học của protein F, tức là phần mà sẽ tạo ra tăng đáp ứng miễn dịch ở đối tượng. Điều này có thể dễ dàng xác định được bằng cách sử dụng các phương pháp in silico, in vitro và/hoặc trong cơ thể, tất cả đều quen thuộc đối với chuyên gia trong lĩnh vực.

Theo các phương án nhất định, protein được mã hóa hoặc đoạn của chúng theo sáng chế bao gồm trình tự tín hiệu, còn gọi là trình tự dẫn hoặc peptit tín hiệu, tương ứng với axit amin 1-26 nêu ở SEQ ID NO: 13. Trình tự tín hiệu ngắn (ví dụ dài 5-30 axit amin) trình tự axit amin có ở đầu N của đa số các protein mới tổng hợp mà dành cho con đường kích thích bài tiết, và thường bị cắt bởi peptidaza tín hiệu để tạo ra peptit tín hiệu tự do và protein trưởng thành.

Theo các phương án nhất định, protein hoặc đoạn của chúng theo sáng chế không bao gồm trình tự tín hiệu.

Theo các phương án nhất định, (đoạn của) protein RSV F trước dung hợp là tan được. Theo các phương án nhất định, the protein RSV F trước dung hợp ổn định hoặc đoạn của chúng theo sáng chế bao gồm vùng F1 bị cắt cụt, và bao gồm vùng trime hóa khác loại liên kết với vùng F1 bị cắt cụt này. Theo sáng chế, thể hiện rằng bằng cách liên kết vùng trime hóa khác loại với gốc axit amin đầu C của vùng F1 bị cắt cụt, kết hợp với (các) đột biến làm ổn định, protein RSV F tan được tạo ra mà thể hiện biểu hiện cao và liên kết với kháng thể đặc hiệu trước dung hợp, cho thấy protein là ở cấu dạng trước dung hợp. Ngoài ra, protein RSV F ổn định ở cấu dạng trước dung hợp, cụ thể là ngay cả sau khi xử lý protein chúng vẫn liên kết với các kháng thể đặc hiệu trước dung hợp CR9501 và/hoặc CR9502, cho thấy rằng các epitop đặc hiệu trước dung hợp được giữ lại.



Theo các phương án nhất định, protein RSV F là multime của protein RSV F trime. Do đó, theo một số phương án, protein RSV F có thể bao gồm vùng lắp ráp cho lắp ráp bậc cao hơn của trime.

Điều đã biết là RSV tồn tại như là kiểu huyết thanh đơn có hai nhóm phụ kháng nguyên: A và B. Các trình tự axit amin của các protein F được xử lý trưởng thành của hai nhóm là giống nhau khoảng 93%. Như được sử dụng trong bản mô tả này, các vị trí axit amin được cho dựa vào trình tự của protein RSV F của nhóm phụ A (SEQ ID NO: 13). Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ "axit amin ở vị trí "x" của protein RSV F do đó có nghĩa là axit amin tương ứng với axit amin ở vị trí "x" ở protein RSV F nêu ở SEQ ID NO: 13. Lưu ý rằng, trong hệ thống đánh số được sử dụng trong toàn bộ đơn 1 biểu thị axit amin đầu cuối N của protein F0 chưa trưởng thành (SEQ ID NO: 13) Khi chủng RSV khác được dùng, vị trí axit amin của protein F là được đánh số theo số của protein F của SEQ ID NO: 13 bằng cách căn chỉnh các trình tự của sợi RSV khác với protein F có SEQ ID NO: 13 với sự chèn các khoảng trống nếu cần thiết. Các căn chỉnh trình tự có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, chẳng hạn, bởi CLUSTALW, Bioedit hoặc CLC Workbench.

Theo các phương án nhất định, chủng RSV là chủng RSV nêu ở SEQ ID NO: 20.

Theo các phương án nhất định, chủng RSV là chủng RSV B. Theo các phương án nhất định, chủng RSV là chủng RSV B nêu ở SEQ ID NO: 15.

Axit amin theo sáng chế có thể là bất kỳ trong số hai mươi axit amin tìm thấy trong tự nhiên (hoặc axit amin 'tiêu chuẩn') hoặc các biến thể của chúng, như ví dụ axit amin D (chất đồng phân đối hình D của axit amin với tâm không đối xứng), hoặc biến thể bất kỳ mà không thấy trong tự nhiên trong protein, như ví dụ norleuxin. Axit amin chuẩn có thể được chia thành một số nhóm dựa trên các đặc tính của chúng. Các yếu tố quan trọng là đặc tính tích điện, ưa nước hoặc kỵ nước, các nhóm chức và kích thước. Các đặc tính này là quan trọng đối với cấu trúc protein và tương tác protein-protein. Một số axit amin có các thuộc tính đặc biệt như xystein, mà có thể tạo ra các liên kết disulfit cộng hóa trị (hoặc các cầu disulfit) với các gốc xystein khác, prolin làm xoay mạch chính protein, và glyxin linh động hơn các axit amin khác. Bảng 1 thể hiện các chữ viết tắt và đặc tính của các axit amin chuẩn.

Sẽ được hiểu đúng bởi chuyên gia trung bình trong lĩnh vực rằng các đột biến có thể được tạo ra cho protein bởi các quy trình sinh học phân tử thông thường. Các đột biến theo sáng chế tốt hơn là làm tăng các mức biểu hiện và/hoặc làm tăng sự ổn định của protein RSV F trước dung hợp so với protein RSV F mà không bao gồm (các) đột biến này.

Theo các phương án nhất định, protein RSV F trước dung hợp hoặc đoạn của chúng bao gồm ít nhất một đột biến nữa được chọn từ nhóm bao gồm:

- (a) đột biến của gốc axit amin trên vị trí 67; và
- (b) đột biến của gốc axit amin trên vị trí 486.

Theo các phương án nhất định, ít nhất một đột biến nữa được chọn từ nhóm bao gồm:

- (a) đột biến của gốc axit amin N/T trên vị trí 67 thành I; và
- (b) đột biến của gốc axit amin D trên vị trí 486 thành N.

Theo các phương án nhất định, protein RSV F trước dung hợp hoặc đoạn của chúng bao gồm ít nhất bốn đột biến (so với protein RV F kiểu dại, ví dụ bao gồm trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO : 13). Theo các phương án nhất định, protein hoặc đoạn của chúng bao gồm ít nhất năm đột biến.

Theo các phương án nhất định, protein hoặc đoạn của chúng bao gồm ít nhất sáu đột biến.

Theo các phương án nhất định, polypeptit RSV F trước dung hợp do đó bao gồm ít nhất một đột biến nữa được chọn từ nhóm bao gồm:

- (a) đột biến của gốc axit amin trên vị trí 46;
- (b) đột biến của gốc axit amin trên vị trí 83;
- (c) đột biến của gốc axit amin trên vị trí 92;
- (d) đột biến của gốc axit amin trên vị trí 184;
- (e) đột biến của gốc axit amin trên vị trí 203;
- (f) đột biến của gốc axit amin trên vị trí 207; và
- (g) đột biến của gốc axit amin trên vị trí 487.

Theo các phương án nhất định, ít nhất một đột biến nữa được chọn từ nhóm bao gồm:

- (a) đột biến của gốc axit amin S trên vị trí 46 thành G;
- (b) đột biến của gốc axit amin L trên vị trí 83 thành M;
- (c) đột biến của gốc axit amin E trên vị trí 92 thành D;
- (d) đột biến của gốc axit amin G trên vị trí 184 thành N;
- (e) đột biến của gốc axit amin L trên vị trí 203 thành I;
- (f) đột biến của gốc axit amin V trên vị trí 207 thành I; và
- (g) đột biến của gốc axit amin E trên vị trí 487 thành Q, N hoặc I.

Theo các phương án nhất định khác, miền trime hóa khác loại bao gồm trình tự axit amin GYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL (SEQ ID NO: 14).

Như được mô tả ở trên, theo các phương án nhất định, protein theo sáng chế hoặc đoạn của chúng bao gồm vùng F1 bị cắt cụt. Như được sử dụng ở đây vùng F1 "bị cắt cụt" đề cập đến vùng F1 mà không phải là vùng F1 có chiều dài đầy đủ, cụ thể là trong đó hoặc là một hoặc nhiều gốc axit amin bị xóa bỏ ở đầu N hoặc đầu C. Theo sáng chế, ít nhất vùng xuyên màng và đuôi tế bào chất bị xóa bỏ để cho phép biểu hiện là vùng ngoại bào tan được.

Theo các phương án nhất định khác, miền trime hóa được liên kết với phần axit amin 513 của miền RSV F1. Theo các phương án nhất định, vùng trime hóa do đó bao gồm SEQ ID NO: 14 và được liên kết với phần axit amin 513 của miền RSV F1.

Theo các phương án nhất định, protein RSV F theo sáng chế bao gồm trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO: 21.

Theo các phương án nhất định, mức biểu hiện của protein RSV F trước dung hợp theo sáng chế là tăng, so với protein RSV F kiểu dại. Theo các phương án nhất định mức biểu hiện được gia tăng ít nhất 5 lần, tốt hơn là lên đến 10 lần. Theo các phương án nhất định, mức biểu hiện được gia tăng hơn 10 lần.

Protein RSV F trước dung hợp theo sáng chế là ổn định, tức là không dễ dàng thay đổi thành cấu dạng sau dung hợp do xử lý protein, như ví dụ tinh chế, chu kỳ kết đông tan rã, và/hoặc lưu trữ v.v.

Theo các phương án nhất định, protein RSV F trước dung hợp theo sáng chế có tính ổn định tăng khi lưu trữ ở 4°C so với protein RSV F mà không có (các) đột biến. Theo các phương án nhất định, protein ổn định khi lưu trữ ở 4°C trong ít nhất 30 ngày, tốt hơn là ít nhất 60 ngày, tốt hơn là ít nhất 6 tháng, còn tốt hơn nữa là ít nhất 1 năm. Với thuật ngữ "ổn định khi lưu trữ", có nghĩa là protein vẫn thể hiện ít nhất một epitop đặc hiệu đối với kháng thể đặc hiệu trước dung hợp (ví dụ CR9501) khi lưu trữ protein trong dung dịch (ví dụ môi trường nuôi cấy) ở 4°C trong ít nhất 30 ngày. Theo các phương án nhất định, protein thể hiện ít nhất một epitop đặc hiệu trước dung hợp trong ít nhất 6 tháng, tốt hơn là trong ít nhất 1 năm khi lưu trữ protein RSV F trước dung hợp ở 4°C.

Theo các phương án nhất định, protein RSV F trước dung hợp theo sáng chế có tính ổn định tăng khi chịu nhiệt, so với RSV F proteins không có (các) đột biến. Theo các phương án nhất định, protein REV F trước dung hợp là ổn định nhiệt trong ít nhất 30 phút ở nhiệt độ bằng 55°C, tốt hơn là ở 58°C, tốt hơn nữa là ở 60°C. Với thuật ngữ "ổn định nhiệt" có nghĩa là protein vẫn thể hiện ít nhất một epitop đặc hiệu trước dung hợp sau khi trải qua ít nhất 30 phút ở nhiệt độ tăng (tức là nhiệt độ bằng 55°C hoặc hơn), ví dụ như được xác định sử dụng phương pháp như được mô tả trong các Ví dụ (xem HÌNH 4).

Theo các phương án nhất định, protein thể hiện ít nhất một epitop đặc hiệu trước dung hợp sau khi trải qua từ 1 đến 6 chu kỳ kết đông tan giá trong chất đệm chế phẩm thích hợp.

Như được sử dụng trong toàn bộ sáng chế, các trình tự nucleotit được cung cấp theo hướng từ 5' đến 3', và trình tự axit amin từ các đầu N đến đầu C, như thông lệ trong lĩnh vực kỹ thuật.

Theo các phương án nhất định, các protein được mã hóa theo sáng chế còn bao gồm trình tự dẫn, còn gọi là trình tự tín hiệu hoặc peptit tín hiệu, tương ứng với axit amin 1-26 nêu ở SEQ ID NO: 13. Đây là peptit ngắn (thường có chiều dài 5-30 axit amin) có mặt ở đầu tận cùng N của phần lớn các protein mới được tổng hợp mà được hướng đến con đường tiết. Theo các phương án nhất định, protein theo sáng chế không bao gồm trình tự tín hiệu.

Theo các phương án nhất định, polypeptit bao gồm thẻ-HIS. Thẻ-HIS hoặc thẻ-polyhistidin là đoạn lặp axit amin trong các protein bao gồm ít nhất năm phần histidin (H),

thường ở các đầu cuối N hoặc C của protein, mà thường được sử dụng cho các mục đích tinh lọc.

Sáng chế còn đề xuất các phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit RSV F theo sáng chế.

Theo các phương án được ưu tiên, phân tử axit nucleic mã hóa protein theo sáng chế là các bộ ba mã hóa được tối ưu hóa để biểu hiện trong tế bào của động vật có vú, tốt hơn là tế bào người. Các phương pháp tối ưu hóa bộ ba mã hóa đã được biết và mô tả trước đây (ví dụ WO 96/09378). Trình tự được cân nhắc tối ưu hóa-codon nếu ít nhất một codon không ưu tiên khi so với trình tự loại thuần chủng được thay thế bởi codon được ưu tiên hơn. Trong bản mô tả này, bộ ba mã hóa không được ưu tiên là bộ ba mã hóa được sử dụng ở sinh vật ít thường xuyên hơn so với bộ ba mã hóa khác mã hóa cho cùng axit amin, và bộ ba mã hóa được ưu tiên hơn là bộ ba mã hóa được sử dụng thường xuyên hơn ở sinh vật so với bộ ba mã hóa không được ưu tiên. Tần suất sử dụng bộ ba mã hóa đối với sinh vật cụ thể có thể được tìm thấy trong bảng tần suất bộ ba mã hóa, như trong <http://www.kazusa.or.jp/codon>. Tốt hơn là nhiều hơn một codon không ưu tiên, tốt hơn là hầu hết hoặc tất cả codon không ưu tiên, được thay thế bởi codon được ưu tiên hơn. Tốt hơn nếu các bộ ba mã hóa được sử dụng thường xuyên nhất ở sinh vật được sử dụng trong trình tự được tối ưu hóa bộ ba mã hóa. Việc thay thế bằng các bộ ba mã hóa được ưu tiên nhìn chung dẫn đến sự biểu hiện cao hơn.

Chuyên gia trung bình trong lĩnh vực sẽ hiểu rằng nhiều polynucleotit và phân tử axit nucleic khác nhau có thể mã hóa cùng protein là kết quả của sự thoái biến của mã gen. Chuyên gia trung bình trong lĩnh vực cũng hiểu rằng có thể, bằng cách sử dụng các kỹ thuật thông thường, làm cho sự thay thế nucleotit mà không ảnh hưởng trình tự protein được mã hóa bởi phân tử axit nucleic để cho thấy sự sử dụng codon của cơ quan vật chủ cụ thể bất kỳ trong đó protein sẽ được biểu hiện. Do đó, trừ khi có chỉ dẫn khác, "trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin" bao gồm tất cả các trình tự nucleotit mà là các phiên bản thoái hóa của nhau và mã hóa cho cùng trình tự axit amin. Các trình tự nucleotit mã hóa các protein và ARN có thể hoặc có thể không bao gồm các intron.

Trình tự axit nucleic có thể được tách dòng bằng cách sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử thông thường, hoặc được tạo ra hoàn toàn mới bằng sự tổng hợp ADN, mà có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các quy trình thông thường bởi các công ty dịch vụ có kinh

doanh trong lĩnh vực tổng hợp ADN và/hoặc tách dòng phân tử (ví dụ GeneArt, GenScripts, Invitrogen, Eurofins).

Sáng chế cũng đề xuất các vectơ bao gồm phân tử axit nucleic như được mô tả ở trên. Theo các phương án nhất định, phân tử axit nucleic theo sáng chế như vậy là một phần của vectơ. Các vật truyền này có thể được thao tác dễ dàng bằng các phương pháp mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực đã biết, và có thể thể ví dụ được thiết kế để có khả năng sao chép trong tế bào nhân sơ và/hoặc tế bào nhân thật. Ngoài ra, nhiều vectơ có thể được sử dụng để biến nạp các tế bào nhân thật và sẽ hợp nhất toàn phần hoặc một phần thành hệ gen của các tế bào này, dẫn đến các tế bào vật chủ ổn định bao gồm axit nucleic được mong muốn trong hệ gen của chúng. Vật truyền được sử dụng có thể là vật truyền bất kỳ mà thích hợp để tách dòng ADN và có thể được sử dụng để phiên mã axit nucleic quan tâm. Các vectơ phù hợp theo sáng chế là ví dụ adenovectơ, các vectơ alphavirus, paramyxovirus, vaccinia virus, herpes virus, retrovirus v.v. Chuyên gia trong lĩnh vực có khả năng lựa chọn vectơ biểu hiện thích hợp, và chèn các trình tự axit nucleic theo sáng chế theo cách chức năng.

Các tế bào chủ bao gồm phân tử axit nucleic mã hóa protein RSV F trước dung hợp cũng tạo thành một phần của sáng chế. Protein RSV F trước dung hợp có thể được sản xuất thông qua công nghệ ADN tái tổ hợp liên quan đến biểu hiện của các phân tử trong tế bào vật chủ, ví dụ các tế bào buồng trứng chuột lang Trung Quốc (CHO), các dòng tế bào u, các tế bào BHK, các dòng tế bào người như các tế bào HEK293, các tế bào PER.C6, hoặc tế bào nấm men, nấm, côn trùng, và tương tự, hoặc động vật hoặc thực vật chuyển gen. Theo các phương án nhất định, các tế bào này là từ cơ quan đa bào, theo các phương án nhất định chúng thuộc nguồn gốc động vật có xương sống hoặc động vật không có xương sống. Theo các phương án nhất định, các tế bào này là các tế bào động vật có vú. Theo các phương án nhất định, các tế bào này là các tế bào người. Nói chung, việc tạo ra các protein tái tổ hợp, như protein RSV F trước dung hợp theo sáng chế, trong tế bào chủ bao gồm việc đưa phân tử axit nucleic khác loại mã hóa protein ở định dạng biểu hiện được vào tế bào chủ, nuôi cấy các tế bào này trong các điều kiện truyền dẫn đối với biểu hiện của phân tử axit nucleic và cho phép biểu hiện của protein trong tế bào này. Phân tử axit nucleic mã hóa protein ở định dạng biểu hiện được có thể ở dạng catxet biểu hiện, và thường yêu cầu các trình tự có khả năng lộ ra biểu hiện của axit nucleic, như là (các) trình tự tăng cường, trình tự khởi đầu phiên

mã, tín hiệu polyadenyl hóa, và trình tự tương tự. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết các vùng khởi động khác nhau có thể được sử dụng để thu được sự biểu hiện của gen trong tế bào chủ. Các trình tự khởi đầu phiên mã có thể cấu thành hoặc được điều hòa, và có thể thu được từ các nguồn khác nhau, bao gồm nguồn virut, nhân sơ hoặc nhân thật, hoặc được thiết kế nhân tạo.

Môi trường nuôi cấy tế bào là sẵn có từ nhiều nhà cung cấp khác nhau, và môi trường phù hợp có thể được chọn theo thông lệ cho tế bào chủ để biểu hiện protein có lợi, ở đây là protein RSV F trước dung hợp. Môi trường thích hợp có thể hoặc có thể không chứa huyết thanh.

“Phân tử axit nucleic khác loại” (còn gọi là là ‘gen chuyển’) là phân tử axit nucleic không tự nhiên có mặt trong tế bào chủ. Nó được đưa vào, ví dụ, vectơ bởi các kỹ thuật sinh học phân tử tiêu chuẩn. Gen chuyển nhìn chung được liên kết hoạt động với trình tự kiểm soát biểu hiện. Điều này có thể ví dụ được thực hiện bằng cách đặt axit nucleic mã hóa (các) gen chuyển dưới sự kiểm soát của trình tự khởi đầu. Các trình tự điều hòa khác có thể được bổ sung. Nhiều trình tự khởi đầu phiên mã có thể được sử dụng cho sự biểu hiện của (các) gen chuyển, và là đã biết đối với chuyên gia trung bình trong lĩnh vực, chẳng hạn, các trình tự này có thể bao gồm các trình tự khởi đầu phiên mã virut, động vật có vú, nhân tạo, và trình tự tương tự. Ví dụ không giới hạn về trình tự khởi đầu phiên mã thích hợp để thu được biểu hiện trong tế bào nhân chuẩn là trình tự khởi đầu phiên mã CMV (US 5,385,839), ví dụ trình tự khởi đầu phiên mã ngay ban đầu CMV, ví dụ bao gồm nt. -735 đến +95 từ trình tự tăng cường gen/trình tự khởi đầu phiên mã sớm tức thì CMV. Tín hiệu polyadenyl hóa, ví dụ tín hiệu polyA hormon sinh trưởng bò (US 5,122,458), có thể có mặt ở sau (các) gen chuyển này. Theo cách khác, một số các vectơ được sử dụng rộng rãi biểu hiện là sẵn có trong lĩnh vực kỹ thuật và từ các nguồn thương mại, chẳng hạn, chuỗi vectơ pcADN và pEF của Invitrogen, pMSCV và pTK-Hyg từ BD Sciences, pCMV-Script từ Stratagene, v.v., các vectơ này có thể được sử dụng để biểu hiện tái tổ hợp protein quan tâm, hoặc để thu được các trình tự khởi đầu phiên mã và/hoặc các trình tự kết thúc phiên mã, các trình tự polyA phù hợp, và trình tự tương tự.

Nuôi cấy tế bào có thể là dạng nuôi cấy tế bào bất kỳ, bao gồm nuôi cấy tế bào dính, ví dụ tế bào dính vào bề mặt của bình nuôi cấy hoặc vi chất mang, cũng như nuôi cấy huyền

phù. Nuôi cấy huyền phù phạm vi lớn nhất được thực hiện là các quy trình mẻ hoặc mẻ cho ăn bởi vì chúng dễ thực hiện và mở rộng phạm vi nhất. Ngày nay, các quy trình liên tục dựa trên các nguyên lý tưới đang trở nên phổ biến và cũng phù hợp hơn. Môi trường nuôi cấy phù hợp cũng là đã biết đối với chuyên gia trung bình trong lĩnh vực và thông thường có thể thu được từ các nguồn thương mại với số lượng lớn, hoặc tự-tạo theo các trình thức tiêu chuẩn. Nuôi cấy có thể được thực hiện ví dụ trong các đĩa, các chai lã hoặc trong các buồng phản ứng sinh học, sử dụng hệ thống mẻ, mẻ cho ăn, hệ thống liên tục và tương tự. Các điều kiện thích hợp để nuôi cấy tế bào là đã biết (xem, ví dụ, Tissue Culture, Academic Press, Kruse và Paterson, các nhà biên soạn (1973), và R.I. Freshney, Culture of animal cells: A manual of basic technique, fourth edition (Wiley-Liss Inc., 2000, ISBN 0-471-34889-9)).

Sáng chế còn đề xuất chế phẩm chứa protein RSV F trước dung hợp và/hoặc phân tử axit nucleic, và/hoặc vectơ, như được mô tả ở trên. Sáng chế do đó đề xuất chế phẩm chứa protein RSV F trước dung hợp mà thể hiện epitop mà có mặt ở cấu dạng trước dung hợp của protein RSV F nhưng không có mặt ở cấu dạng sau dung hợp. Sáng chế còn đề xuất chế phẩm chứa phân tử axit nucleic và/hoặc vectơ, mã hóa protein RSV F trước dung hợp này. Sáng chế còn đề xuất chế phẩm sinh miễn dịch chứa protein RSV F trước dung hợp, và/hoặc phân tử axit nucleic, và/hoặc vectơ, như được mô tả ở trên. Sáng chế còn đề xuất việc sử dụng protein RSV F trước dung hợp được ổn định, phân tử axit nucleic, và/hoặc vectơ, theo sáng chế, để gây đáp ứng miễn dịch chống protein RSV F ở đối tượng. Còn được đề xuất là các phương pháp để gây đáp ứng miễn dịch kháng protein RSV F ở đối tượng, bao gồm việc dùng cho đối tượng protein RSV F trước dung hợp, và/hoặc phân tử axit nucleic, và/hoặc vectơ, theo sáng chế. Cũng được đề xuất là protein RSV F trước dung hợp, phân tử axit nucleic, và/hoặc vectơ, theo sáng chế dùng để tạo ra đáp ứng miễn dịch kháng Protein RSV F ở đối tượng. Còn được đề xuất là việc sử dụng protein RSV F trước dung hợp, và/hoặc phân tử axit nucleic, và/hoặc vectơ theo sáng chế để sản xuất thuốc dùng để tạo ra đáp ứng miễn dịch kháng protein RSV F ở đối tượng.

Protein RSV F trước dung hợp, phân tử axit nucleic, hoặc vectơ theo sáng chế có thể được sử dụng để ngăn chặn (phòng ngừa) và/hoặc điều trị nhiễm RSV. Theo các phương án nhất định, việc ngăn chặn và/hoặc điều trị có thể nhắm vào các nhóm bệnh nhân dễ bị nhiễm RSV. Các nhóm người bệnh này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở ví dụ, người già (ví



dụ  $\geq 50$  tuổi,  $\geq 60$  tuổi, và tốt hơn  $\geq 65$  tuổi), người trẻ (ví dụ  $\leq 5$  tuổi,  $\leq 1$  tuổi), người bệnh nằm viện và người bệnh đã từng được điều trị bằng hợp chất kháng virus nhưng có biểu hiện đáp ứng kháng virus không đầy đủ.

Protein RSV F trước dung hợp, phân tử axit nucleic và/hoặc vectơ theo sáng chế có thể được sử dụng ví dụ trong việc điều trị và/hoặc phòng ngừa độc lập bệnh hoặc tình trạng do RSV, hoặc kết hợp với các điều trị phòng ngừa và/hoặc chữa trị, như (đã có hoặc sẽ có) vắc xin, chất kháng virus và/hoặc kháng thể đơn dòng.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp để ngăn chặn và/hoặc điều trị sự nhiễm RSV ở đối tượng sử dụng protein RSV F trước dung hợp, phân tử axit nucleic và/hoặc vectơ theo sáng chế. Theo phương án đặc trưng, phương pháp ngăn chặn và/hoặc điều trị nhiễm RSV ở đối tượng bao gồm việc dung cho đối tượng cần chúng lượng có hiệu quả của protein RSV F trước dung hợp, phân tử axit nucleic và/hoặc vectơ, như được mô tả ở trên. Lượng có hiệu quả điều trị đề cập đến lượng của protein, phân tử axit nucleic hoặc vectơ, mà có hiệu quả để ngăn ngừa, cải thiện và/hoặc điều trị bệnh hoặc tình trạng do nhiễm RSV. Sự ngăn chặn bao gồm ức chế hoặc làm giảm sự lây lan của RSV hoặc ức chế hoặc làm giảm sự tấn công, phát triển hoặc tiến triển của một hoặc nhiều triệu chứng liên quan đến sự nhiễm bởi RSV. Sự cải thiện như được sử dụng ở đây có thể đề cập đến sự suy giảm của các triệu chứng bệnh thấy được hoặc cảm nhận được, virus-huyết, hoặc biểu hiện đo được khác bất kỳ của sự nhiễm bệnh cúm.

Để dùng cho các đối tượng, như là con người, sáng chế có thể sử dụng được phẩm chứa protein RSV F trước dung hợp, phân tử axit nucleic và/hoặc vectơ như được mô tả ở đây, và chất mang hoặc tá dược được dụng. Theo nội dung sáng chế, thuật ngữ "được dụng" có nghĩa là chất mang hoặc tá dược, ở các liều lượng và nồng độ được sử dụng, sẽ không gây ra các tác dụng có hại hoặc không mong muốn ở các đối tượng mà chúng được sử dụng. Các chất mang và tá dược được dụng này là đã biết trong lĩnh vực (xem Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, A. R. Gennaro, Ed., Mack Publishing Company [1990]; Pharmaceutical Formulation Development of Peptides và Proteins, S. Frokjaer và L. Hovgaard, Eds., Taylor & Francis [2000]; và Handbook of Pharmaceutical Excipients, tái bản lần thứ 3, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press [2000]). Protein RSV F, hoặc phân tử axit nucleic, ưu tiên là được phối chế và cho dung là dung dịch vô trùng mặc dù cũng có thể sử

dụng các chế phẩm đông khô. Các dung dịch vô trùng được điều chế bằng cách lọc vô trùng hoặc bằng các phương pháp khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Sau đó, các dung dịch được làm đông lạnh hoặc được nạp đầy vào đồ chứa phân liều. Độ pH của dung dịch thường nằm trong khoảng pH 3,0 đến 9,5, ví dụ độ pH từ 5,0 đến 7,5. Protein RSV F thường ở trong dung dịch có chất đệm được dụng phù hợp, và chế phẩm có thể cũng chứa muối. Tùy ý, chất làm ổn định có thể có mặt, như albumin. Theo các phương án nhất định, chất tẩy rửa được bổ sung. Theo các phương án nhất định, protein RSV F có thể được phối chế thành chế phẩm tiêm được.

Theo các phương án nhất định, hợp chất theo sáng chế còn bao gồm một hoặc nhiều tá dược. Chất bổ trợ đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này để làm tăng thêm đáp ứng miễn dịch đối với quyết định kháng nguyên đã được áp dụng. Thuật ngữ "chất bổ trợ" và "chất kích thích miễn dịch" được sử dụng thay thế lẫn nhau trong bản mô tả này, và được định nghĩa là một hoặc nhiều chất gây kích thích hệ miễn dịch. Trong bối cảnh này, tá dược được sử dụng để tăng cường đáp ứng miễn dịch cho protein RSV F theo sáng chế. Các ví dụ của các tá dược phù hợp bao gồm các muối nhôm như là nhôm hydroxit và/hoặc nhôm phosphat; các hợp chất nhũ tương-dầu (hoặc các hợp chất dầu trong nước), bao gồm các nhũ tương squalen-nước, như là MF59 (xem ví dụ, WO 90/14837); chất lập công thức saponin, như là ví dụ QS21 và Immunostimulating Complexes (ISCOMS) (xem chẳng hạn, US 5,057,540; WO 90/03184, WO 96/11711, WO 2004/004762, WO 2005/002620); các dẫn xuất vi khuẩn hoặc vi trùng, các ví dụ của chúng là monophosphoryl lipid A (MPL), 3-O-deacylated MPL (3dMPL), môtip-CpG chứa cá oligonucleotit, các độc tố vi khuẩn ribosylat hóa-ADP hoặc các đột biến của chúng, như là *E. coli* độc tố ruột không bền nhiệt LT, độc tố tả CT, và các chất tương tự; các protein nhân thật (chẳng hạn, các kháng thể hoặc các đoạn của chúng (chẳng hạn, nhằm chống bản thân kháng nguyên hoặc CD1a, CD3, CD7, CD80) và các phối tử đến các thụ thể (chẳng hạn, CD40L, GMCSF, GCSF, v.v.), mà kích thích phản ứng miễn dịch dựa trên sự tương tác với các tế bào thụ nhận. Theo các phương án nhất định chế phẩm theo sáng chế bao gồm nhôm làm tá dược, ví dụ dưới dạng nhôm hydroxit, nhôm phosphat, nhôm kali phosphat, hoặc kết hợp của chúng, ở các nồng độ 0,05 – 5 mg, ví dụ từ 0,075-1,0 mg, hàm lượng nhôm mỗi liều dùng.

Protein RSV F trước dung hợp có thể cũng được dùng kết hợp với hoặc tiếp hợp với các hạt nano, như ví dụ polyme, liposom, virosom, các hạt giống virut. Polypeptit F trước-dung hợp có thể được kết hợp với, được bọc trong hoặc liên hợp với hạt nano có hoặc không có tá dược. Sự bao bọc bên trong các liposom được mô tả, chẳng hạn, trong US 4,235,877. Sự tiếp hợp với các đại phân tử được bộc lộ, ví dụ trong US 4,372,945 hoặc US 4,474,757. Theo các phương án khác, protein RSV F được ghép trong các lắp ghép bậc cao hơn của multime.

Theo các phương án khác, chế phẩm không bao gồm tá dược.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất các phương pháp để tạo ra vắc xin chống virut hợp bào hô hấp (RSV), bao gồm bước tạo ra hợp chất theo sáng chế và lập công thức chất này thành hợp chất dược dụng. Thuật ngữ "vắc xin" biểu thị chất hoặc hợp chất chứa thành phần hoạt tính có hiệu quả gây mức độ miễn dịch nhất định ở đối tượng chống lại mầm bệnh hoặc bệnh nhất định, mà sẽ có kết quả ít nhất là làm giảm (đến vắng mặt hoàn toàn) độ nặng, thời gian hoặc biểu hiện khác của các triệu chứng liên quan đến sự nhiễm bởi mầm bệnh hoặc bệnh. Theo sáng chế, vắc xin bao gồm lượng có hiệu quả của protein RSV F trước dung hợp và/hoặc phân tử axit nucleic mã hóa protein RSV F trước dung hợp, và/hoặc vector bao gồm phân tử axit nucleic này, mà tạo ra đáp ứng miễn dịch chống protein F của RSV. Sáng chế đề xuất phương pháp ngăn chặn bệnh hệ hô hấp suy giảm nghiêm trọng dẫn đến nhập viện và sự giảm tần xuất của các biến chứng như là viêm phổi và viêm phế quản do nhiễm RSV và sinh sôi ở đối tượng. Thuật ngữ "vắc xin" theo sáng chế nghĩa là dược phẩm, và do đó thường bao gồm chất pha loãng, chất mang hoặc tá dược dược dụng. Nó có thể có hoặc không bao gồm các thành phần hoạt tính khác. Theo các phương án nhất định nó có thể là vắc xin tổ hợp, vắc xin này còn bao gồm các thành phần khác gây phản ứng miễn dịch, chẳng hạn, chống các protein khác của RSV và/hoặc chống các tác nhân nhiễm khác. Việc dùng các thành phần hoạt tính khác có thể ví dụ được thực hiện bằng cách dùng tách biệt hoặc bằng cách dùng các sản phẩm kết hợp của vắc xin theo sáng chế và các thành phần hoạt tính khác.

Các hợp chất có thể được dùng cho đối tượng, chẳng hạn, đối tượng con người. Tổng liều dùng của polypeptit RSV F trong chế phẩm cho một lần dùng có thể ví dụ khoảng 0,01  $\mu\text{g}$  đến khoảng 10 mg, ví dụ 1  $\mu\text{g}$  – 1 mg, ví dụ 10  $\mu\text{g}$  – 100  $\mu\text{g}$ . Việc xác định liều được khuyến cáo sẽ được thực hiện bởi thí nghiệm và là thông thường đối với các chuyên gia có kỹ thuật trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật.

Việc dùng các hợp chất theo sáng chế có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các đường dùng tiêu chuẩn. Các phương án không làm giới hạn bao gồm dùng ngoài ruột, như là dùng trong da, trong cơ, dưới da, xuyên qua da, hoặc qua màng nhầy, chẳng hạn, qua mũi, miệng, và các đường tương tự. Theo một phương án, hợp chất được dùng bằng cách tiêm trong cơ. Chuyên gia trung bình trong lĩnh vực biết các khả năng khác nhau để dùng hợp chất, chẳng hạn, vắc xin để gây phản ứng miễn dịch đối với (các) kháng nguyên trong vắc xin.

Đối tượng như được sử dụng ở đây tốt hơn là động vật có vú, ví dụ loài gặm nhấm, chẳng hạn, chuột, chuột bông, hoặc động vật linh trưởng không phải người, hoặc người. Tốt hơn nếu, đối tượng là đối tượng người.

Protein, phân tử axit nucleic, vectơ, và/hoặc chế phẩm có thể cũng được dùng, hoặc là làm đoạn môi, hoặc chất gia cường, trong chế độ môi-gia cường cùng loại hoặc khác loại. Nếu sự chủng ngừa gia cường được thực hiện, thông thường, sự chủng ngừa gia cường này sẽ được dùng cho cùng đối tượng tại thời điểm từ một tuần đến một năm, ưu tiên là từ hai tuần đến bốn tháng, sau khi dùng chế phẩm cho đối tượng lần đầu tiên (mà trong các trường hợp này được gọi là ‘sự chủng ngừa tạo môi’). Theo các phương án nhất định, việc dùng bao gồm dùng tạo môi và ít nhất một lần dùng gia cường.

Ngoài ra, protein theo sáng chế có thể được sử dụng làm công cụ chẩn đoán, ví dụ để kiểm tra tình trạng miễn dịch của cá thể bằng thiết lập liệu có kháng thể trong huyết thanh của cá nhân này có khả năng liên kết với protein theo sáng chế. Sáng chế do đó còn đề cập đến phương pháp chuẩn đoán trong ống nghiệm để phát hiện sự có mặt của nhiễm RSV ở bệnh nhân phương pháp này bao gồm các bước a) cho mẫu sinh học thu được từ bệnh nhân tiếp xúc với protein theo sáng chế; và b) phát hiện sự có mặt của phức chất kháng thể-protein.

Protein RSV F trước dung hợp được ổn định có thể thu được và/hoặc thu được bằng phương pháp này cũng tạo thành một phần của sáng chế, cũng như việc sử dụng chúng như được mô tả ở trên.

### **Ví dụ thực hiện sáng chế**

VÍ DỤ 1: Điều chế polypeptit RSV F trước-dung hợp ổn định nêu ở SEQ ID NO: 21)

Để tăng tính ổn định của RSV F ở cấu dạng trước dung hợp hai thể axit amin bổ sung được đưa vào biến thể RSV F trước dung hợp đã được mô tả trước đây (WO2014/174018 và

WO2014/202570). Các cấu trúc được tổng hợp và được tối ưu hóa bộ ba mã hóa tại Gene Art (Life Technologies, Carlsbad, CA). Các cấu trúc được tách dòng thành pCADN2004 hoặc được tạo ra bởi các phương pháp tiêu chuẩn đã biết rộng rãi trong lĩnh vực bao gồm gây đột biến điểm định hướng và PCR và xếp trình tự. Nền biểu hiện được sử dụng là các tế bào 293Freestyle (Life Technologies). Các tế bào này được biến nạp tạm thời bằng cách sử dụng 293Fectin (Life Technologies) theo hướng dẫn của nhà sản xuất và được nuôi cấy trong 5 ngày ở 37°C và 10% CO<sub>2</sub>. Dịch nổi nuôi cấy được thu hoạch và quay trong 5 phút ở 300 g để loại bỏ các tế bào và mảnh tế bào. Tiếp theo, dịch nổi được quay được lọc vô trùng bằng cách sử dụng máy lọc chân không 0,22 um và lưu trữ tại 4°C cho đến khi sử dụng.

#### VÍ DU 2: Tinh lọc protein RSV F trước-dung hợp

Polypeptit tái tổ hợp được tinh chế bởi quy trình tinh chế 2-bước bằng cách áp dụng cột trao đổi cat-ion để tinh lọc ban đầu và tiếp theo, cột superdex200 dùng cho bước đánh bóng để loại bỏ tạp chất dư. Đối với bước trao đổi ion ban đầu, dịch nổi nuôi cấy được pha loãng với 2 thể tích 50 mM NaOAc pH 5,0 và đi qua cột 5 ml HiTrap Canto S tại 5 ml mỗi phút. Tiếp theo cột này được rửa bởi 10 thể tích cột (CV) là 20 mM NaOAc, 50mM NaCl, 0.01% (v/v) tween20, pH 5 và rửa giải 2 CV là 20 mM NaOAc, 1M NaCl, 0.01% (v/v) tween20, pH 5. Chất rửa giải được cô đặc bằng cách sử dụng thiết bị cô đặc quay và protein còn được tinh lọc bằng cách sử dụng cột superdex200 có sử dụng 40mM Tris, 500mM NaCl, 0.01% (v/v) tween20, pH 7.4 làm chất đệm chạy. Trên Hình 1 sắc phổ của cột tinh chế gel được thể hiện. Đỉnh trội chứa protein RSV F trước dung hợp. Các phần chứa đỉnh này lần nữa được chia và nồng độ protein được xác định bằng cách sử dụng OD280 và lưu trữ tại 4°C đến khi sử dụng. Trên Hình 2 phân tích SDS-PAGE rút gọn và không rút gọn của điều chế protein cuối được thể hiện và như có thể thấy độ tinh khiết là >95%. Nhận dạng của dải được xác minh bằng cách sử dụng phương pháp western blot và các kháng thể đặc trưng protein F (không được thể hiện trên hình vẽ).

Bộ tám định lượng (BioLayer Interferometry) được dùng để đo nồng độ protein trong các dịch nổi. CR9501 (kháng thể phát hiện đặc hiệu protein RSV F trước dung hợp) và CR9503 (phát hiện protein RSV F sau dung hợp) được biotin hóa bằng các quy trình tiêu chuẩn và được cố định trên cảm biến sinh học Streptavidin (ForteBio, Portsmouth, Anh). Sau đó, các cảm biến sinh học được bọc được chặn trong dịch nổi nuôi cấy tế bào giả. Thử nghiệm

định lượng được thực hiện như sau: nhiệt độ 30C, tốc độ rung 1000 rpm, thời gian thử nghiệm 300 giây.

Nồng độ protein được tính toán sử dụng đường cong tiêu chuẩn. Đường cong tiêu chuẩn được chuẩn bị cho mỗi kháng thể được phủ sử dụng protein RSV F trước dung hợp (Krarup et. al., 2015, *ở trên*) được pha loãng trong môi trường giả được (Hình 3). Phân tích dữ liệu được thực hiện bằng cách sử dụng phần mềm ForteBio Data Analysis 6.4 (ForteBio).

### VÍ DỤ 3: Tính ổn định nhiệt của protein RSV F

Tính ổn định nhiệt của protein được tinh chế được xác định bằng phương pháp xác định hàm lượng flo quét vi sai (DSF). Protein F trước dung hợp được tinh chế được trộn với chất nhuộm huỳnh quang cam SYPRO (Life Technologies S6650) trong tấm qPCR quang 96 giếng. Chất nhuộm tối ưu và nồng độ protein được xác định bằng cách thử nghiệm (dữ liệu không được thể hiện). Pha loãng protein được thực hiện trong PBS, và mẫu đối chứng âm chứa chất nhuộm chỉ được dùng là phép trừ tham chiếu. Thực hiện đo trong thiết bị qPCR (Applied Biosystems ViiA 7) sử dụng các thông số sau: dốc nhiệt độ từ 25–95 °C với tốc độ bằng 0,015 °C mỗi giây. Dữ liệu được gom liên tục. Đường cong nóng chảy được vẽ đồ thị sử dụng phần mềm GraphPad PRISM (phiên bản 5.04). Nhiệt độ nóng chảy được tính ở 50% tối đa huỳnh quang sử dụng phương trình hồi quy EC50 không tuyến tính. Nhiệt độ nóng chảy của protein RSV F nêu ở SEQ ID NO: 21 là 68,5 độ (HÌNH 4). RSV F trước dung hợp đối chứng không có thể ở vị trí 357 và 371 có nhiệt độ nóng chảy bằng 65,0 nghĩa là đột biến kép làm tăng nhiệt độ nóng chảy thêm 3,5 độ.

Bảng 1. Axit amin chuẩn, các chữ viết tắt và đặc tính

Axit amin	3-Chữ cái	1-Chữ cái	Tính phân cực của chuỗi bên	Điện tích của chuỗi bên (pH 7,4)
alanin	Ala	A	không cực	Trung tính
arginin	Arg	R	phân cực	Điện tích dương
asparagin	Asn	N	phân cực	Trung tính
axit aspartic	Asp	D	phân cực	Điện tích âm
cystein	Cys	C	không cực	Trung tính
axit glutamic	Glu	E	phân cực	Điện tích âm
glutamin	Gln	Q	phân cực	Trung tính
glyxin	Gly	G	không cực	Trung tính
histidin	His	H	phân cực	điện tích dương (10%) trung tính (90%)
isoleuxin	Ile	I	không cực	Trung tính
leuxin	Leu	L	không cực	Trung tính
lysin	Lys	K	phân cực	Điện tích dương
methionin	Met	M	không cực	Trung tính
phenylalanin	Phe	F	không cực	Trung tính
prolin	Pro	P	không cực	Trung tính
serin	Ser	S	phân cực	Trung tính
treonin	Thr	T	phân cực	Trung tính
tryptophan	Trp	W	không cực	Trung tính
tyrosin	Tyr	Y	phân cực	Trung tính

valin	Val	V	không cực	Trung hòa
-------	-----	---	-----------	-----------

Bảng 2. Trình tự axit amin của kháng thể CR9501 và CR9502

Ab	Vùng VH	VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3
CR9501	Các axit amin 1-125 có SEQ ID NO: 16)	GASINSDNY YWT (SEQ ID NO:1)	HISYTGNTYYT PSLKS (SEQ ID NO:2)	CGAYVLISNCG WFDS (SEQ ID NO:3)
CR9502	Các axit amin 1-121 có SEQ ID NO:18	GFTFSGHTIA (SEQ ID NO:7)	WVSTNNGNTE YAQKIQG (SEQ ID NO:8)	EWLVMGGFAF DH (SEQ ID NO:9)

Ab	Vùng VL	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3
CR9501	Các axit amin 1-107 có SEQ ID NO: 17)	QASQDISTYL N (SEQ ID NO: 4)	GASNLET (SEQ ID NO:5)	QQYQYLPYT (SEQ ID NO:6)
CR9502	Các axit amin 1-110 có SEQ ID NO: 19)	GANNIGSQN VH (SEQ ID NO:10)	DDRRDRPS (SEQ ID NO:11)	QVWDSSRDQA VI (SEQ ID NO:12)



Các trình tự

Trình tự chiều dài đầy đủ của protein RSV F nhóm phụ A (SEQ ID NO: 13)

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWY  
 TSVITIELSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRE  
 LPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRLGFLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVN  
 KIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVVKQSCSISNIETVIEFQ  
 QKNNRLLLEITREFSVNAGVTTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIV  
 RQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDR  
 GWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNL CNVDIFNPKYDCKI  
 MTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTF SNGCDYVSNKGVDTVSV  
 GNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSD  
 ELLHNVNAVKSTTNIMITTIIIVIIIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINIA  
 FSN

trình tự dài đầy đủ B1 của protein RSV F (SEQ ID NO: 15)

MELLIHRLSAIFLTLAINALYLTSSQNITEEFYQSTCSAVSRGYFSALRTGWYT  
 SVITIELSNIKETKCNGTDTKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQNTPAANNRARRE  
 APQYMNYTINTTKNLNVSISKKRKRRLGFLGVGSAIASGIAVSKVLHLEGEVNKI  
 KNALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSKVLDLKNYINNQLLPVVKQSCRISNIETVIEFQQ  
 KNSRLLLEINREFSVNAGVTTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVR  
 QQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPIYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRDRG  
 WYCDNAGSVSFFPQADTCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIM  
 TSKTDISSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTF SNGCDYVSNKGVDTVSVGN  
 TLYYVVKLEGKNL YVKGEPIINYDPLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDEL  
 LHNVTGKSTTNIMITTIIIVIIIVILLSLIAIGLLLYCKAKNTPVTLSKDQLSGINIAFS  
 K

SEQ ID NO: 14 (fibrin)

GYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFL

trình tự dài đầy đủ CL57-v224 của protein RSV F (SEQ ID NO: 20)

MELPILKTNAITLILAAVTLCFASSQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITI  
 ELSNIKENKCNNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPAANNRARRRELPRF  
 MNYTLNNTKNNNVTLSSKKRKRFLGFLGVSASIAVSKVLHLEGEVNIKSA  
 LLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVKQSCSISNIETVIEFQQKNN  
 RLLEITREFSVNAGVTTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQS  
 YSIMSIIKEEVLA YVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWY  
 CDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNIDIFNPKYDCKIMTSK  
 TDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTL  
 YYVNVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDLLH  
 NVNVGKSTTNIMITTHIIVILLLLIAVGLFLYCKARSTPVTLSSKDQLSGINNIASFN

RSV F, N67I, S215P, D486N, và 357K và 371Y (SEQ ID NO: 21)

MELLILKANAITLITAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWY  
 TSVITIELSNIKEIKCNNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRRE  
 LPRFMNYTLNNAKKTNVTLSSKKRKRFLGFLGVSASIAVSKVLHLEGEVNI  
 KIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVKQSCSIPNIETVIEFQ  
 QKNNRLLEITREFSVNAGVTTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIV  
 RQQSYSIMSIIKEEVLA YVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDR  
 GWYCDNAGSVSFFPQAEKCKVQSNRVFCDTMYSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKI  
 MTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSSNGCDYVSNKGVDTVSV  
 GNTLYYVNVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSNEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSD  
 ELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL

CR9501 chuỗi nặng (SEQ ID NO: 16):

QVQLVQSGPGLVKPSQTLALTCNVSGASINSDNYYWTWIRQRPGGGLEWIG  
 HISYTGNTYYTPSLKSRLSMSLETSQSQFSLRLTSVTAADSAVYFCAACGAYVLISN  
 CGWFDSWGQGTQVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV  
 SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD  
 KKVEPKSC

CR9501 chuỗi nhẹ (SEQ ID NO: 17):

EIVMTQSPSSLASIGDRVTITCQASQDISTYLNWYQQKPGQAPRLLIYGASN  
 LETGVPSRFTGSGYGTDFSVTISSLQPEDIATYYCQQYQYLPYTFAPGTKVEIKRTVA  
 APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYAPREKRVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD  
 SKDSTYSLSSTLTLKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

CR9502 chuỗi nặng (SEQ ID NO: 18):

EVQLLQSGAELKKPGASVKISCKTSGFTFSGHTIAWVRQAPGQGLEWMGWV  
 STNNGNTEYAQKIQRVTMTMDTSTSTVYMELRSLTSDDTAVYFCAREWLVGGG  
 FAFDHWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS  
 WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK  
 RVEPKSC

CR9502 chuỗi nhẹ (SEQ ID NO: 19):

QSVLTQASSVSVAPGQTARITCGANNIGSQNVHWYQQKPGQAPVLLVYDDR  
 DRPSGIPDRFSGSNGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSRRDQAVIFGGGKLT  
 VLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVE  
 TTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRYSYSCQVTHEGSTVEKTIAPTECS

**YÊU CẦU BẢO HỘ**

1. Protein dung hợp (F) của virus hợp bào hô hấp (RSV) trước dung hợp tái tổ hợp bao gồm đột biến của gốc axit amin trên vị trí 215 thành P (S215P), đột biến của axit amin T trên vị trí 357 thành K (T357K) và đột biến của axit amin N trên vị trí 371 thành Y (N371Y) trong đó các vị trí axit amin được đưa ra viện dẫn đến SEQ ID NO: 13.

2. Protein RSV F trước dung hợp theo điểm 1, còn bao gồm ít nhất một đột biến được chọn từ nhóm bao gồm:

- (a) đột biến của gốc axit amin N/T trên vị trí 67 thành I; và
- (b) đột biến của gốc axit amin D trên vị trí 486 thành N.

3. Protein RSV F trước dung hợp theo một điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó protein bao gồm ít nhất một epitop mà đặc hiệu với protein F cấu dạng trước-dung hợp, trong đó ít nhất một epitop được nhận ra bởi kháng thể đơn dòng đặc hiệu trước dung hợp, chứa vùng chuỗi nặng CDR1 nêu ở SEQ ID NO: 1, vùng chuỗi nặng CDR2 có SEQ ID NO: 2, vùng chuỗi nặng CDR3 có SEQ ID NO: 3 và vùng chuỗi nhẹ CDR1 có SEQ ID NO: 4, vùng chuỗi nhẹ CDR2 có SEQ ID NO: 5, và vùng chuỗi nhẹ CDR3 có SEQ ID NO: 6 và/hoặc kháng thể đơn dòng đặc trưng trước-dung hợp, bao gồm vùng CDR1 chuỗi nặng có SEQ ID NO: 7, vùng chuỗi nặng CDR2 có SEQ ID NO: 8, vùng chuỗi nặng CDR3 có SEQ ID NO: 9 và vùng chuỗi nhẹ CDR1 có SEQ ID NO: 10, vùng chuỗi nhẹ CDR2 có SEQ ID NO: 67, và vùng chuỗi nhẹ CDR3 có SEQ ID NO: 11.

4. Protein RSV F trước dung hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó protein là trimeric.

5. Protein RSV F trước dung hợp theo một điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, bao gồm vùng F1 bị cắt cụt và vùng trimer hóa khác loại liên kết với vùng F1 bị cắt cụt này.

6. Protein RSV F trước dung hợp theo điểm 5, trong đó vùng trimer hóa khác loại bao gồm trình tự axit amin GYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL (SEQ ID NO: 14).

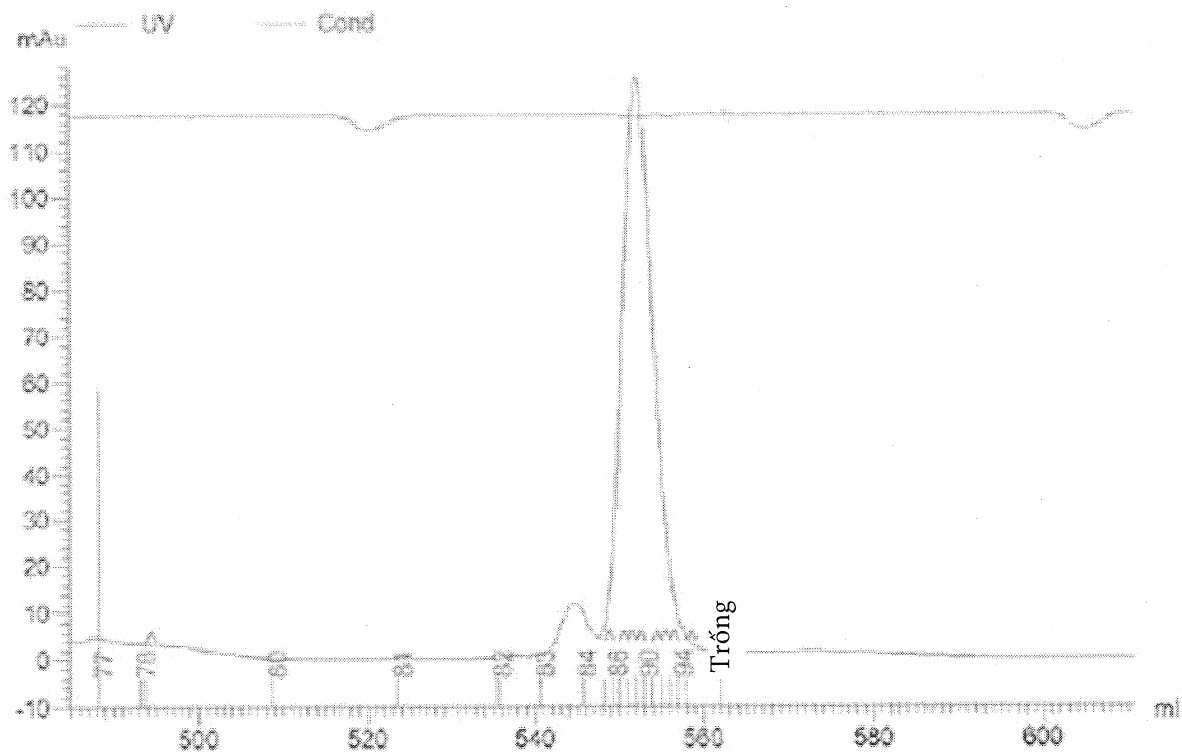
7. Protein RSV F trước dung hợp theo điểm 5 hoặc 6, trong đó vùng trimer hóa được liên kết với gốc axit amin 513 của protein RSV F.

8. Protein RSV F trước dung hợp theo một điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó protein RSV F bao gồm trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO: 21.
9. Phân tử axit nucleic mã hóa protein RSV F trước dung hợp theo một điểm bất kỳ trong số các điểm 1-8 nêu trên.
10. Phân tử axit nucleic theo điểm 9, trong đó phân tử axit nucleic đã được tối ưu hóa-codon để biểu hiện trong các tế bào động vật có vú.
11. Vectơ bao gồm phân tử axit nucleic theo điểm 9 hoặc điểm 10.
12. Chế phẩm chứa protein RSV F trước dung hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1-8, phân tử axit nucleic theo điểm 9 hoặc điểm 10 và/hoặc vectơ theo điểm 11.

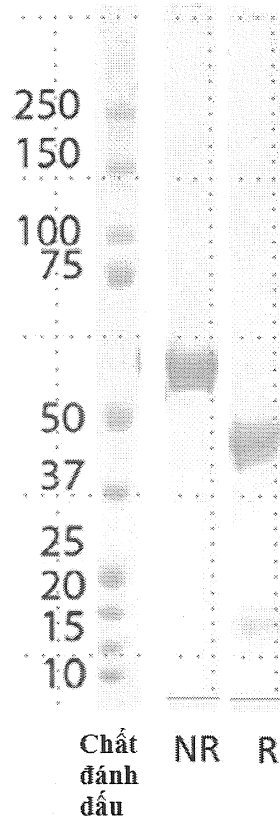
1/4

## Lọc gel

Cột: Superdex200 16/600  
Chất đệm: 40 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH 7,5  
Vòng (ml): 4  
Thể tích mẫu (ml): 0,82  
Dòng chảy (ml/phút): 1,0  
Các đoạn (ml): 1 ml  
Nhiệt độ °C: 18  
Bình luận

**HÌNH 1**

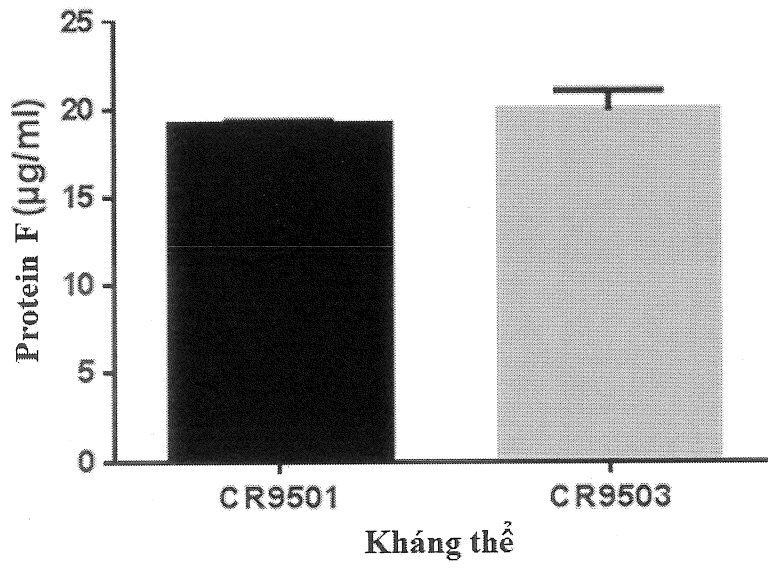
2/4



HÌNH 2

3/4

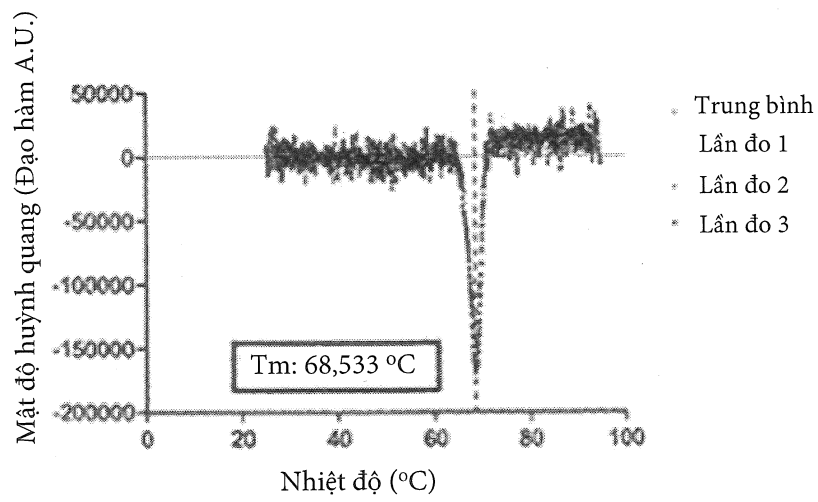
RSV150688



HÌNH 3



4/4



HÌNH 4





<212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> CR9502 HCDR2

<400> 8

Trp Val Ser Thr Asn Asn Gly Asn Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Ile Gln  
 1                    5                    10                    15

Gly

<210> 9  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> CR9502 HCDR3

<400> 9

Glu Trp Leu Val Met Gly Gly Phe Ala Phe Asp His  
 1                    5                    10

<210> 10  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> CR9502 LCDR1

<400> 10

Gly Ala Asn Asn Ile Gly Ser Gln Asn Val His  
 1                    5                    10

<210> 11  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> CR9502 LCDR2

<400> 11

Asp Asp Arg Asp Arg Pro Ser  
 1                    5

<210> 12  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> CR9502 LCDR3

<400> 12

Gln Val Trp Asp Ser Ser Arg Asp Gln Ala Val Ile  
 1 5 10

<210> 13  
 <211> 574  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> RSV F protein full length sequence

<400> 13

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr  
 1 5 10 15

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe  
 20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu  
 35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile  
 50 55 60

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys  
 65 70 75 80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu  
 85 90 95

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro  
 100 105 110

Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr  
 115 120 125

Leu Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val  
 130 135 140

Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu  
145 150 155 160

Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys  
165 170 175

Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val  
180 185 190

Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn  
195 200 205

Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln  
210 215 220

Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn  
225 230 235 240

Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu  
245 250 255

Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys  
260 265 270

Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile  
275 280 285

Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro  
290 295 300

Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro  
305 310 315 320

Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg  
325 330 335

Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe  
340 345 350

Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp  
355 360 365

## 39515

Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val  
 370 375 380

Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr  
 385 390 395 400

Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys  
 405 410 415

Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile  
 420 425 430

Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp  
 435 440 445

Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly  
 450 455 460

Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro  
 465 470 475 480

Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn  
 485 490 495

Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu  
 500 505 510

Leu His Asn Val Asn Ala Val Lys Ser Thr Thr Asn Ile Met Ile Thr  
 515 520 525

Thr Ile Ile Ile Val Ile Ile Val Ile Leu Leu Ser Leu Ile Ala Val  
 530 535 540

Gly Leu Leu Leu Tyr Cys Lys Ala Arg Ser Thr Pro Val Thr Leu Ser  
 545 550 555 560

Lys Asp Gln Leu Ser Gly Ile Asn Asn Ile Ala Phe Ser Asn  
 565 570

<210> 14

<211> 27

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> fibritin

<400> 14

Gly Tyr Ile Pro Glu Ala Pro Arg Asp Gly Gln Ala Tyr Val Arg Lys  
1 5 10 15

Asp Gly Glu Trp Val Leu Leu Ser Thr Phe Leu  
20 25

<210> 15

<211> 574

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Protein RSV F B1 chiều dài đầy đủ

<400> 15

Met Glu Leu Leu Ile His Arg Leu Ser Ala Ile Phe Leu Thr Leu Ala  
1 5 10 15

Ile Asn Ala Leu Tyr Leu Thr Ser Ser Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe  
20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Arg Gly Tyr Phe Ser Ala Leu  
35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile  
50 55 60

Lys Glu Thr Lys Cys Asn Gly Thr Asp Thr Lys Val Lys Leu Ile Lys  
65 70 75 80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu  
85 90 95

Met Gln Asn Thr Pro Ala Ala Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Ala Pro  
100 105 110

Gln Tyr Met Asn Tyr Thr Ile Asn Thr Thr Lys Asn Leu Asn Val Ser  
115 120 125

Ile Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val  
130 135 140



## 39515

Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Ile Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu  
145 150 155 160

Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Asn Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys  
165 170 175

Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val  
180 185 190

Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asn Asn Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn  
195 200 205

Gln Gln Ser Cys Arg Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln  
210 215 220

Gln Lys Asn Ser Arg Leu Leu Glu Ile Asn Arg Glu Phe Ser Val Asn  
225 230 235 240

Ala Gly Val Thr Thr Pro Leu Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu  
245 250 255

Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys  
260 265 270

Leu Met Ser Ser Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile  
275 280 285

Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro  
290 295 300

Ile Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro  
305 310 315 320

Leu Cys Thr Thr Asn Ile Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg  
325 330 335

Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe  
340 345 350

Pro Gln Ala Asp Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp  
355 360 365

Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Ser Leu Cys Asn Thr  
370 375 380

## 39515

Asp Ile Phe Asn Ser Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr  
385 390 395 400

Asp Ile Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys  
405 410 415

Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile  
420 425 430

Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp  
435 440 445

Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Leu Glu Gly  
450 455 460

Lys Asn Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Tyr Tyr Asp Pro  
465 470 475 480

Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn  
485 490 495

Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Arg Ser Asp Glu Leu  
500 505 510

Leu His Asn Val Asn Thr Gly Lys Ser Thr Thr Asn Ile Met Ile Thr  
515 520 525

Thr Ile Ile Ile Val Ile Ile Val Val Leu Leu Ser Leu Ile Ala Ile  
530 535 540

Gly Leu Leu Leu Tyr Cys Lys Ala Lys Asn Thr Pro Val Thr Leu Ser  
545 550 555 560

Lys Asp Gln Leu Ser Gly Ile Asn Asn Ile Ala Phe Ser Lys  
565 570

<210> 16  
<211> 228  
<212> PRT  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> Chuỗi nặng CR9501

## 39515

&lt;400&gt; 16

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
 1 5 10 15

Thr Leu Ala Leu Thr Cys Asn Val Ser Gly Ala Ser Ile Asn Ser Asp  
 20 25 30

Asn Tyr Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln Arg Pro Gly Gly Gly Leu Glu  
 35 40 45

Trp Ile Gly His Ile Ser Tyr Thr Gly Asn Thr Tyr Tyr Thr Pro Ser  
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Ser Met Ser Leu Glu Thr Ser Gln Ser Gln Phe  
 65 70 75 80

Ser Leu Arg Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Ser Ala Val Tyr Phe  
 85 90 95

Cys Ala Ala Cys Gly Ala Tyr Val Leu Ile Ser Asn Cys Gly Trp Phe  
 100 105 110

Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr  
 115 120 125

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser  
 130 135 140

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu  
 145 150 155 160

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His  
 165 170 175

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser  
 180 185 190

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys  
 195 200 205

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu  
 210 215 220

Pro Lys Ser Cys  
225

<210> 17  
<211> 214  
<212> PRT  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> Chuỗi nhẹ CR9501

<400> 17

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Ile Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Thr Tyr  
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Thr Gly  
50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Ser Val Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gln Tyr Leu Pro Tyr  
85 90 95

Thr Phe Ala Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
165 170 175

# 39515

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

<210> 18  
 <211> 224  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Chuỗi nặng CR9502

<400> 18

Glu Val Gln Leu Leu Gln Ser Gly Ala Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly His  
 20 25 30

Thr Ile Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

Gly Trp Val Ser Thr Asn Asn Gly Asn Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Ile  
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Met Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr  
 65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys  
 85 90 95

Ala Arg Glu Trp Leu Val Met Gly Gly Phe Ala Phe Asp His Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
 115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala  
 130 135 140

# 39515

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
 145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala  
 165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val  
 180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His  
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys  
 210 215 220

<210> 19  
 <211> 215  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Chuỗi nhẹ CR9502

<400> 19

Gln Ser Val Leu Thr Gln Ala Ser Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln  
 1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Ala Asn Asn Ile Gly Ser Gln Asn Val  
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr  
 35 40 45

Asp Asp Arg Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly  
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Arg Asp Gln  
 85 90 95

Ala Val Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro  
 100 105 110

# 39515

Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu  
 115 120 125

Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro  
 130 135 140

Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala  
 145 150 155 160

Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala  
 165 170 175

Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg  
 180 185 190

Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr  
 195 200 205

Ile Ala Pro Thr Glu Cys Ser  
 210 215

<210> 20

<211> 574

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Protein RSV F CL57-v224 chiều dài đầy đủ

<400> 20

Met Glu Leu Pro Ile Leu Lys Thr Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Ala  
 1 5 10 15

Ala Val Thr Leu Cys Phe Ala Ser Ser Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe  
 20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu  
 35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile  
 50 55 60

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys  
 65 70 75 80

## 39515

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu  
85 90 95

Met Gln Ser Thr Pro Ala Ala Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro  
100 105 110

Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Thr Lys Asn Asn Asn Val Thr  
115 120 125

Leu Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val  
130 135 140

Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Ile Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu  
145 150 155 160

Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys  
165 170 175

Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val  
180 185 190

Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn  
195 200 205

Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln  
210 215 220

Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn  
225 230 235 240

Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu  
245 250 255

Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys  
260 265 270

Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile  
275 280 285

Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro  
290 295 300

Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro  
305 310 315 320



## 39515

Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg  
 325 330 335

Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe  
 340 345 350

Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp  
 355 360 365

Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Ile  
 370 375 380

Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr  
 385 390 395 400

Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys  
 405 410 415

Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile  
 420 425 430

Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp  
 435 440 445

Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly  
 450 455 460

Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro  
 465 470 475 480

Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn  
 485 490 495

Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu  
 500 505 510

Leu His Asn Val Asn Val Gly Lys Ser Thr Thr Asn Ile Met Ile Thr  
 515 520 525

Thr Ile Ile Ile Val Ile Ile Val Ile Leu Leu Leu Leu Ile Ala Val  
 530 535 540

# 39515

Gly Leu Phe Leu Tyr Cys Lys Ala Arg Ser Thr Pro Val Thr Leu Ser  
 545 550 555 560

Lys Asp Gln Leu Ser Gly Ile Asn Asn Ile Ala Phe Ser Asn  
 565 570

<210> 21

<211> 544

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> RSV F, N67I, S215P, D486N, và 357K và 371Y

<400> 21

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr  
 1 5 10 15

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe  
 20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu  
 35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile  
 50 55 60

Lys Glu Ile Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys  
 65 70 75 80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu  
 85 90 95

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro  
 100 105 110

Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr  
 115 120 125

Leu Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val  
 130 135 140

Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu  
 145 150 155 160

## 39515

Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys  
 165 170 175

Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val  
 180 185 190

Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn  
 195 200 205

Lys Gln Ser Cys Ser Ile Pro Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln  
 210 215 220

Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn  
 225 230 235 240

Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu  
 245 250 255

Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys  
 260 265 270

Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile  
 275 280 285

Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro  
 290 295 300

Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro  
 305 310 315 320

Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg  
 325 330 335

Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe  
 340 345 350

Pro Gln Ala Glu Lys Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp  
 355 360 365

Thr Met Tyr Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val  
 370 375 380

Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr  
 385 390 395 400

Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys  
 405 410 415

Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile  
 420 425 430

Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp  
 435 440 445

Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly  
 450 455 460

Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro  
 465 470 475 480

Leu Val Phe Pro Ser Asn Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn  
 485 490 495

Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu  
 500 505 510

Leu Ser Ala Ile Gly Gly Tyr Ile Pro Glu Ala Pro Arg Asp Gly Gln  
 515 520 525

Ala Tyr Val Arg Lys Asp Gly Glu Trp Val Leu Leu Ser Thr Phe Leu  
 530 535 540