



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

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

(11)



1-0027445

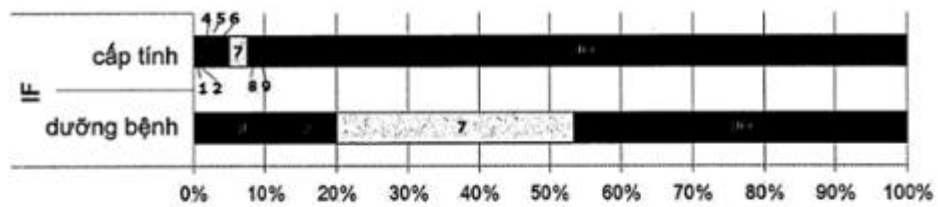
(51)⁷ A61K 39/00; C07D 16/10

(13) B

-
- (21) 1-2014-00979 (22) 07/09/2012
(86) PCT/JP2012/005699 07/09/2012 (87) WO/2013/035345 A2 14/03/2013
(30) 61/532,671 09/09/2011 US; 61/532,605 09/09/2011 US
(45) 25/02/2021 395 (43) 25/12/2014 321A
(73) 1. MEDICAL AND BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD. (JP)
KDX Nagoya Sakae Bldg. 10F, 5-3, Sakae 4-chome, Naka-ku, Nagoya-shi, Aichi
460-0008, Japan
2. OSAKA UNIVERSITY (JP)
1-1, Yamadaoka, Suita-shi, Osaka 565-0871 Japan
3. THE RESEARCH FOUNDATION FOR MICROBIAL DISEASES OF OSAKA
UNIVERSITY (JP)
c/o OSAKA UNIVERSITY, 3-1, Yamadaoka, Suita-Shi, Osaka 541-8505 Japan
4. Mahidol University (TH)
420/6 Ratchawithi Road, Ratchathewi, Bangkok 10400 Thailand
5. Department of Medical Sciences (DMSc) (TH)
c/o Ministry of Public Health, Tiwanon Road, Muang, Nonthaburi 11000 Thailand
(72) Setthapramote Chayanee (TH); Tadahiro Sasaki (JP); Motoki Kuhara (JP);
Ramasoota Pongrama (TH); Thattiyaphong Aree (TH); Anantapreecha Surapee (TH);
Sawanpanyalert Pathom (TH); Yoshinobu Okuno (JP); Kazuyoshi Ikuta (JP); A-
nuegoonpipat Atchareeya (TH); Dhepakson Panadda (TH); Prachasuphap Apichai
(TH); Pattarin Prawatsilpa (TH).
(74) Công ty TNHH Nghiên cứu và Tư vấn chuyển giao công nghệ và đầu tư
(CONCETTI)
-

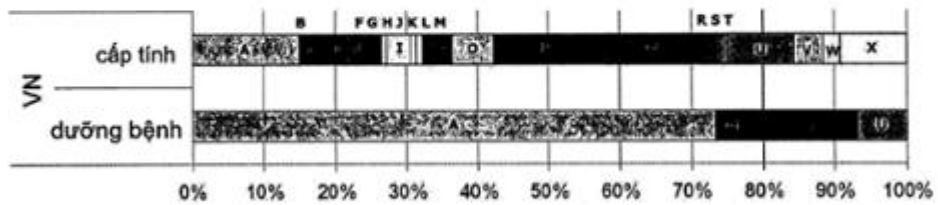
(54) KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG KHÁNG VIRUT GÂY BỆNH SỐT XUẤT HUYẾT
(VIRUT DENGUE) VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề xuất các vật liệu điều trị bệnh truyền nhiễm do virus dengue gây ra. Sáng chế cũng đề xuất các kháng thể đơn dòng của người đối với tất cả các kiểu huyết thanh của virus dengue. Các phương pháp sử dụng các kháng thể đơn dòng của người để trung hòa tất cả các kiểu huyết thanh của virus dengue được đề xuất bằng cách sử dụng các tế bào lympho máu ngoại vi của bệnh nhân.



Các nhóm theo thử nghiệm IF

	1	2	3	4	5	6	7
DENV-1	-	+	+	+	+	+	+
DENV-2	+	+	+	+	+	+	+
DENV-3	-	-	-	-	-	-	-
DENV-4	-	+	+	+	+	+	+



Các nhóm theo thử nghiệm VN

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
DENV-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DENV-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DENV-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DENV-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

-: mức giảm sao chép của virus <50%
 -: mức giảm sao chép của virus <50%
 ++: mức giảm sao chép của virus ≥ 90%

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các vật liệu và phương pháp điều trị bệnh truyền nhiễm do virus dengue gây ra. Sáng chế cũng đề xuất kháng thể đơn dòng kháng virus dengue (dengue virus - DENV) hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của kháng thể này, kháng thể đơn dòng hoặc đoạn gắn kháng nguyên của kháng thể này có hoạt tính trung hòa đối với các kiểu huyết thanh DENV-1, DENV-2, DENV-3 và DENV-4, trong đó kháng thể đơn dòng bao gồm kháng thể đơn dòng của người hoặc kháng thể đơn dòng được làm cho giống người.

NGUỒN KINH PHÍ CHÍNH PHỦ

Đối tượng được mô tả trong tài liệu này được hỗ trợ, ít nhất một phần, bởi Cơ quan Khoa học và Công nghệ Nhật Bản (Japan Science and Technology Agency - JST)/Cơ quan Hợp tác Quốc tế Nhật Bản (Japan International Cooperation Agency - JICA) dưới dạng một phần của Chương trình đối tác nghiên cứu khoa học và công nghệ phục vụ phát triển bền vững (the Science and Technology Research Partnership for Sustainable Development - SATREPS) và là chương trình của Trung tâm Nghiên cứu sáng lập về các bệnh truyền nhiễm mới nổi và tái nổi, mà được thực hiện thông qua dự án do Bộ Giáo dục, Văn hóa, Thể thao, Khoa học và Công nghệ của Nhật Bản ủy nhiệm.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Có nhiều bệnh truyền nhiễm do virus không có vắc xin phòng bệnh và/hoặc thuốc kháng virus thích hợp để điều trị theo các phương pháp điều trị thông thường, trong đó có bệnh truyền nhiễm virus dengue ký sinh ở muỗi xuất hiện ở các vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới. Theo ước tính, mỗi năm trên thế giới có khoảng năm mươi triệu trường hợp nhiễm bệnh do virus dengue. Virus dengue có bốn kiểu huyết thanh (DENV-1 đến DENV-4) khác nhau về mặt kháng nguyên có chung các kháng nguyên chính trong nhóm, và với các flavivirus của muỗi và ve khác. Theo Innis và các cộng sự, Am. J. Trop. Med. Hyg. 40:676-687 (1989); Calisher và các cộng sự, J. Gen. Virol. 70: 37-43 (1989). Sự lây lan toàn cầu của bốn kiểu huyết thanh của virus dengue

(DENV-1 đến DENV-4) đã làm cho virus dengue trở thành mối quan ngại lớn đối với sức khỏe cộng đồng. Thông thường, các kháng thể trung hòa có sẵn khi nhiễm DENV nguyên phát đóng vai trò quan trọng trong việc cung cấp các kháng thể trung hòa bảo vệ giúp khỏi bị nhiễm cùng một kiểu huyết thanh đó. Tuy nhiên, các kháng thể có sẵn này làm trung gian gây ra đáp ứng không bảo vệ nếu sau đó bị nhiễm DENV kiểu khác và các kháng thể này được cho là làm tăng tiến trình của bệnh, do hiện tượng tăng cường phụ thuộc kháng thể (antibody-dependent enhancement - ADE). Nhiễm DENV có thể không có triệu chứng, ngay cả trong trường hợp nhiễm thứ phát.

Khi người bị bội nhiễm với cùng một virus, như virus gây bệnh cúm và DENV, thì các tế bào ghi nhớ có sẵn sản sinh ra kháng thể đặc hiệu có thể đóng vai trò quan trọng giúp cung cấp nhanh chóng các kháng thể trung hòa để bảo vệ khỏi tình trạng nhiễm virus hiện tại. Đối với DENV, các kháng thể trung hòa có sẵn sinh ra khi nhiễm virus nguyên phát sẽ bảo vệ để khỏi bị nhiễm cùng một kiểu huyết thanh của DENV. Những trường hợp nhiễm dengue nặng có thể chủ yếu xảy ra ở những bệnh nhân nhiễm thứ phát các kiểu huyết thanh DENV khác nhau. Điều này có thể là do hiện tượng tăng cường phụ thuộc kháng thể (ADE), là hiện tượng khi nhiễm DENV nguyên phát sẽ sinh ra một phần các kháng thể kháng DENV có sẵn, nhờ đó mà virus nhiễm phải này có thể được khuếch đại trong các đại thực bào dương tính có thụ thể Fc. Theo Sangkawibha và các cộng sự, *Am. J. Epidemiol.* 120: 653-669 (1984); Halstead và các cộng sự, *J. Exp. Med.* 146:201-217 (1977); Diamond và các cộng sự, *Immunol. Rev.* 225:212-225 (2008). Hầu hết các trường hợp nhiễm DENV có thể không có triệu chứng, ngay cả ở các cá nhân bị nhiễm thứ phát DENV kiểu khác. Một vài trường hợp nhiễm bệnh này có thể có phổ rộng các triệu chứng lâm sàng khác nhau, từ sốt dengue nhẹ đến sốt xuất huyết dengue nặng (dengue hemorrhagic fever - DHF) và hội chứng sốc dengue (dengue shock syndrome - DSS). Theo Harris và các cộng sự, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 63:5-11(2000).

Chưa có thuốc hoặc vaccin kháng virus đặc hiệu nào được chấp thuận để sử dụng lâm sàng chống lại DENV. Do đó, có yêu cầu cấp bách về các phương pháp điều trị chống lại bệnh này. Liệu pháp miễn dịch thụ động có thể là một cách tiếp cận để điều trị dengue, nếu có thể phát triển các kháng thể đơn dòng (monoclonal antibodies - MAb) trung hòa hiệu quả với tất cả các kiểu huyết thanh của virus này, mà không xảy

ra hiện tượng ADE với bất kỳ kiểu huyết thanh nào của DENV. Một vài thử nghiệm phòng bệnh và thử nghiệm điều trị đã được tiến hành bằng cách sử dụng các MAb ở chuột (theo Sukupolvi-Petty và các cộng sự, *J. Virol.*, 84:9227-9239 (2010).), và kháng thể IgG1 được làm cho giống người có nguồn gốc từ loài tinh tinh (theo Goncalvez và các cộng sự, *J. Virol.* 78:12910-12918 (2004).). Để thu được MAb của người kháng DENV (HuMAb), cần phải có một giao thức để thu được các dòng vô tính tế bào lai một cách có hiệu quả.

Các HuMAb được sử dụng ngày càng nhiều trong điều trị ung thư, và gần đây hơn, trong điều trị các bệnh truyền nhiễm (theo Reichert và các cộng sự, *Nat. Biotechnol.* 23:1073-1078 (2005)), như virus RS (theo Frogel và các cộng sự, *J. Manag. Care Pharm.* 16:46-58 (2010); Mansbach và các cộng sự, *Pediatr Emerg Care* 23: 362-367 (2007)). Có thể sản xuất các HuMAb bằng cách bất tử hóa các tế bào B bởi virus Epstein-Barr (EBV) (theo Kozbor, *J. Immunol.*, 127:1275-1280 (1981); Steinitz và các cộng sự, *J. Immunol.*, 141: 3516-3522 (1988); Lanzavecchia và các cộng sự, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 18:523-528 (2007)) hoặc bằng cách dung hợp các tế bào B với đối tác thích hợp để sản xuất các tế bào lai (theo Kozbor và các cộng sự, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79:6651-6655 (1982); Karpas và các cộng sự, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98:1799-1804(1998)).

Các phương pháp như vậy rất không hiệu quả. Nhiều chiến lược thay thế khác đã được phát triển, bao gồm phương pháp nhân tính hóa các MAb ở chuột thông qua kỹ thuật protein (theo Jones và các cộng sự, *Nature*, 321:522-525(1986)), lựa chọn các kháng thể từ các ngân hàng biểu hiện trên thể thực khuẩn các đoạn kháng thể của người (theo McCafferty và các cộng sự, *Nature* 348:552-554 (1990)), và gây miễn dịch cho chuột chuyển gen có chứa nhiều vị trí globulin miễn dịch của người, sau đó sản xuất các kháng thể đơn dòng dùng công nghệ tế bào lai (theo Green và các cộng sự, *J. Immunol. Methods*, 231:11-23 (1999)). Tuy nhiên, số lượng các kháng thể điều trị chống lại các tác nhân gây nhiễm vẫn còn hạn chế (theo Lanzavecchia và các cộng sự, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 18:523-528 (2007)).

Nhiều nghiên cứu đã phát triển thành công các HuMAb bằng cách sử dụng các tế bào B ghi nhớ của bệnh nhân, kháng lại coronavirut gây bệnh SARS (theo Traggiai và các cộng sự, *Nat Med* 10: 871-875 (2004)), virus gây bệnh cúm gia cầm H5N1 độc

lực cao (theo Simmons và các cộng sự, PLoS Med 4:e178 (2007)), các virus gây bệnh cúm theo mùa H1N1 và H3N2 (theo Frank và các cộng sự, Viral Immunol., 2:31-36 (1989)), và DENV (theo Schieffelin và các cộng sự, Virol. J. 7:28 (2010), Dejnirattisai và các cộng sự, Science 328:745-748 (2010); Beltramello và các cộng sự, Cell. Host. Microbe 8:271-283 (2010), de Alwis và các cộng sự, PLoS NTG 5:e1188 (2011)), thông qua chuyển đổi với EBV. Ngoài ra, một vài nghiên cứu đã điều chế thành công các HuMAb đặc hiệu bằng cách sử dụng các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (peripheral blood mononuclear cells – PBMC) trong khoảng thời gian 6 đến 7 ngày sau khi tiêm vaccin, như virus gây bệnh cúm (theo Wrammert và các cộng sự, Nature 453:667-671 (2008)) hoặc tiêm vaccin tăng cường (theo Lanzavecchia và các cộng sự, Curr. Opin. Biotechnol., 18:523-528 (2007)). Một vài HuMAb được điều chế chống lại các virus cúm A theo mùa, H1N1 và H3N2, bằng cách dung hợp PBMC lấy từ những tình nguyện viên được tiêm vaccin cúm với các tế bào đối tác dung hợp thể khảm chuột-người mới được phát triển gần đây, được gọi là SPYMEG (theo Kubota-Koketsu và các cộng sự, Biochem. Biophys. Res. Commun., 387:180-185 (2009)).

Phương pháp điều chế các HuMAb thông qua quá trình bất tử hóa các tế bào B có nguồn gốc từ bệnh nhân bằng phương pháp EBV, theo Dejnirattisai và các cộng sự (Science 328:745-748 (2010)) đã sử dụng các tế bào B từ 7 bệnh nhân bị nhiễm DENV trong giai đoạn 15-24 ngày sau khi giảm sốt để điều chế các HuMAb kháng E và kháng prM. Các nhà nghiên cứu cũng theo dõi thấy rằng 89% các HuMAb kháng E là kiểu phức. Tuy nhiên, các nhà nghiên cứu đã điều chế nhiều HuMAb kháng prM hơn so với HuMAb kháng E. Các HuMAb kháng prM thì cũng có tính phản ứng chéo cao với tất cả 4 kiểu huyết thanh của DENV (94%) và ADE được xúc tiến có hiệu lực.

Cũng bằng cách sử dụng phương pháp bất tử hóa, Beltramello et al. (Cell. Host. Microbe, 8:271-283 (2010)) đã sử dụng các tế bào B của ba bệnh nhân nhiễm nguyên phát sau 200 ngày cho đến 8 năm trở lên sau khi nhiễm và của hai bệnh nhân bị nhiễm thứ phát vào thời điểm 212 đến 510 ngày sau khi nhiễm. Do vùng III của protein E là đích chính kháng flavivirus trung hòa ở chuột (Oliphant et al., "J. Virol. 81:11828-11839 (2007)), các nhà nghiên cứu cũng đã thực hiện sàng lọc rộng rãi để có thể hiểu sâu về tính đặc hiệu vùng và tính phản ứng chéo của các kháng thể đặc hiệu thuộc vùng III của protein E được phân lập từ 2 bệnh nhân, một người bị nhiễm

nguyên phát (người cho 13) và người kia bị nhiễm thứ phát (người cho 12). Từ người cho 13, 18 trong số 152 HuMAb đã phản ứng với vùng III, trong đó bao gồm 13 kháng thể kiểu đặc hiệu, 1 kháng thể kiểu phức phụ, và 4 kháng thể kiểu phức. Từ người cho 12, 138 trong số 313 HuMAb đã phản ứng với vùng III, trong đó bao gồm 44 kháng thể kiểu đặc hiệu, 31 kháng thể kiểu phức phụ, và 63 kháng thể kiểu phức.

Theo de Alwis và các cộng sự (PLoS NTG 5:e1188 (2011)) đã chỉ ra phương pháp điều chế các HuMAb kháng DENV bằng cách sử dụng các tế bào B ghi nhớ của 2 bệnh nhân đã được xác nhận là bị nhiễm DENV 1, cách đó 8 năm trước. Hầu hết các HuMAb thu được thì trung hòa yếu và không gắn kết với protein E. Vì vậy, hiệu quả khi điều chế các HuMAb trung hòa kiểu phức là cao hơn đáng kể trong các trường hợp nhiễm thứ phát, theo tài liệu của Beltramello và các cộng sự (Cell. Host. Microbe 8:271-283 (2010)).

Theo Wrammert và các cộng sự (Nature 453:667-671 (2008)) đã nhận thấy rằng các tế bào huyết tương tiết kháng thể IgG+ đặc hiệu với bệnh cúm nhanh và mạnh ở các mức đỉnh khoảng chừng 7 ngày sau khi tiêm vaccin. Các tế bào đó chiếm tới 6% trong số các tế bào B trong máu ngoại vi. Tuy nhiên, các tế bào B ghi nhớ IgG+ đặc hiệu với bệnh cúm ở các mức đỉnh trong khoảng thời gian từ 14 đến 21 ngày sau khi tiêm vaccin, các tế bào này chiếm trung bình 1% trong số tất cả các tế bào B. Thông thường, các báo cáo cho thấy sự khác biệt về kiểu hình của tế bào B giữa các bệnh nhân mắc bệnh truyền nhiễm ở pha cấp tính và pha dưỡng bệnh (theo Leyendeckers và các cộng sự, Eur. J. Immunol. 29:1406-1417 (1999)). Các MAb của người kiểu phức do Schieffelin và các cộng sự (Virol. J. 7:28 (2010)) thu được trước đây cũng đã từng thu được.

Do đó, vẫn cần phải có các phương pháp điều trị mới chống lại bệnh sốt Dengue.

Tài liệu tham khảo

[NPL 1] Sukupolvi-Petty và các cộng sự, J. Virol., 84:9227-9239 (2010)

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng kháng virut dengue (DENV) hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của kháng thể này, kháng thể đơn

dòng hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của kháng thể này có hoạt tính trung hòa với các kiểu huyết thanh gồm DENV-1, DENV-2, DENV-3 và DENV-4, trong đó kháng thể đơn dòng bao gồm kháng thể đơn dòng của người hoặc kháng thể đơn dòng dạng nhân tính hóa, và trong đó kháng thể đơn dòng bao gồm các trình tự CDR1, CDR2 và CDR3 thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) như lần lượt được nêu trong các SEQ ID No. 13-15 và các trình tự CDR1, CDR2 và CDR3 thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) như lần lượt được nêu trong các SEQ ID No. 112-114.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng kháng virus dengue (DENV) hoặc đoạn gắn kháng nguyên của kháng thể này, bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó:

(a) trình tự axit amin thứ nhất của vùng xác định tính bổ khuyết (complementarity-determining region - CDR) thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID No. 13 của CDR1, SEQ ID No. 14 của CDR2, và SEQ ID No.15 của CDR3; và

trình tự axit amin thứ hai của CDR thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID No. 112 của CDR1, SEQ ID No. 113 của CDR2, và SEQ ID No. 114 của CDR3;

trong đó kháng thể đơn dòng là kháng thể đơn dòng của người hoặc kháng thể đơn dòng được làm cho giống người.

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể đơn dòng ở người kháng virus dengue (DENV) bao gồm các bước sau:

1) sản xuất tế bào lai bằng cách dung hợp tế bào đơn nhân trong máu ngoại vi (peripheral blood mononuclear cell - PBMC) của bệnh nhân ở pha cấp tính bị nhiễm DENV với tế bào đối tác dung hợp có khả năng dung hợp tế bào hiệu quả;

2) thu được kháng thể đơn dòng của người kháng DENV từ tế bào lai,

trong đó kháng thể đơn dòng bao gồm các trình tự CDR1, CDR2 và CDR3 thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) như lần lượt được nêu trong các SEQ ID No. 13-15 và các trình tự CDR1, CDR2 và CDR3 thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) như lần lượt được nêu trong các SEQ ID No. 112-114.

Theo khía cạnh thứ tư, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất tế bào lai bao gồm bước dung hợp tế bào đơn nhân trong máu ngoại vi (PBMC) của bệnh nhân ở pha cấp tính nhiễm virus dengue (DENV) với tế bào đối tác dung hợp có khả năng dung hợp tế bào hiệu quả, trong đó tế bào lai tạo ra hoặc có khả năng tạo ra kháng thể đơn dòng bao gồm các trình tự CDR1, CDR2 và CDR3 thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) như lần lượt được nêu trong các SEQ ID No. 13-15 và các trình tự CDR1, CDR2 và CDR3 thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) như lần lượt được nêu trong các SEQ ID No. 112-114.

Sáng chế đề xuất liệu pháp miễn dịch thụ động trong điều trị sốt dengue bằng cách điều chế kháng thể đơn dòng của người (HuMAb) thể hiện sự trung hòa mạnh mẽ đối với tất cả các kiểu huyết thanh (kiểu phức). Sáng chế cũng đề xuất việc sử dụng các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (peripheral blood mononuclear cells - PBMC) của các bệnh nhân nhiễm bệnh thứ phát để điều chế hiệu quả các tế bào lai sản sinh ra các HuMAb kháng lại DENV. Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến các dòng tế bào lai được điều chế một cách hiệu quả khi sử dụng các PBMC của các bệnh nhân nhiễm bệnh ở pha cấp tính (khoảng 1 tuần sau khi bệnh khởi phát) để sản xuất ra các HuMAb mạnh.

Các tác giả sáng chế đã so sánh hiệu quả của việc sử dụng các PBMC của các bệnh nhân ở pha cấp tính (khoảng 1 tuần sau khi bệnh khởi phát) để điều chế các dòng tế bào lai sản sinh HuMAb mạnh với hiệu quả của việc sử dụng các PBMC của các bệnh nhân trong giai đoạn dưỡng bệnh (khoảng 2 tuần sau khi bệnh khởi phát). Thật bất ngờ là, hiệu quả thu được từ việc sử dụng PBMC của các bệnh nhân ở pha cấp tính (121 HuMAb từ 4 bệnh nhân) cao hơn đáng kể so với việc sử dụng PBMC của các bệnh nhân dưỡng bệnh (15 HuMAb từ 5 bệnh nhân). Theo phân tích miễn dịch huỳnh quang, hầu hết các HuMAb từ bệnh nhân ở pha cấp tính là kiểu phức: 90,1% (109/121) từ pha cấp tính so với 46,7% (7/15) từ pha dưỡng bệnh; và có 57,9% (70/121) từ pha cấp tính, và chỉ 6,7% (1/15) từ pha dưỡng bệnh thể hiện hoạt tính trung hòa kiểu phức đáng kể.

Thật không ngờ là đã thu được một cách hiệu quả các HuMAb trung hòa tất cả 4 kiểu huyết thanh của DENV khi sử dụng các PBMC của các bệnh nhân ở pha cấp tính, với 57,9% (70/121) từ pha cấp tính và chỉ 6,7% (1/15) từ pha dưỡng bệnh. Các

kết quả này đã cho thấy sự tăng sinh của tất cả 4 kiểu huyết thanh của DENV đã giảm bằng hoặc hơn 50%. Nói chung, nhiễm virus thứ phát có thể đóng một vai trò quan trọng như là sự kích thích tăng cường các tế bào ghi nhớ, để làm tăng tức thời số lượng các tế bào huyết tương tiết kháng thể ở các bệnh nhân ở giai đoạn mới nhiễm bệnh. Các HuMAb này giúp chúng ta hiểu được vai trò bảo vệ và gây bệnh ở các bệnh nhân, và cho phép thiết kế các kháng thể phòng bệnh và/hoặc điều trị chống lại dengue.

Nhiều bệnh truyền nhiễm do virus chưa có vaccin phòng bệnh và/hoặc thuốc chống virus thích hợp để điều trị thông thường. Người ta tin rằng việc bốn kiểu huyết thanh của DENV một phần phản ứng chéo với nhau có liên quan đến cơ chế gây ra các ca bệnh dengue nặng ở các bệnh nhân thứ phát, gọi là hiện tượng tăng cường phụ thuộc kháng thể (ADE). Theo sáng chế này, các mẫu PBMC được lấy từ các bệnh nhân bị nhiễm dengue, để điều chế các tế bào lai sản sinh các HuMAb trung hòa kháng lại tất cả các kiểu huyết thanh của DENV. Khi so sánh hiệu quả của việc thu được các HuMAb trung hòa bằng cách sử dụng PBMC của các bệnh nhân ở pha cấp tính với sử dụng PBMC của các bệnh nhân ở pha dưỡng bệnh, đã nhận thấy rằng hiệu quả ở pha cấp tính thì lớn hơn nhiều, mặc dù hơi có khuynh hướng là các hiệu giá kháng thể trung hòa trong huyết tương từ các bệnh nhân trong pha dưỡng bệnh cao so với từ các bệnh nhân trong pha cấp tính. Các HuMAb được mô tả ở đây có thể giúp ích cho việc mô tả đặc điểm các cơ chế phân tử dẫn đến khả năng gây bệnh, bao gồm hiện tượng ADE khi nhiễm dengue, và giúp ích cho việc xác định được các liệu pháp kháng thể đầy hứa hẹn.

Do đó một mục tiêu của sáng chế là đề xuất vật liệu và phương pháp dùng để điều trị nhiễm dengue.

Một mục tiêu khác của sáng chế là đề xuất các kháng thể đơn dòng của người kháng lại tất cả các kiểu huyết thanh của virus dengue.

Một mục tiêu khác nữa của sáng chế là sử dụng các kháng thể đơn dòng của người để trung hòa tất cả các kiểu huyết thanh của virus dengue sử dụng các tế bào lympho máu ngoại vi của bệnh nhân.

Các mục tiêu và lợi ích khác nữa của sáng chế sẽ được trình bày một phần trong phần mô tả tiếp theo, và một phần sẽ trở nên rõ ràng dựa trên phần mô tả này,

hoặc có thể có được từ việc nghiên cứu bằng cách thực hành sáng chế. Các mục tiêu và lợi ích khác của sáng chế cũng sẽ được hiện thực hóa và đạt được qua các yếu tố và các dạng kết hợp được chỉ ra một cách cụ thể trong phần mô tả và phần yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Nhằm đạt được những lợi ích này và những lợi ích khác nữa, và để phù hợp với các mục đích của sáng chế, như được bao hàm và mô tả tổng quát ở đây, sáng chế đề cập đến các khía cạnh sau:

1. Kháng thể đơn dòng kháng virus dengue (DENV) hoặc đoạn gắn kháng nguyên của nó, bao gồm hoạt tính trung hòa đối với các kiểu huyết thanh DENV-1, DENV-2, DENV-3 và DENV-4, trong đó kháng thể đơn dòng bao gồm kháng thể đơn dòng của người hoặc kháng thể đơn dòng được làm cho giống người.
2. Kháng thể đơn dòng kháng DENV theo khía cạnh 1, trong đó kháng thể đơn dòng là kháng thể đơn dòng của người được sản xuất bởi tế bào lai được điều chế bằng cách dung hợp tế bào đơn nhân trong máu ngoại vi (PBMC) của bệnh nhân ở pha cấp tính bị nhiễm DENV với tế bào đối tác dung hợp có khả năng dung hợp tế bào hiệu quả.
3. Kháng thể đơn dòng kháng DENV theo khía cạnh 2, trong đó tế bào đối tác dung hợp là tế bào SPYMEG.
4. Kháng thể đơn dòng kháng DENV hoặc đoạn gắn kháng nguyên của nó theo khía cạnh 1 bao gồm IgG, Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, hoặc dsFv.
5. Kháng thể đơn dòng kháng virus dengue (DENV) hoặc đoạn gắn kháng nguyên của nó, bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa một chuỗi bất kỳ trong số các chuỗi từ (a) đến (gg):
 - (a) trình tự axit amin thứ nhất của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID No. 1 của CDR1, SEQ ID No. 2 của CDR2, và SEQ ID No. 3 của CDR3; và
 - trình tự axit amin thứ hai của CDR thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID No. :100 của CDR1, SEQ ID No. 101 của CDR2, và SEQ ID No. 102 của CDR3;
 - (b) trình tự axit amin thứ nhất của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID No. 4 của CDR1, SEQ ID No. 5 của CDR2, và SEQ ID No. 6 của CDR3; và
 - trình tự axit amin thứ hai của CDR thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID

No. 103 của CDR1, SEQ ID No. 04 của CDR2, và SEQ ID No. 105 của CDR3;

(c) trình tự axit amin thứ nhất của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID No. 7 của CDR1, SEQ ID No. 8 của CDR2, và SEQ ID No. 9 của CDR3; và

trình tự axit amin thứ hai của CDR thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID No. 106 của CDR1, SEQ ID No. 107 của CDR2, và SEQ ID No. 108 của CDR3;

(d) trình tự axit amin thứ nhất của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID No. 10 của CDR1, SEQ ID No. 11 của CDR2, và SEQ ID No. 12 của CDR3; và

trình tự axit amin thứ hai của CDR thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID No. 109 của CDR1, SEQ ID No. 110 của CDR2, và SEQ ID No. 111 của CDR3;

(e) trình tự axit amin thứ nhất của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID No. 13 của CDR1, SEQ ID No. 14 của CDR2, và SEQ ID No. 15 của CDR3; và

trình tự axit amin thứ hai của CDR thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID No. 112 của CDR1, SEQ ID No. 113 của CDR2, và SEQ ID No. 114 của CDR3;

(f) trình tự axit amin thứ nhất của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID No. 16 của CDR1, SEQ ID No. 17 của CDR2, và SEQ ID No. 18 của CDR3; và

trình tự axit amin thứ hai của CDR thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID No. 115 của CDR1, SEQ ID No. 116 của CDR2, và SEQ ID No. 117 của CDR3;

(g) trình tự axit amin thứ nhất của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID No. 19 của CDR1, SEQ ID No. 20 của CDR2, và SEQ ID No. 21 của CDR3; và

trình tự axit amin thứ hai của CDR thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID No. 118 của CDR1, SEQ ID No. 119 của CDR2, và SEQ ID No. 120 của CDR3;

(h) trình tự axit amin thứ nhất của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID No. 22 của CDR1, SEQ ID No. 23 của CDR2, và SEQ ID No. 24 của CDR3; và

trình tự axit amin thứ hai của CDR thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID No. 121 của CDR1, SEQ ID No. 122 của CDR2, và SEQ ID No. 123 của CDR3;

(i) trình tự axit amin thứ nhất của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID No. 25 của CDR1, SEQ ID No. 26 của CDR2, và SEQ ID No. 27 của CDR3; và

trình tự axit amin thứ hai của CDR thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID No. 124 của CDR1, SEQ ID No. 125 của CDR2, và SEQ ID No. 126 của CDR3;

(j) trình tự axit amin thứ nhất của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID No. 28 của CDR1, SEQ ID No. 29 của CDR2, và SEQ ID No. 30 của CDR3; và

trình tự axit amin thứ hai của CDR thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID No. 127 của CDR1, SEQ ID No. 128 của CDR2, và SEQ ID No. 129 của CDR3;

(k) trình tự axit amin thứ nhất của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID No. 31 của CDR1, SEQ ID No. 32 của CDR2, và SEQ ID No. 33 của CDR3; và

trình tự axit amin thứ hai của CDR thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID No. 130 của CDR1, SEQ ID No. 131 của CDR2, và SEQ ID No. 132 của CDR3;

(l) trình tự axit amin thứ nhất của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID No. 34 của CDR1, SEQ ID No. 35 của CDR2, và SEQ ID No. 36 của CDR3; và

trình tự axit amin thứ hai của CDR thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID No. 133 của CDR1, SEQ ID No. 134 của CDR2, và SEQ ID No. 135 của CDR3;

(m) trình tự axit amin thứ nhất của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID No. 37 của CDR1, SEQ ID No. 38 của CDR2, và SEQ ID No. 39 của CDR3; và

trình tự axit amin thứ hai của CDR thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID No. 136 của CDR1, SEQ ID No. 137 của CDR2, và SEQ ID No. 138 của CDR3;

(n) trình tự axit amin thứ nhất của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID No. 40 của CDR1, SEQ ID No. 41 của CDR2, và SEQ ID No. 42 của CDR3; và

trình tự axit amin thứ hai của CDR thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID No. 139 của CDR1, SEQ ID No. 140 của CDR2, và SEQ ID No. 141 của CDR3;

(o) trình tự axit amin thứ nhất của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng

biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID No. 43 của CDR1, SEQ ID No. 44 của CDR2, và SEQ ID No. 45 của CDR3; và

trình tự axit amin thứ hai của CDR thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID No. 142 của CDR1, SEQ ID No. 143 của CDR2, và SEQ ID No. 144 của CDR3;

(p) trình tự axit amin thứ nhất của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID No. 46 của CDR1, SEQ ID No. 47 của CDR2, và SEQ ID No. 48 của CDR3; và

trình tự axit amin thứ hai của CDR thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID No. 145 của CDR1, SEQ ID No. 146 của CDR2, và SEQ ID No. 147 của CDR3;

(q) trình tự axit amin thứ nhất của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID No. 49 của CDR1, SEQ ID No. 50 của CDR2, và SEQ ID No. 51 của CDR3; và

trình tự axit amin thứ hai của CDR thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID No. 148 của CDR1, SEQ ID No. 149 của CDR2, và SEQ ID No. 150 của CDR3;

(r) trình tự axit amin thứ nhất của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID No. 52 của CDR1, SEQ ID No. 53 của CDR2, và SEQ ID No. 54 của CDR3; và

trình tự axit amin thứ hai của CDR thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID No. 151 của CDR1, SEQ ID No. 152 của CDR2, và SEQ ID No. 153 của CDR3;

(s) trình tự axit amin thứ nhất của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID No. 55 của CDR1, SEQ ID No. 56 của CDR2, và SEQ ID No. 57 của CDR3; và

trình tự axit amin thứ hai của CDR thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID No. 154 của CDR1, SEQ ID No. 155 của CDR2, và SEQ ID No. 156 của CDR3;

(t) trình tự axit amin thứ nhất của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID No. 58 của CDR1, SEQ ID No. 59 của CDR2, và SEQ ID No. 60 của CDR3; và

trình tự axit amin thứ hai của CDR thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID No. 157 của CDR1, SEQ ID No. 158 của CDR2, và SEQ ID No. 159 của CDR3;

(u) trình tự axit amin thứ nhất của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID No. 61 của CDR1, SEQ ID No. 62 của CDR2,

và SEQ ID No. 63 của CDR3; và

trình tự axit amin thứ hai của CDR thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID No. 160 của CDR1, SEQ ID No. 161 của CDR2, và SEQ ID No. 162 của CDR3;

(v) trình tự axit amin thứ nhất của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID No. 64 của CDR1, SEQ ID No. 65 của CDR2, và SEQ ID No. 66 của CDR3; và

trình tự axit amin thứ hai của CDR thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID No. 163 của CDR1, SEQ ID No. 164 của CDR2, và SEQ ID No. 165 của CDR3;

(x) trình tự axit amin thứ nhất của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID No. 70 của CDR1, SEQ ID No. 71 của CDR2, và SEQ ID No. 72 của CDR3; và

trình tự axit amin thứ hai của CDR thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID No. 169 của CDR1, SEQ ID No. 170 của CDR2, và SEQ ID No. 171 của CDR3;

(y) trình tự axit amin thứ nhất của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID No. 73 của CDR1, SEQ ID No. 74 của CDR2, và SEQ ID No. 75 của CDR3; và

trình tự axit amin thứ hai của CDR thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID No. 172 của CDR1, SEQ ID No. 173 của CDR2, và SEQ ID No. 174 của CDR3;

(z) trình tự axit amin thứ nhất của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID No. 76 của CDR1, SEQ ID No. 77 của CDR2, và SEQ ID No. 78 của CDR3; và

trình tự axit amin thứ hai của CDR thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID No. 175 của CDR1, SEQ ID No. 176 của CDR2, và SEQ ID No. 177 của CDR3;

(aa) trình tự axit amin thứ nhất của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID No. 79 của CDR1, SEQ ID No. 80 của CDR2, và SEQ ID No. 81 của CDR3; và

trình tự axit amin thứ hai của CDR thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID No. 178 của CDR1, SEQ ID No. 179 của CDR2, và SEQ ID No. 180 của CDR3;

(bb) trình tự axit amin thứ nhất của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID No. 82 của CDR1, SEQ ID No. 83 của CDR2, và SEQ ID No. 84 của CDR3; và

trình tự axit amin thứ hai của CDR thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID No. 181 của CDR1, SEQ ID No. 182 của CDR2, và SEQ ID No. 183 của CDR3;

(cc) trình tự axit amin thứ nhất của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID No. 85 của CDR1, SEQ ID No. 86 của CDR2, và SEQ ID No. 87 của CDR3; và

trình tự axit amin thứ hai của CDR thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID No. 184 của CDR1, SEQ ID No. 185 của CDR2, và SEQ ID No. 186 của CDR3;

(dd) trình tự axit amin thứ nhất của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID No. 88 của CDR1, SEQ ID No. 89 của CDR2, và SEQ ID No. 90 của CDR3; và

trình tự axit amin thứ hai của CDR thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID No. 187 của CDR1, SEQ ID No. 188 của CDR2, và SEQ ID No. 189 của CDR3;

(ee) trình tự axit amin thứ nhất của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID No. 91 của CDR1, SEQ ID No. 92 của CDR2, và SEQ ID No. 93 của CDR3; và

trình tự axit amin thứ hai của CDR thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID No. 190 của CDR1, SEQ ID No. 191 của CDR2, và SEQ ID No. 192 của CDR3;

(ff) trình tự axit amin thứ nhất của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID No. 94 của CDR1, SEQ ID No. 95 của CDR2, và SEQ ID No. 96 của CDR3; và

trình tự axit amin thứ hai của CDR thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID No. 193 của CDR1, SEQ ID No. 194 của CDR2, và SEQ ID No. 195 của CDR3;

(gg) trình tự axit amin thứ nhất của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID No. 97 của CDR1, SEQ ID No. 98 của CDR2, và SEQ ID No. 99 của CDR3; và

trình tự axit amin thứ hai của CDR thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID No. 196 của CDR1, SEQ ID No. 197 của CDR2, và SEQ ID No. 198 của CDR3;

trong đó kháng thể đơn dòng bao gồm kháng thể đơn dòng của người hoặc kháng thể đơn dòng được làm cho giống người.

6. Kháng thể đơn dòng kháng DENV theo khía cạnh 5, trong đó kháng thể đơn dòng là kháng thể đơn dòng của người bao gồm IgG, Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, hoặc dsFv.

7. Phương pháp sản xuất kháng thể đơn dòng của người kháng virus dengue (DENV) bao gồm các bước:

(i) sản xuất tế bào lai bằng cách dung hợp tế bào đơn nhân trong máu ngoại vi (PBMC) của bệnh nhân ở pha cấp tính bị nhiễm DENV với tế bào đối tác dung hợp có khả năng dung hợp tế bào hiệu quả;

(ii) thu được kháng thể đơn dòng của người kháng DENV từ tế bào lai.

8. Phương pháp sản xuất kháng thể đơn dòng của người kháng DENV theo khía cạnh 7, trong đó tế bào đối tác dung hợp là tế bào SPYMEG.

9. Phương pháp sản xuất tế bào lai bao gồm bước dung hợp tế bào đơn nhân trong máu ngoại vi (PBMC) của bệnh nhân ở pha cấp tính nhiễm virus dengue (DENV) với tế bào đối tác dung hợp có khả năng dung hợp tế bào hiệu quả.

10. Phương pháp sản xuất tế bào lai theo khía cạnh 9, trong đó tế bào đối tác dung hợp là tế bào SPYMEG.

11. Phương pháp sản xuất tế bào lai theo khía cạnh 9, trong đó kháng thể đơn dòng của người kháng DENV thu được từ tế bào lai bao gồm hoạt tính trung hòa đối với các kiểu huyết thanh DENV-1, DENV-2, DENV-3 và DENV-4.

Cần phải hiểu rằng cả phần bản chất kỹ thuật của sáng chế ở trên và phần mô tả chi tiết sau đây chỉ nhằm mục đích làm ví dụ và giải thích nhằm đem lại sự giải thích rõ hơn của sáng chế.

Hiệu quả có lợi của sáng chế

Các tác giả sáng chế đã nhận thấy hiệu quả đầy đủ của HuMAb bằng cách sử dụng D23-1G7C2 làm đại diện dựa trên khả năng gây chết khi tiêm DENV sử dụng chuột con đang bú mẹ. Cần thiết phải có những nghiên cứu sâu hơn để mô tả đặc điểm hiệu quả dương tính và âm tính của HuMAb trong các hệ thống đánh giá *in vivo* khác, như ở khí đuôi dài, khí đuôi sóc, và chuột (theo Bernardo và các cộng sự, Clin Vaccine Immunol 16:1829-1831 (2009); Zompi và các cộng sự, Viruses 4:62-82 (2012); Sukupolvi-Petty và các cộng sự, J Virol 84: 9227-9239 (2010); Omatsu và các cộng sự, J Gen Virol 92: 2272-2280 (2011); Omatsu và các cộng sự, J Med Primatol, in press (2012)) để áp dụng những kết quả nghiên cứu này vào việc phát triển kháng thể điều trị có thể đạt được.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG.1 minh họa tóm tắt về các HuMAb và tính phản ứng chéo đối với các DENV-1 đến DENV-4 trong các thử nghiệm IF và VN. Tổng cộng 121 HuMAb trong pha cấp tính và 15 HuMAb trong pha dưỡng bệnh đã được kiểm tra về tính phản ứng chéo và tính trung hòa chéo đối với các kiểu huyết thanh của DENV một cách tương ứng trong các thử nghiệm IF và VN. Tác giả sáng chế đã sử dụng các dịch nuôi cấy dòng tế bào lai sản xuất HuMAb. Các HuMAb lần lượt được phân loại thành các nhóm 1 đến 10 và các nhóm A đến X theo tính phản ứng chéo của chúng đối với bốn kiểu huyết thanh của DENV trong thử nghiệm IF và thử nghiệm VN. Các nhóm riêng biệt được thể hiện bằng các màu sắc khác nhau. Tác giả sáng chế đã sử dụng các tế bào vero do từng kiểu DENV-1 đến DENV-4 gây nhiễm riêng biệt làm các tế bào đích trong các thử nghiệm này. Số liệu thu được từ thử nghiệm VN được thể hiện qua mức độ trung hòa (mức trung hòa "-", <50%; "+", 50% đến <90%; và "++", 90%).

FIG.2 minh họa sự biểu thị tỷ lệ phần trăm của các HuMAb thu được từ những bệnh nhân riêng biệt theo tỷ lệ chéo của chúng với DENV-1 đến DENV-4 bằng các thử nghiệm IF và VN. Tổng cộng 121 HuMAb trong pha cấp tính (75 từ D23, 25 từ D30, năm từ D32, và 16 từ D33) và 15 HuMAb trong pha dưỡng bệnh (bốn từ D22, năm từ D25, hai từ D26, hai từ D27, và hai từ D28) đã được kiểm tra về tính phản ứng chéo của chúng và tính trung hòa chéo đối với bốn kiểu huyết thanh của DENV. Các tác giả sáng chế đã sử dụng các dịch nuôi cấy dòng tế bào lai riêng biệt sản xuất HuMAb cho các thử nghiệm này. Các HuMAb được phân loại thành các nhóm 1 đến 10 và các nhóm A đến X theo tính phản ứng chéo của chúng với bốn kiểu huyết thanh của DENV như được đánh giá bằng thử nghiệm IF và thử nghiệm VN, theo tương ứng. Các nhóm riêng biệt được thể hiện bằng các màu sắc khác nhau. Các tác giả sáng chế đã sử dụng các tế bào vero do từng kiểu DENV-1 đến DENV-4 gây nhiễm riêng biệt làm các tế bào đích trong các thử nghiệm này. Số liệu thu được từ các thử nghiệm VN được thể hiện qua mức độ trung hòa (mức trung hòa "+", 50% đến <90%; và "++", 90%).

FIG.3 thể hiện các mẫu nhuộm màu của các HuMAb bằng thử nghiệm IF. Các HuMAb trong các dịch nuôi cấy dòng tế bào lai sản xuất các kháng thể đặc hiệu với kiểu huyết thanh của DENV (D28-2B11D10 trong nhóm 1 và D23-4A7D6 trong nhóm 2), các kháng thể phản ứng chéo với hai kiểu huyết thanh (D28-2B11F9 trong nhóm 3

và D23-1B11A5 trong nhóm 4), và các kháng thể phản ứng chéo với ba kiểu huyết thanh (D25-4D3D2 trong nhóm 7 và D23-3E6D7 trong nhóm 8), và các kháng thể phản ứng chéo với tất cả bốn kiểu huyết thanh (D22-1B7G2 trong nhóm 10) được sử dụng cho thử nghiệm IF. Các tế bào vero được PBS gây nhiễm giả hoặc được từng DENV-1 đến DENV-4 gây nhiễm riêng biệt được sử dụng làm các tế bào đích. MAb của chuột kháng protein E của flavivirus 4G2 được sử dụng làm mẫu đối chứng dương tính.

FIG.4 thể hiện mối tương quan giữa các kết quả của thử nghiệm IF và VN. Tổng cộng 121 HuMAb trong pha cấp tính và 15 HuMAb trong pha dưỡng bệnh được thể hiện một cách riêng biệt để làm nổi bật sự tương quan giữa thử nghiệm IF và thử nghiệm VN ("-", <50%; "+", 50% đến <90%; và "++", 90% mức trung hòa) theo tính phản ứng chéo của chúng với các kiểu huyết thanh của DENV khác nhau (các nhóm 1 đến 10 theo thử nghiệm IF và các nhóm A đến X theo thử nghiệm VN). Các tác giả sáng chế đã sử dụng các dịch nuôi cấy dòng tế bào lai sản xuất HuMAb. Các nhóm riêng biệt được thể hiện bằng các màu sắc khác nhau, như trong FIG.1. Các tế bào vero do từng kiểu DENV-1 đến DENV-4 gây nhiễm riêng biệt được sử dụng làm các tế bào đích trong các thử nghiệm này.

FIG.5 thể hiện các giới hạn gắn kết của 18 HuMAb với bốn kiểu huyết thanh của DENV nhờ thử nghiệm IF gián tiếp. Gây nhiễm các tế bào vero trong đĩa vi thể 96 giếng bởi DENV. Sau khi ủ trong 2 ngày, cố định các tế bào này bằng focmandehyt, sau đó cho phản ứng với dãy pha loãng 10 lần của các HuMAb riêng biệt đã qua tinh chế (10,0 microgam/ml). Theo hiệu giá về tính phản ứng đối với các kiểu huyết thanh riêng biệt của DENV bằng thử nghiệm IF gián tiếp, nồng độ kháng thể cuối cùng cho thấy phản ứng dương tính được thể hiện trong hình.

FIG.6 thể hiện hoạt tính VN của 18 HuMAb với bốn kiểu huyết thanh của DENV. Gây nhiễm các tế bào vero trong đĩa vi thể 96 giếng bởi từng kiểu huyết thanh riêng biệt của DENV mà đã được ủ với các dãy pha loãng 2 lần của các HuMAb tinh chế (25,0 microgam/ml) ở 37°C trong 30 phút, và ủ các tế bào này ở 37°C qua đêm. Cuối cùng, cố định các tế bào này và phát hiện ra các tế bào bị nhiễm bằng thử nghiệm IF nhờ 4G2.

FIG.7 thể hiện các hoạt tính VN và ADE của 18 HuMAb với DENV-2. Đối với thử nghiệm VN, gây nhiễm các tế bào vero bởi DENV2 (chủng 16681) mà đã được ủ với các dãy pha loãng 2 lần của các HuMAb tinh chế (25,0 microgam/ml) ở 37°C trong 30 phút, và ủ các tế bào này ở 37°C qua đêm. Cuối cùng, cố định các tế bào này và phát hiện ra các tế bào bị nhiễm bằng thử nghiệm IF nhờ 4G2. Đối với thử nghiệm ADE, gây nhiễm các tế bào THP-1 bởi DENV-2 (chủng 16681) mà đã được ủ với dãy pha loãng 10 lần của các HuMAb tinh chế (10,0 microgam/ml) ở 37°C trong 30 phút, sau đó ủ các tế bào này trong 3 ngày. Chiết ARN tổng số từ các tế bào bị nhiễm và đưa lượng ARN thu được vào quy trình PCR thời gian thực một bước (One-step real-time PCR) để định lượng số bản sao gen của virus. Đường màu xanh lá cây thẳng đứng biểu thị 1 microgam/ml của HuMAb trong cả hai số liệu cơ bản về các kết quả VN và ADE. Đường màu đỏ nằm ngang trong các số liệu về các kết quả ADE biểu thị mức cơ sở (x1) trong mẫu đối chứng (PBS).

FIG.7-1 thể hiện 4G2, 5E4, D23-1A10H7 và D23-1B3B9.

FIG.7-2 thể hiện D23-1C2D2, D23-1G7C2, D23-1H5A11 và D23-3A10G2.

FIG.7-3 thể hiện D23-4A6F9, D23-4F5E1, D23-4H12C8 và D23-5E6B1.

FIG.7-4 thể hiện D23-5G2D2, D23-5G8E3, D23-1C1G4 và D30-1E7B8.

FIG.7-5 thể hiện D30-3A1E2, D30-3B6C7, D32-2D1G5 và D32-2H8G1.

FIG.8 thể hiện các hoạt tính ADE của hai HuMAb đại diện với bốn kiểu huyết thanh của DENV. Đối với các thử nghiệm ADE, bốn kiểu huyết thanh của DENV (Chủng Mochizuki của DENV-1; chủng 16681 của DENV-2; chủng H87 của DENV-3; và chủng H241 của DENV-4) được sử dụng như trong FIG.7. Thực hiện gây nhiễm với giá trị MOI là 0,05.

FIG.9 thể hiện hoạt tính gắn kết IF của các HuMAb đại diện với các phân lập lâm sàng của DENV. Các HuMAb đại diện, D23-1A10H7, D23-1B3B9, và D23-1G7C2 đã được kiểm tra về giới hạn phát hiện bằng thử nghiệm IF với các phân lập lâm sàng DV1-1 đến DV1-5, DV2-1 đến DV2-5, DV3-1 đến DV3-5, và DV4-1 đến DV4-5.

FIG.10 thể hiện hoạt tính VN của các HuMAb đại diện với các phân lập lâm

sàng của DENV. Các HuMAb đại diện, D23-1A10H7, D23-1B3B9, và D23-1G7C2 đã được kiểm tra đối với thử nghiệm VN50 với các phân lập lâm sàng DV1-1 đến DV1-5, DV2-1 đến DV2-5, DV3-1 đến DV3-5, và DV4-1 đến DV4-5.

FIG.11 thể hiện các kết quả về hiệu quả điều trị *in vivo* của các HuMAb ở chuột con đang bú mẹ.

FIG.12 thể hiện các ví dụ về các hình ảnh trong Thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang gồm có mẫu đối chứng dương tính, mẫu đối chứng âm tính, các dòng tế bào lai DMSc-17, DMSc-14 và DMSc-36.

FIG.13 thể hiện việc minh họa 22 dòng cho thấy mức giảm VN đối với DENV1, DENV2, DENV3, DENV4 cao hơn 80%. Tất cả các dòng đã cho thấy VN với DENV1 và DENV2 cao hơn 90%. Mười dòng đã cho thấy VN với DENV3 và 16 dòng đã cho thấy VN với DENV4 cao hơn 90%.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các hình vẽ kèm theo, được đưa vào và là một phần của bản mô tả, sẽ minh họa các phương án cụ thể của sáng chế, và được thực hiện kết hợp với phần mô tả chi tiết các phương án cụ thể, dùng để giải thích các nguyên tắc theo sáng chế.

Sáng chế đề xuất các kháng thể kháng lại dengue và các phương pháp sử dụng kháng thể để điều trị nhiễm dengue.

1. Kháng thể đơn dòng kháng virus dengue (DENV) hoặc đoạn gắn kháng nguyên của kháng thể này, kháng thể đơn dòng hoặc đoạn gắn kháng nguyên của kháng thể đơn dòng này có hoạt tính trung hòa đối với các kiểu huyết thanh DENV-1, DENV-2, DENV-3 và DENV-4, trong đó kháng thể đơn dòng bao gồm kháng thể đơn dòng của người hoặc kháng thể đơn dòng được làm cho giống người.
2. Kháng thể đơn dòng của người kháng DENV theo mục 1, trong đó kháng thể đơn dòng của người được sản xuất bởi tế bào lai được điều chế bằng cách dung hợp tế bào đơn nhân trong máu ngoại vi (peripheral blood mononuclear cells - PBMC) của bệnh nhân ở pha cấp tính bị nhiễm DENV với tế bào đối tác dung hợp có khả năng dung hợp tế bào hiệu quả.
3. Kháng thể đơn dòng của người kháng DENV theo mục 2, trong đó tế bào đối tác dung hợp là tế bào SPYMEG.

4. Kháng thể đơn dòng kháng DENV hoặc đoạn gắn kháng nguyên của nó theo mục 1 bao gồm IgG, Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, hoặc dsFv.

5. Kháng thể đơn dòng kháng virut dengue (DENV) hoặc đoạn gắn kháng nguyên của kháng thể này, bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ một chuỗi bất kỳ trong số (a) đến (gg):

(a) trình tự axit amin thứ nhất của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID No. 1 của CDR1, SEQ ID No. 2 của CDR2, và SEQ ID No. 3 của CDR3; và

trình tự axit amin thứ hai của CDR thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID No. 100 của CDR1, SEQ ID No. 101 của CDR2, và SEQ ID No. 102 của CDR3;

(b) trình tự axit amin thứ nhất của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID No. 4 của CDR1, SEQ ID No. 5 của CDR2, và SEQ ID No. 6 của CDR3; và

trình tự axit amin thứ hai của CDR thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID No. 103 của CDR1, SEQ ID No. 104 của CDR2, và SEQ ID No. 105 của CDR3;

(c) trình tự axit amin thứ nhất của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID No. 7 của CDR1, SEQ ID No. 8 của CDR2, và SEQ ID No. 9 của CDR3; và

trình tự axit amin thứ hai của CDR thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID No. 106 của CDR1, SEQ ID No. 107 của CDR2, và SEQ ID No. 108 của CDR3;

(d) trình tự axit amin thứ nhất của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID No. 10 của CDR1, SEQ ID No. 11 của CDR2, và SEQ ID No. 12 của CDR3; và

trình tự axit amin thứ hai của CDR thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID No. 109 của CDR1, SEQ ID No. 110 của CDR2, và SEQ ID No. 111 của CDR3;

(e) trình tự axit amin thứ nhất của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID No. 13 của CDR1, SEQ ID No. 14 của CDR2, và SEQ ID No. 15 của CDR3; và

trình tự axit amin thứ hai của CDR thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID No. 112 của CDR1, SEQ ID No. 113 của CDR2, và SEQ ID No. 114 của CDR3;

(f) trình tự axit amin thứ nhất của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng

biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID No. 16 của CDR1, SEQ ID No. 17 của CDR2, và SEQ ID No. 18 của CDR3; và

trình tự axit amin thứ hai của CDR thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID No. 115 của CDR1, SEQ ID No. 116 của CDR2, và SEQ ID No. 117 của CDR3;

(g) trình tự axit amin thứ nhất của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID No. 19 của CDR1, SEQ ID No. 20 của CDR2, và SEQ ID No. 21 của CDR3; và

trình tự axit amin thứ hai của CDR thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID No. 118 của CDR1, SEQ ID No. 119 của CDR2, và SEQ ID No. 120 của CDR3;

(h) trình tự axit amin thứ nhất của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID No. 22 của CDR1, SEQ ID No. 23 của CDR2, và SEQ ID No. 24 của CDR3; và

trình tự axit amin thứ hai của CDR thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID No. 121 của CDR1, SEQ ID No. 122 của CDR2, và SEQ ID No. 123 của CDR3;

(i) trình tự axit amin thứ nhất của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID No. 25 của CDR1, SEQ ID No. 26 của CDR2, và SEQ ID No. 27 của CDR3; và

trình tự axit amin thứ hai của CDR thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID No. 124 của CDR1, SEQ ID No. 125 của CDR2, và SEQ ID No. 126 của CDR3;

(j) trình tự axit amin thứ nhất của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID No. 28 của CDR1, SEQ ID No. 29 của CDR2, và SEQ ID No. 30 của CDR3; và

trình tự axit amin thứ hai của CDR thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID No. 127 của CDR1, SEQ ID No. 128 của CDR2, và SEQ ID No. 129 của CDR3;

(k) trình tự axit amin thứ nhất của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID No. 31 của CDR1, SEQ ID No. 32 của CDR2, và SEQ ID No. 33 của CDR3; và

trình tự axit amin thứ hai của CDR thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID No. 130 của CDR1, SEQ ID No. 131 của CDR2, và SEQ ID No. 132 của CDR3;

(l) trình tự axit amin thứ nhất của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID No. 34 của CDR1, SEQ ID No. 35 của CDR2,

và SEQ ID No. 36 của CDR3; và

trình tự axit amin thứ hai của CDR thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID No. 133 của CDR1, SEQ ID No. 134 của CDR2, và SEQ ID No. 135 của CDR3;

(m) trình tự axit amin thứ nhất của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID No. 37 của CDR1, SEQ ID No. 38 của CDR2, và SEQ ID No. 39 của CDR3; và

trình tự axit amin thứ hai của CDR thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID No. 136 của CDR1, SEQ ID No. 137 của CDR2, và SEQ ID No. 138 của CDR3;

(n) trình tự axit amin thứ nhất của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID No. 40 của CDR1, SEQ ID No. 41 của CDR2, và SEQ ID No. 42 của CDR3; và

trình tự axit amin thứ hai của CDR thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID No. 139 của CDR1, SEQ ID No. 140 của CDR2, và SEQ ID No. 141 của CDR3;

(o) trình tự axit amin thứ nhất của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID No. 43 của CDR1, SEQ ID No. 44 của CDR2, và SEQ ID No. 45 của CDR3; và

trình tự axit amin thứ hai của CDR thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID No. 142 của CDR1, SEQ ID No. 143 của CDR2, và SEQ ID No. 144 của CDR3;

(p) trình tự axit amin thứ nhất của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID No. 46 của CDR1, SEQ ID No. 47 của CDR2, và SEQ ID No. 48 của CDR3; và

trình tự axit amin thứ hai của CDR thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID No. 145 của CDR1, SEQ ID No. 146 của CDR2, và SEQ ID No. 147 của CDR3;

(q) trình tự axit amin thứ nhất của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID No. 49 của CDR1, SEQ ID No. 50 của CDR2, và SEQ ID No. 51 của CDR3; và

trình tự axit amin thứ hai của CDR thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID No. 148 của CDR1, SEQ ID No. 149 của CDR2, và SEQ ID No. 150 của CDR3;

(r) trình tự axit amin thứ nhất của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID No. 52 của CDR1, SEQ ID No. 53 của CDR2, và SEQ ID No. 54 của CDR3; và

trình tự axit amin thứ hai của CDR thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID No. 151 của CDR1, SEQ ID No. 152 của CDR2, và SEQ ID No. 153 của CDR3;

(s) trình tự axit amin thứ nhất của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID No. 55 của CDR1, SEQ ID No. 56 của CDR2, và SEQ ID No. 57 của CDR3; và

trình tự axit amin thứ hai của CDR thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID No. 154 của CDR1, SEQ ID No. 155 của CDR2, và SEQ ID No. 156 của CDR3;

(t) trình tự axit amin thứ nhất của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID No. 58 của CDR1, SEQ ID No. 59 của CDR2, và SEQ ID No. 60 của CDR3; và

trình tự axit amin thứ hai của CDR thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID No. 157 của CDR1, SEQ ID No. 158 của CDR2, và SEQ ID No. 159 của CDR3;

(u) trình tự axit amin thứ nhất của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID No. 61 của CDR1, SEQ ID No. 62 của CDR2, và SEQ ID No. 63 của CDR3; và

trình tự axit amin thứ hai của CDR thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID No. 160 của CDR1, SEQ ID No. 161 của CDR2, và SEQ ID No. 162 của CDR3;

(v) trình tự axit amin thứ nhất của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID No. 64 của CDR1, SEQ ID No. 65 của CDR2, và SEQ ID No. 66 của CDR3; và

trình tự axit amin thứ hai của CDR thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID No. 163 của CDR1, SEQ ID No. 164 của CDR2, và SEQ ID No. 165 của CDR3;

(x) trình tự axit amin thứ nhất của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID No. 70 của CDR1, SEQ ID No. 71 của CDR2, và SEQ ID No. 72 của CDR3; và

trình tự axit amin thứ hai của CDR thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID No. 169 của CDR1, SEQ ID No. 170 của CDR2, và SEQ ID No. 171 của CDR3;

(y) trình tự axit amin thứ nhất của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID No. 73 của CDR1, SEQ ID No. 74 của CDR2, và SEQ ID No. 75 của CDR3; và

trình tự axit amin thứ hai của CDR thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID

No. 172 của CDR1, SEQ ID No. 173 của CDR2, và SEQ ID No. 174 của CDR3;

(z) trình tự axit amin thứ nhất của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID No. 76 của CDR1, SEQ ID No. 77 của CDR2, và SEQ ID No. 78 của CDR3; và

trình tự axit amin thứ hai của CDR thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID No. 175 của CDR1, SEQ ID No. 176 của CDR2, và SEQ ID No. 177 của CDR3;

(aa) trình tự axit amin thứ nhất của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID No. 79 của CDR1, SEQ ID No. 80 của CDR2, và SEQ ID No. 81 của CDR3; và

trình tự axit amin thứ hai của CDR thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID No. 178 của CDR1, SEQ ID No. 179 của CDR2, và SEQ ID No. 180 của CDR3;

(bb) trình tự axit amin thứ nhất của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID No. 82 của CDR1, SEQ ID No. 83 của CDR2, và SEQ ID No. 84 của CDR3; và

trình tự axit amin thứ hai của CDR thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID No. 181 của CDR1, SEQ ID No. 182 của CDR2, và SEQ ID No. 183 của CDR3;

(cc) trình tự axit amin thứ nhất của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID No. 85 của CDR1, SEQ ID No. 86 của CDR2, và SEQ ID No. 87 của CDR3; và

trình tự axit amin thứ hai của CDR thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID No. 184 của CDR1, SEQ ID No. 185 của CDR2, và SEQ ID No. 186 của CDR3;

(dd) trình tự axit amin thứ nhất của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID No. 88 của CDR1, SEQ ID No. 89 của CDR2, và SEQ ID No. 90 của CDR3; và

trình tự axit amin thứ hai của CDR thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID No. 187 của CDR1, SEQ ID No. 188 của CDR2, và SEQ ID No. 189 của CDR3;

(ee) trình tự axit amin thứ nhất của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID No. 91 của CDR1, SEQ ID No. 92 của CDR2, và SEQ ID No. 93 của CDR3; và

trình tự axit amin thứ hai của CDR thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID No. 190 của CDR1, SEQ ID No. 191 của CDR2, và SEQ ID No. 192 của CDR3;

(ff) trình tự axit amin thứ nhất của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID No. 94 của CDR1, SEQ ID No. 95 của CDR2, và SEQ ID No. 96 của CDR3; và

trình tự axit amin thứ hai của CDR thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID No. 193 của CDR1, SEQ ID No. 194 của CDR2, và SEQ ID No. 195 của CDR3;

(gg) trình tự axit amin thứ nhất của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID No. 97 của CDR1, SEQ ID No. 98 của CDR2, và SEQ ID No. 99 của CDR3; và

trình tự axit amin thứ hai của CDR thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID No. 196 của CDR1, SEQ ID No. 197 của CDR2, và SEQ ID No. 198 của CDR3;

trong đó kháng thể đơn dòng bao gồm kháng thể đơn dòng của người hoặc kháng thể đơn dòng được làm cho giống người.

6. Kháng thể đơn dòng của người kháng DENV theo mục 5 bao gồm IgG, Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, hoặc dsFv.

7. Phương pháp sản xuất kháng thể đơn dòng của người kháng virus dengue (DENV) bao gồm các bước sau:

1) sản xuất tế bào lai bằng cách dung hợp tế bào đơn nhân trong máu ngoại vi (PBMC) của bệnh nhân ở pha cấp tính bị nhiễm DENV với tế bào đối tác dung hợp có khả năng dung hợp tế bào hiệu quả;

2) thu được kháng thể đơn dòng của người kháng DENV từ tế bào lai.

8. Phương pháp sản xuất kháng thể đơn dòng của người kháng DENV theo mục 7, trong đó tế bào đối tác dung hợp là tế bào SPYMEG.

9. Phương pháp sản xuất tế bào lai bao gồm bước dung hợp tế bào đơn nhân trong máu ngoại vi (PBMC) của bệnh nhân ở pha cấp tính nhiễm virus dengue (DENV) với tế bào đối tác dung hợp có khả năng dung hợp tế bào hiệu quả.

10. Phương pháp sản xuất tế bào lai theo mục 9, trong đó tế bào đối tác dung hợp là tế bào SPYMEG.

11. Phương pháp sản xuất tế bào lai theo mục 9, trong đó kháng thể đơn dòng của người kháng DENV thu được từ tế bào lai bao gồm hoạt tính trung hòa đối với các kiểu huyết thanh DENV-1, DENV-2, DENV-3 và DENV-4.

Sáng chế đề xuất các kháng thể kháng dengue và các polypeptit chứa các đoạn

gắn kháng nguyên của chúng cũng như các phương pháp, cách sử dụng, các chế phẩm, và các bộ kit sử dụng chế phẩm. Sáng chế đề xuất phương pháp tạo kháng thể đặc hiệu với dengue hoặc polypeptit hoặc đoạn kháng thể. Phương pháp có thể bao gồm bước cung cấp axit nucleic mã hóa polypeptit kháng nguyên của dengue hoặc polypeptit chứa epitop (vị trí quyết định kháng nguyên) đặc hiệu về miễn dịch của nó; biểu hiện polypeptit chứa trình tự axit amin kháng nguyên hoặc polypeptit chứa epitop đặc hiệu về miễn dịch của nó từ axit nucleic phân lập; và tạo ra kháng thể đặc hiệu với polypeptit thu được hoặc polypeptit chứa đoạn gắn kết kháng nguyên của nó. Sáng chế đề xuất kháng thể hoặc polypeptit chứa đoạn gắn kết kháng nguyên của nó được sản xuất theo phương pháp nói trên. Sáng chế đề xuất kháng thể phân lập hoặc polypeptit phân lập chứa đoạn gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên của dengue. Có thể tạo ra kháng thể như vậy bằng cách sử dụng (các) phương pháp thích hợp bất kỳ được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng. Các kháng thể cũng như các bộ kit, các phương pháp, và/hoặc các khía cạnh khác của sáng chế sử dụng các kháng thể có thể bao gồm một hoặc nhiều kháng thể trong số dạng kháng thể sau đây: kháng thể đa dòng, kháng thể đơn dòng, kháng thể khảm, kháng thể chuỗi đơn, kháng thể đơn trị, kháng thể hóa trị hai, và/hoặc kháng thể được làm cho giống người.

Các đơn vị cấu trúc của kháng thể có trong tự nhiên thông thường chứa tetrame. Mỗi tetrame như vậy có thể gồm hai cặp giống hệt nhau về chuỗi polypeptit, mỗi cặp có một chuỗi “nhẹ” có độ dài đủ (ví dụ, khoảng 25kDa) và một chuỗi “nặng” có độ dài đủ (ví dụ, khoảng 50-70kDa). Phần đầu cuối amin của mỗi chuỗi thông thường bao gồm vùng biến đổi chứa khoảng 100 đến 110 hoặc nhiều hơn các axit amin mà vùng này thông thường chịu trách nhiệm về việc nhận dạng kháng nguyên. Phần đầu cuối cacboxy của mỗi chuỗi thông thường xác định đặc điểm vùng bất biến mà vùng này có thể chịu trách nhiệm về chức năng bộ phận tác động. Các chuỗi nhẹ của người thông thường được phân loại thành các chuỗi nhẹ kappa và lamda. Các chuỗi nặng thông thường được phân loại thành mu, delta, gama, anfa, hoặc epxilon, và xác định isotyp (xác định lớp) của kháng thể theo tương ứng là IgM, IgD, IgG, IgA, và IgE. IgG có nhiều phân lớp, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, IgG1, IgG2, IgG3, và IgG4. IgM có nhiều phân lớp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, IgM1 và IgM2. Tương tự, IgA được chia nhỏ ra thành nhiều phân lớp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, IgA1 và

IgA2. Trong chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, các vùng biến đổi và vùng bất biến có thể được ghép bởi vùng “J” chứa khoảng 12 hoặc nhiều hơn các axit amin, với chuỗi nặng cũng bao gồm vùng “D” chứa khoảng 10 hoặc nhiều hơn các axit amin. Xem, ví dụ, *Fundamental Immunology* Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N. Y. (1989)) (toàn bộ tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn cho tất cả các mục đích). Các vùng biến đổi trong mỗi cặp chuỗi nhẹ/nặng thông thường tạo ra vị trí gắn kết kháng nguyên.

Các vùng biến đổi thông thường biểu hiện cùng một cấu trúc chung của các vùng khuôn (framework region – FR) tương đối được bảo toàn được ghép nối bởi ba vùng siêu biến, còn được gọi là các vùng xác định tính bổ khuyết hoặc các CDR. Các CDR từ hai chuỗi của mỗi cặp thông thường được liên kết bởi các vùng khuôn, mà các vùng khuôn này có thể cho phép gắn kết với epitop đặc hiệu. Từ đầu cuối N đến đầu cuối C, cả vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ thông thường đều chứa các vùng FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 và FR4. Sự phân bố các axit amin đến mỗi vùng thông thường là theo những cách xác định trong tài liệu có tựa đề “Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest” (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 và 1991)), hoặc Chothia & Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); của tác giả Chothia và các cộng sự, *Nature* 342:878-883 (1989).

"Các đoạn kháng thể" bao gồm một phần là kháng thể nguyên vẹn, như vùng biến đổi hoặc gắn kết kháng nguyên của kháng thể nguyên vẹn. Các ví dụ về các đoạn kháng thể bao gồm các đoạn Fab, Fab1, F(ab')₂, và Fv; các kháng thể hóa trị hai; các kháng thể tuyến tính (Zapata và các cộng sự, *Protein Eng.* 8(10): 1057-1062 (1995)); các phân tử kháng thể chuỗi đơn; và đa kháng thể đặc hiệu được tạo thành từ các đoạn kháng thể. Sự thủy phân papain của các kháng thể tạo ra hai đoạn gắn kết kháng nguyên giống hệt nhau, được gọi là các đoạn “Fab”, mỗi đoạn có một vị trí gắn kết kháng nguyên duy nhất, và đoạn “Fc” còn lại, cách ký hiệu phản ánh khả năng kết tinh dễ dàng. Việc xử lý pepsin tạo ra đoạn F(ab')₂ có hai vị trí gắn kết kháng nguyên và vẫn có khả năng liên kết chéo kháng nguyên. "Fv" là đoạn kháng thể có chứa vị trí nhận dạng và gắn kết kháng nguyên đầy đủ. Vùng này bao gồm dime của một vùng biến đổi chuỗi nặng và một vùng biến đổi chuỗi nhẹ với sự liên kết chặt chẽ, không cùng hóa trị. Vùng biến đổi duy nhất (hoặc một nửa của Fv chỉ chứa ba CDR đặc hiệu

đối với kháng nguyên) có thể nhận dạng và gắn kết kháng nguyên. Các đoạn kháng thể "Fv chuỗi đơn" hoặc "sFv" bao gồm các vùng VH và VL của kháng thể, trong đó các vùng này thì có mặt trong chuỗi polypeptit đơn. Polypeptit Fv có thể còn chứa mối liên kết polypeptit giữa các vùng VH và VL cho phép sFv tạo ra cấu trúc mong muốn để gắn kết kháng nguyên. Để xem xét lại về sFv, xem tài liệu có tựa đề Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg và Moore eds., Springer- Verlag, New York, các trang 269-315 (1994).

Có thể sử dụng các kháng thể làm các cực dò, các phương pháp điều trị và các cách sử dụng khác. Có thể tạo các kháng thể bằng cách tiêm vào chuột, thỏ, dê, hoặc những loài động vật khác với sản phẩm được biến đổi hoặc các đoạn peptit tổng hợp của nó. Các kháng thể này thì hữu ích trong các xét nghiệm chẩn đoán hoặc dùng làm thành phần hoạt tính trong dược phẩm.

Có thể liên hợp kháng thể hoặc polypeptit được dùng với tác nhân chức năng để tạo ra dạng liên hợp miễn dịch. Tác nhân chức năng này có thể là chất độc tế bào như chất hóa trị liệu, chất độc (ví dụ, độc tố có hoạt tính enzym có nguồn gốc vi khuẩn, nấm, thực vật hoặc động vật, hoặc các đoạn của nó), hoặc đồng vị phóng xạ (nghĩa là, dạng liên hợp phóng xạ), chất kháng sinh, enzym nucleolytic, hoặc dạng kết hợp bất kỳ của chúng. Có thể sử dụng các tác nhân hóa trị liệu trong việc tạo các dạng liên hợp miễn dịch, ví dụ, metotrexat, adriamixin, các vinca alkaloit (vincristin, vinblastin, etoposit), doxorubixin, melphalan, mitomycin C, clorambuxil, daunorubixin hoặc các chất xen kẽ khác, các enzym, và/hoặc các đoạn của chúng, như các enzym nucleolytic, thuốc kháng sinh, và độc tố toxin như độc tố toxin phân tử nhỏ hoặc các chất độc có hoạt tính enzym có nguồn gốc vi khuẩn, nấm, thực vật hoặc động vật, bao gồm các đoạn và/hoặc các biến thể của chúng, và các chất chống khối u hoặc các chất chống ung thư khác nhau được bộc lộ dưới đây. Các chất độc có hoạt tính enzym và các đoạn của chúng mà có thể được sử dụng bao gồm, ví dụ, chuỗi A gây bệnh bạch hầu, các đoạn có hoạt tính không gắn kết của độc tố bạch hầu, chuỗi A gây bệnh bằng ngoại độc tố (do *Pseudomonas aeruginosa*), chuỗi A gây bệnh do rixin, chuỗi A gây bệnh do abrin, chuỗi A gây bệnh do modecxin, anfa-sarcin, các protein của loài *Aleurites fordii* (cây trẩu lùn), các protein dianthin, các protein của loài *Phytolacca americana* (cây thương lục Mỹ) (PAPI, PAPII, và PAP-S), chất ức chế của mướp đắng, curxin, crotin,

chất ức chế của *Saponaria officinalis* (cỏ tạo phi), gelonin, mitogellin, restrictoxin, phenomyxin, enomyxin, và các độc tố tricotheenes. Có thể sử dụng nucleotit phóng xạ hoặc chất phóng xạ thích hợp bất kỳ được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này hoặc nếu không thì sẵn có để sản xuất các kháng thể dạng liên hợp phóng xạ.

Có thể điều chế các dạng liên hợp của kháng thể và chất độc tế bào bằng cách sử dụng nhiều loại tác nhân ghép cặp với protein lưỡng chức năng khác nhau như N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithiol)propionat (SPDP); iminothiolan (IT); các dẫn xuất lưỡng chức năng của các imidoeste (như dimetyl adipimidat HCL); các este hoạt động (như disuccinimidyl suberat); các anđehyt (như glutaređehyt); các hợp chất bis-azido (như bis(p-azidobenzoyl) hexandiamin); các dẫn xuất của bis-diazonium (như bis-(p-diazoniumbenzoyl)-etylendiamin); các diisoxyanat (như tolyen 2,6-diisoxyanat); các hợp chất flo hoạt tính bis (như 1,5-diflo-2,4-dinitrobenzen); maleimidocaproyl (MC); valin-citrullin, vị trí dipeptit trong cầu nối tách được bởi proteaza (VC); axit 2-amino-5-ureit pentanoic PAB=p-aminobenzylcarbamoyl (phần "tự bất hoạt" của cầu nối) (Citrulene); N-metyl-valin citrullin mà tại đây liên kết peptit cầu nối đã được cải biến để ngăn chặn sự phân tách của nó bởi cathepsin B (Me); maleimidocaproyl-polyetylen glycol, được gắn với các xystein kháng thể; N-Succinimidyl 4-(2-pyridylthio)pentanoat (SPP); và N-succinimidyl 4-(N-maleimidometyl)xyclohexan-1 carboxylat (SMCC). Ví dụ, có thể điều chế độc tố miễn dịch rixin như được mô tả trong tài liệu của Vitetta và các cộng sự, Science, 238: 1098 (1987). Axit 1-isothioxyanatobenzyl-3-metyldietylen triaminpentaacetic được đánh dấu ở Cacbon-14 (MX-DTPA) là chất tạo chelat dùng để làm mẫu cho sự liên hợp nucleotit phóng xạ với kháng thể, xem Công bố đơn quốc tế số WO 94/11026. Có thể liên hợp kháng thể với một "thụ thể" (như streptavidin) để sử dụng trong việc nhắm đích trước khối u trong đó thể liên hợp kháng thể - thụ thể này được cấp cho đối tượng, tiếp theo là loại bỏ thể liên hợp không gắn kết ra khỏi sự tuần hoàn bằng cách sử dụng chất làm trong và sau đó cấp "phối tử" (ví dụ, avidin) mà được liên hợp với chất độc tế bào (ví dụ, nucleotit phóng xạ).

Các kháng thể theo sáng chế có thể được ghép cặp trực tiếp hoặc gián tiếp với chất chỉ thị phát hiện bởi các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Chất chỉ thị phát hiện là chất có thể phát hiện được, ví dụ, bằng các phương tiện quang phổ, quang

hoá, hoá sinh, hóa miễn dịch, hoặc hóa học. Các chất chỉ thị phát hiện hữu ích bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, thuốc nhuộm huỳnh quang, các hợp chất quang hóa, các đồng vị phóng xạ, các thuốc thử dày đặc electron, các enzym, các hạt có màu, biotin, hoặc dioxigenin. Chất chỉ thị phát hiện thường tạo ra tín hiệu đo được, như độ phóng xạ, ánh sáng huỳnh quang, màu sắc, hoặc hoạt tính enzym. Các kháng thể được liên hợp với các chất phát hiện có thể được sử dụng cho các mục đích chẩn đoán hoặc điều trị. Các ví dụ về các chất phát hiện bao gồm nhiều loại enzym, các nhóm lắp bộ phận giả, các vật liệu huỳnh quang, các vật liệu phát quang, các vật liệu phát quang sinh học, các vật liệu phóng xạ, các kim loại phát positron bằng cách sử dụng nhiều kỹ thuật chụp X quang phát positron khác nhau, và các ion kim loại thuận từ không có tính phóng xạ. Chất phát hiện có thể được ghép cặp hoặc được liên hợp hoặc là trực tiếp hoặc gián tiếp với kháng thể, thông qua chất trung gian như, ví dụ, mối liên kết được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này, bằng cách sử dụng các phương pháp được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này. Xem, ví dụ, Patent Mỹ số 4,741,900, mô tả sự liên hợp của các ion kim loại với các kháng thể để sử dụng trong chẩn đoán. Các ví dụ về các enzym thích hợp bao gồm peroxidaza của cây cải ngựa, phosphataza kiềm, beta-galactosidaza, và axetylcholinesteraza; các ví dụ về phức chất nhóm lắp bộ phận giả thích hợp bao gồm streptavidin/biotin và avidin/biotin; các ví dụ về các vật liệu huỳnh quang thích hợp bao gồm umbelliferon, floresxein, floresxein isothioxyanat, rhodamin, diclotriazinylamin floresxein, dansyl clorua và phycoerythrin; ví dụ về vật liệu phát quang bao gồm luminol; các ví dụ về các vật liệu phát quang sinh học bao gồm luxiferin, và aequorin.

Có thể điều chế các kháng thể hữu ích thực hiện sáng chế ở các động vật thí nghiệm hoặc bằng các kỹ thuật ADN tái tổ hợp sử dụng các phương pháp sau đây. Có thể tạo ra các kháng thể đa dòng ở động vật bằng cách tiêm nhiều lần dưới da (sc) hoặc trong bụng (ip) phân tử sản phẩm gen hoặc đoạn của nó kết hợp với chất phụ trợ như chất phụ trợ của Freund (hoàn toàn hoặc không hoàn toàn). Để tăng cường tính sinh miễn dịch, có thể là hữu ích đối với phân tử sản phẩm gen liên hợp thứ nhất hoặc đoạn chứa trình tự axit amin đích với protein mà có tính sinh miễn dịch ở các loài được gây miễn dịch, ví dụ, xyanin huyết lỗ khóa con sao sao, albumin huyết thanh, thyroglobulin của bò, hoặc chất ức chế trypsin của đậu nành bằng cách sử dụng chất

lượng chức năng hoặc chất dẫn xuất, ví dụ, maleimidobenzoyl sulfosuccinimit este (liên hợp thông qua các gốc xystein), N-hydroxysuccinimit (thông qua các gốc lyzin), glutaraldehyt, anhydrit succinic, SOCl, v.v... Theo cách khác, có thể sản xuất các dạng liên hợp sinh miễn dịch theo cách tái tổ hợp dưới dạng các protein dung hợp.

Có thể gây miễn dịch động vật chống lại các dạng liên hợp sinh miễn dịch hoặc các dẫn xuất (như đoạn chứa trình tự axit amin đích) bằng cách kết hợp khoảng 1mg hoặc khoảng 1 microgam của thể liên hợp (lần lượt cho thở hoặc nuốt) với khoảng 3 thể tích chất phụ trợ hoàn toàn của Freund và tiêm trong da dung dịch này tại nhiều vị trí. Khoảng chừng 7 đến 14 ngày sau đó, lấy máu những con vật này và xét nghiệm huyết thanh về hiệu giá kháng thể. Làm khuếch đại các mẫu của các động vật này bằng kháng nguyên lặp đi lặp lại nhiều lần cho tới khi đạt trạng thái ổn định về hiệu giá. Mẫu của các động vật này có thể được khuếch đại bởi cùng một phân tử hoặc đoạn của nó như được sử dụng cho sự gây miễn dịch ban đầu, nhưng được liên hợp với protein khác nhau và/hoặc thông qua chất liên kết chéo khác nhau. Ngoài ra, có thể sử dụng các chất làm kết tụ như phen trong các mũi tiêm để tăng cường đáp ứng miễn dịch.

Kháng thể được dùng có thể bao gồm kháng thể khảm. Kháng thể được dùng có thể bao gồm kháng thể được làm cho giống người. Kháng thể được dùng có thể bao gồm kháng thể được làm cho giống người hoàn toàn. Các kháng thể có thể được làm cho giống người hoặc được làm cho giống người một phần. Các kháng thể không phải của người có thể được làm cho giống người bằng cách sử dụng bất kỳ phương pháp áp dụng nào được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này. Kháng thể được làm cho giống người có thể được sản xuất bằng cách sử dụng động vật biến đổi gen có hệ miễn dịch đã được nhân tính hóa một phần hoặc hoàn toàn. Kháng thể bất kỳ hoặc đoạn của nó theo sáng chế có thể được nhân tính hóa một phần hoặc hoàn toàn. Có thể sản xuất các kháng thể thể khảm bằng cách sử dụng phương pháp đã biết bất kỳ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Xem ví dụ Patent Mỹ các số 5,169,939; 5,750,078; 6,020,153; 6,420,113; 6,423,511; 6,632,927; và 6,800,738.

Kháng thể được dùng có thể bao gồm kháng thể đơn dòng, tức là, các kháng thể kháng dengue theo sáng chế có thể là các kháng thể đơn dòng. Có thể điều chế các kháng thể đơn dòng bằng cách sử dụng các phương pháp tế bào lai, như các phương

pháp được mô tả trong tài liệu của Kohler và Milstein, *Nature*, 256:495 (1975). Thông thường, theo phương pháp tế bào lai, chuột nhắt, chuột đồng, hoặc động vật chủ thích hợp khác được gây miễn dịch bằng chất gây miễn dịch để có được các tế bào lympho mà các tế bào này sản xuất hoặc có khả năng sản xuất các kháng thể mà chúng sẽ gắn kết đặc hiệu với chất gây miễn dịch. Theo cách khác, các tế bào lympho này có thể được gây miễn dịch *in vitro*. Có thể sàng lọc các kháng thể đơn dòng như được mô tả, ví dụ, trong tài liệu của Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, New York (1988); Goding, *Monoclonal Antibodies, Principles and Practice* (2d ed.) Academic Press, New York (1986). Các kháng thể đơn dòng có thể được kiểm tra về tính phản ứng miễn dịch đặc hiệu với sản phẩm được biến đổi và không có tính phản ứng miễn dịch với sản phẩm gen nguyên mẫu tương ứng.

Có thể điều chế các kháng thể đơn dòng bằng cách làm phục hồi các tế bào lách từ những con vật được gây miễn dịch và bất tử hóa các tế bào này theo phương pháp thông thường, ví dụ, bằng cách dung hợp với các tế bào u tủy. Sau đó, tiến hành sàng lọc các dòng để các dòng đó biểu hiện kháng thể mong muốn. Kháng thể đơn dòng tốt hơn là không phản ứng chéo với sản phẩm gen khác. Sau khi nhận dạng được các tế bào tế bào lai mong muốn, thì các dòng có thể được tách dòng bằng các quy trình pha loãng giới hạn và được phát triển bởi các phương pháp tiêu chuẩn. Môi trường nuôi cấy thích hợp cho mục đích này bao gồm, ví dụ, môi trường của Eagle được Dulbecco cải biến và môi trường RPMI-1640. Theo cách khác, có thể phát triển các tế bào tế bào lai *in vivo* dưới dạng cổ trướng ở động vật có vú. Các kháng thể đơn dòng được tiết ra bởi các dòng tách có thể được phân lập hoặc được tinh chế từ môi trường nuôi cấy hoặc dịch cổ trướng theo các quy trình tinh chế globulin miễn dịch thông thường như, ví dụ, protein A-Sepharose, sắc ký hydroxylapatit, điện di gel, thẩm tách, hoặc sắc ký ái lực.

Cũng có thể sản xuất các kháng thể đơn dòng bằng các phương pháp ADN tái tổ hợp, như phương pháp được mô tả trong Patent Mỹ số 4,816,567. Các kháng thể đơn dòng mã hóa ADN theo sáng chế này có thể dễ dàng được phân lập và được sắp xếp theo trình tự bằng cách sử dụng các quy trình kỹ thuật thông thường (ví dụ, bằng cách sử dụng các cực dò oligonucleotit mà có khả năng gắn kết đặc hiệu với các gen mã hóa các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của các kháng thể của chuột). Các tế bào lai theo

sáng chế có thể dùng làm nguồn ưu tiên của ADN như vậy. Sau khi được phân lập, ADN có thể được đặt vào các vectơ biểu hiện, mà sau đó chúng được chuyển nạp vào các tế bào vật chủ như các tế bào COS của khỉ, các tế bào buồng trứng của chuột đồng Trung Quốc (CHO - Chinese hamster ovary), hoặc các tế bào u tủy mà nếu không thì các tế bào này không sản sinh protein globulin miễn dịch, để đạt được sự tổng hợp các kháng thể đơn dòng trong các tế bào vật chủ tái tổ hợp. ADN cũng có thể được cải biến, ví dụ, bằng cách thay thế trình tự mã hóa cho các vùng hằng định chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của người thay cho các trình tự tương đồng của chuột hoặc bằng cách liên kết cộng hóa trị với trình tự mã hóa globulin miễn dịch toàn bộ hoặc một phần trình tự mã hóa đối với polypeptit không phải globulin miễn dịch. Polypeptit không phải globulin miễn dịch này có thể được thay thế cho các vùng hằng định của kháng thể theo sáng chế này, hoặc có thể được thay thế cho các vùng biến đổi của một vị trí kháng thể gắn kết với kháng nguyên theo sáng chế để tạo thành kháng thể hóa trị hai thể khảm. Việc điều chế các kháng thể bằng cách sử dụng các phương pháp ADN tái tổ hợp như phương pháp hiển thị phagemid, có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các bộ kit được bán trên thị trường, như ví dụ, Hệ kháng thể Phagemid tái tổ hợp (Recombinant Phagemid Antibody System) mua từ hãng Pharmacia (Uppsala, Thụy Điển), hoặc hệ thống hiển thị thể thực khuẩn SurfZAP™ (SurfZAP™ phage display system) (của hãng Stratagene Inc., La Jolla, California).

Cũng được bao gồm trong sáng chế là các dòng tế bào lai, các dòng tế bào B biến đổi, và các tế bào vật chủ mà sản xuất các kháng thể đơn dòng theo sáng chế; các thể hệ hoặc các dẫn xuất của các tế bào lai này, các dòng tế bào B biến đổi, và các tế bào vật chủ; và các tế bào lai tương đương hoặc tương tự, các dòng tế bào B biến đổi, và các tế bào vật chủ.

Các kháng thể có thể là các kháng thể hóa trị hai. Thuật ngữ “các kháng thể hóa trị hai” dùng để chỉ các đoạn kháng thể nhỏ có hai vị trí gắn kháng nguyên, mà các đoạn bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) được nối với vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) trong cùng một chuỗi polypeptit (Vn-VL). Bằng cách sử dụng mối liên kết quá ngắn để cho phép sự ghép cặp giữa hai vùng trên cùng một chuỗi này, các vùng có thể bị buộc phải ghép cặp với các vùng bổ sung của chuỗi khác và tạo ra hai vị trí gắn kháng nguyên. Các kháng thể hóa trị hai được mô tả đầy đủ hơn trong, ví dụ, Patent

châu Âu số EP 404,097; Công bố đơn quốc tế số WO 93/11161; và tài liệu của Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993).

Kháng thể được dùng có thể bao gồm kháng thể chuỗi đơn. Các kháng thể có thể là các kháng thể đơn trị. Các phương pháp để điều chế các kháng thể đơn trị được biết rõ đến trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, một phương pháp liên quan đến biểu hiện tái tổ hợp của chuỗi nhẹ globulin miễn dịch và chuỗi nặng được cải biến. Nhìn chung, chuỗi nặng có thể được cắt ngắn bớt tại điểm bất kỳ trong vùng Fc để ngăn chặn sự tạo liên kết ngang của chuỗi nặng. Theo cách khác, các gốc xystein có liên quan được thay thế bởi gốc axit amin khác hoặc được xóa bỏ để ngăn chặn sự tạo liên kết ngang. Các phương pháp *in vitro* cũng thích hợp để điều chế các kháng thể đơn trị. Sự thủy phân các kháng thể để sản xuất các đoạn của chúng, đặc biệt là, các đoạn Fab, có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp thông thường được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Các kháng thể có thể là có tính lưỡng đặc hiệu. Các kháng thể lưỡng đặc hiệu mà gắn kết đặc hiệu với một protein và gắn kết đặc hiệu với các kháng nguyên khác liên quan đến bệnh lý và/hoặc việc điều trị được sản xuất, được phân lập, và được kiểm tra bằng cách sử dụng các quy trình tiêu chuẩn đã được mô tả trong tài liệu này. [Xem, ví dụ, tài liệu Pluckthun & Pack, Immunotechnology, 3:83-105 (1997); Carter và các cộng sự, J. Hematotherapy, 4:463-470 (1995); Renner & Pfreundschuh, Immunological Reviews, 1995, No. 145, pp. 179-209; Pfreundschuh Patent Mỹ số 5,643,759; Segal, và các cộng sự, J. Hematotherapy, 4:377-382 (1995); Segal và các cộng sự, Immunobiology, 185:390-402 (1992); và Bolhuis và các cộng sự, Cancer Immunol. Immunother., 34:1-8 (1991)].

Có thể bào chế các kháng thể được bộc lộ ở đây dưới dạng các liposom miễn dịch. Các liposom chứa kháng thể được bào chế theo các phương pháp được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này, như được mô tả bởi Epstein và các cộng sự, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); bởi Hwang và các cộng sự, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4030 (1980); và Patent Mỹ các số 4,485,045 và 4,544,545. Các liposom có thời gian tuần hoàn tăng cường được bộc lộ trong Patent Mỹ số 5,013,556. Có thể tạo ra các liposom hữu ích đặc biệt theo phương pháp bay hơi pha đảo với chế phẩm dạng lỏng chứa phosphatidylcolin, cholesterol, và phosphatidylethanolamin dẫn xuất từ

PEG (PEG-PE). Các liposom có thể được ép đùn thông qua bộ lọc có kích thước lỗ hồng xác định để mang lại các liposom với đường kính mong muốn. Các đoạn Fab' của kháng thể theo sáng chế có thể được liên hợp với các liposom như được mô tả bởi Martin và các cộng sự, J. Biol. Chem., 257:286-288 (1982) qua phản ứng hoán vị disulfua. Chất hóa trị liệu (như Doxorubixin) tùy chọn được chứa trong liposom. Xem tài liệu được bộc lộ bởi Gabizon và các cộng sự, J. National Cancer Inst., 81(19): 1484 (1989).

Hai hoặc nhiều chất đối kháng dengue có thể hoạt động hiệp lực để điều trị hoặc làm giảm việc nhiễm dengue hoặc triệu chứng tương tự, ví dụ, sốt. Chất đối kháng dengue có thể là một hoặc nhiều kháng thể kháng dengue một mình hoặc kết hợp với một hoặc nhiều chất đối kháng dengue khác, ví dụ, dược phẩm nhỏ, hoặc phương pháp điều trị chống dengue khác. Hai hoặc nhiều hơn hai kháng thể kháng dengue, hoặc ít nhất một kháng thể kháng dengue và một hoặc nhiều phương pháp điều trị bổ sung nữa có thể hoạt động hiệp lực để điều trị hoặc làm giảm tính miễn cảm đối với ít nhất là tình trạng viêm. Hai phương pháp điều trị trở lên, bao gồm một hoặc nhiều kháng thể kháng dengue, có thể được cấp dưới dạng hàm lượng hiệp lực. Do đó, việc sử dụng hai phương pháp điều trị trở lên có thể có hiệu quả hiệp lực trong việc làm giảm một hoặc nhiều triệu chứng nhiễm dengue, không phụ thuộc vào việc dùng chúng theo kiểu đồng thời, liên tục, hay kết hợp. Phương pháp điều trị thứ nhất có thể làm tăng hiệu quả của phương pháp điều trị thứ hai lớn hơn khi sử dụng một mình phương pháp điều trị thứ hai, hoặc phương pháp điều trị thứ hai làm tăng hiệu quả của phương pháp điều trị thứ nhất, hoặc cả hai. Hiệu quả của việc sử dụng hai phương pháp điều trị trở lên có thể nhờ vậy mà tác động đến việc làm giảm một hoặc nhiều triệu chứng nhiễm dengue lớn hơn so với tác dụng phụ của mỗi phương pháp điều trị khi dùng một mình. Khi được xác định theo hàm lượng hiệp lực, một phương pháp điều trị có thể làm tăng cường hiệu quả của một hoặc nhiều phương pháp điều trị khác trong việc làm giảm một hoặc nhiều triệu chứng nhiễm dengue, thậm chí nếu hàm lượng trong một hoặc nhiều phương pháp điều trị riêng lẻ sẽ không có hiệu quả đáng kể đối với một hoặc nhiều triệu chứng nhiễm dengue. Có thể thực hiện việc đo lường và tính toán hiệp lực như được mô tả trong Teicher, "Assays for *In vitro* and *In vivo* Synergy," in *Methods in Molecular Medicine*, vol. 85: Novel Anticancer Drug

Protocols, pp. 297-321 (2003) và/hoặc bằng cách tích tính toán chỉ số kết hợp (combination index - CI) sử dụng phần mềm CalcuSyn.

Dạng chế phẩm, đường dùng và liều lượng chính xác có thể được lựa chọn bởi từng bác sĩ tùy theo tình trạng của bệnh nhân. (Xem, ví dụ, theo tác giả Fingl và các cộng sự, trong tài liệu tham khảo *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 1975, Ch. 1 p. I.). Bác sĩ chăm sóc có thể xác định khi nào kết thúc, tạm dừng, hoặc điều chỉnh việc sử dụng do độc tố, hoặc do các rối loạn chức năng cơ quan. Ngược lại, bác sĩ cũng có thể điều chỉnh việc điều trị tới mức độ cao hơn nếu đáp ứng lâm sàng không đầy đủ, ngoại trừ độc tố. Liều lượng dùng trong kiểm soát rối loạn đáng quan tâm sẽ khác nhau tùy theo mức độ nghiêm trọng của rối loạn cần được điều trị và đường dùng. Mức độ nghiêm trọng của rối loạn có thể, ví dụ, được đánh giá, một phần, theo các phương pháp đánh giá tiên lượng tiêu chuẩn. Liều lượng và tần số liều, có thể khác nhau theo lứa tuổi, trọng lượng cơ thể, và mức đáp ứng của từng bệnh nhân riêng biệt. Có thể sử dụng một chương trình so sánh với điều đã thảo luận ở trên trong thí dụ.

Việc sử dụng các chất mang được dùng để bào chế các hợp chất được bộc lộ trong tài liệu này để thực hiện sáng chế với các liều lượng thích hợp để dùng toàn thân là nằm trong phạm vi của sáng chế. Với sự lựa chọn phù hợp về chất mang và thực hành sản xuất thích hợp, các chế phẩm liên quan đến sáng chế, đặc biệt là những chế phẩm được bào chế dưới dạng dung dịch, có thể được dùng ngoài đường tiêu hóa, chẳng hạn như bằng cách tiêm tĩnh mạch. Bằng cách sử dụng chất mang được dùng được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này, có thể bào chế các hợp chất dễ dàng dưới dạng các liều lượng thích hợp để dùng theo đường uống. Các chất mang này có thể cho phép bào chế các hợp chất liên quan đến sáng chế dưới dạng viên nén, thuốc viên, viên nang, chất lỏng, gel, xi-rô, huyền phù đặc, viên nén, viên bao đường, dung dịch, hỗn dịch và các dạng tương tự, để dùng qua đường uống cho bệnh nhân cần điều trị.

Có thể bào chế chất điều trị dưới dạng phóng thích chậm để cho phép giải phóng vào trong cơ thể chất điều trị được cấp vào đó được kiểm soát về thời gian và vị trí trong cơ thể (xem, ví dụ, Patent Mỹ số 4,450,150). Dạng phóng thích chậm của chất điều trị có thể là, ví dụ, chế phẩm cấy dưới da chứa chất điều trị và một loại vật liệu xốp hoặc không xốp, như polyme, trong đó chất điều trị được bao bằng hoặc được

khuếch tán khắp vật liệu và/hoặc sự phân rã của vật liệu không xốp. Sau đó, dạng phóng thích chậm này được cấy ghép vào vị trí mong muốn trong cơ thể và chất điều trị được giải phóng từ phần cấy ghép này với tốc độ đã xác định trước.

Có thể bào chế chất điều trị được sử dụng trong sáng chế dưới dạng chế phẩm, như dược phẩm chứa chất mang và hợp chất điều trị. Dược phẩm chứa chất điều trị có thể bao gồm nhiều hơn một chất điều trị. Theo cách khác, dược phẩm có thể chứa chất điều trị kết hợp với các hoạt chất hoặc thuốc khác.

Chất mang có thể là bất kỳ chất mang thích hợp nào. Ví dụ, chất mang có thể là chất mang dược dụng. Đối với các dược phẩm, chất mang có thể là bất kỳ chất mang thông thường nào được sử dụng kèm theo sự xem xét đặc tính hóa-lý, như độ hòa tan và không phản ứng với (các) hoạt chất, và theo đường dùng. Ngoài ra, hoặc theo cách khác, có thể bào chế các dược phẩm được mô tả sau đây, các hợp chất điều trị theo các phương pháp của sáng chế dưới dạng phức hợp bao thể, như phức hợp bao thể xyclodextrin, hoặc các liposom.

Các chất mang dược dụng được mô tả ở đây, ví dụ, chất dẫn thuốc, chất bổ trợ, tá dược, và chất pha loãng; được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể dễ dàng sẵn có để dùng đối với người dân nói chung. Chất mang dược dụng có thể trợ về mặt hóa học đối với hoạt chất và chất mang này không có tác dụng phụ bất lợi hoặc độc tố trong các điều kiện sử dụng. Việc lựa chọn chất mang có thể được xác định một phần bởi chất điều trị, cũng như bởi phương pháp cụ thể được sử dụng để dùng hợp chất điều trị. Có nhiều dạng chế phẩm thích hợp khác nhau của dược phẩm theo sáng chế. Các dạng chế phẩm sau đây để dùng theo đường uống, xông, tiêm, tiêm dưới da, thẩm thấu qua da, niêm mạc, ruột, tiêm xương, trực tiếp trong tâm thất, tĩnh mạch, mũi, mắt, tiêm bắp, động mạch, nội tủy mạc, bụng, trực tràng, và đường âm đạo có thể lấy làm ví dụ và không hạn chế theo cách nào. Có thể sử dụng nhiều hơn một đường dùng để cấp chất điều trị, và trong một số trường hợp, một đường dùng cụ thể có thể mang lại sự đáp ứng ngay lập tức và hiệu quả hơn so với đường dùng khác. Phụ thuộc vào rối loạn cụ thể cần được điều trị, các chất điều trị như vậy có thể được bào chế và dùng cho toàn thân hoặc cục bộ. Có thể tìm thấy các phương pháp kỹ thuật bào chế và cách dùng trong tài liệu của Remington là Pharmaceutical Sciences, 18th ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa. (1990).

Dạng chế phẩm thích hợp để dùng theo đường uống có thể bao gồm (một) dung dịch lỏng, như lượng hữu hiệu chất ức chế được hòa tan trong chất pha loãng, như nước, nước muối, hoặc nước cam; (b) viên nang, gói nhỏ, viên nén, viên ngậm, và viên ngậm dẹt, mỗi loại chứa một lượng đã xác định trước hoạt chất, dưới dạng chất rắn hoặc hạt; (c) bột; (d) hỗn dịch trong chất lỏng thích hợp; và (e) nhũ dịch thích hợp. Dạng chế phẩm lỏng có thể bao gồm chất pha loãng, như nước và rượu, ví dụ, etanol, rượu benzyl, và rượu polyetylen, cùng với có hoặc không có chất hoạt động bề mặt được dụng. Dạng viên nang có thể là loại gelatin có vỏ cứng hoặc mềm thông thường chứa, ví dụ, chất hoạt động bề mặt, chất bôi trơn, và chất độn trơ, như lactoza, sucroza, canxi photphat, và tinh bột. Dạng viên nén có thể bao gồm một hoặc nhiều chất trong số lactoza, sucroza, manitol, tinh bột ngô, tinh bột khoai tây, axit alginic, vi tinh thể xeluloza, nhựa cây keo, gelatin, chất gồm guar, silicon dioxit keo, natri croscarmelloza, bột tan, magiê stearat, canxi stearat, kẽm stearat, axit stearic, và các tá dược khác, chất màu, chất pha loãng, chất đệm, chất phân hủy, chất tạo ẩm, chất bảo quản, chất tạo hương, và các tá dược tương thích được phẩm khác. Dạng viên ngậm có thể chứa chất ức chế phù hợp, thường là sucroza và nhựa cây keo hoặc nhựa tragacan, cũng như dạng thuốc viên thom chứa chất ức chế trong một chất nền trơ, như gelatin và glyxerin, hoặc sucroza và nhựa cây keo, nhũ tương, gel, và ngoài ra là, chất tương tự chứa, các tá dược như được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Các dạng dược phẩm mà có thể được sử dụng theo đường uống bao gồm cả dạng viên nang có hai nửa ghép vào nhau làm từ gelatin, cũng như viên nang mềm, kín làm từ gelatin và chất làm dẻo, như glyxerol hoặc sorbitol. Viên nang có hai nửa ghép vào nhau có thể chứa hoạt chất trộn với chất độn như lactoza, chất liên kết như tinh bột, và/hoặc chất bôi trơn như bột tan hoặc magiê stearat và, một cách tùy ý, chất ổn định. Trong viên nang mềm, các hợp chất có hoạt tính có thể được hòa tan hoặc lơ lửng trong chất lỏng thích hợp, như dầu béo, parafin lỏng, hoặc glycol polyetylen lỏng. Ngoài ra, có thể bổ sung chất ổn định.

Có thể bào chế chất điều trị, một mình hoặc kết hợp với thành phần thích hợp khác, dưới dạng chế phẩm phun để được dùng theo đường xông. Dạng chế phẩm phun có thể được đặt vào chất đẩy chịu áp, như diclodiflometan, propan, nitơ, và những chất tương tự. Cũng có thể bào chế dạng chế phẩm phun dưới dạng các dược phẩm thay

cho các dạng bào chế không chịu áp, như trong ống phun hoặc máy phun. Dạng chế phẩm phun này cũng có thể được sử dụng để phun niêm mạc. Dạng chế phẩm dùng khu trú được biết đến rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Dạng chế phẩm này đặc biệt thích hợp trong phạm vi của sáng chế để áp dụng cho da.

Dạng chế phẩm tiêm được thì phù hợp với sáng chế. Các thông số về chất mang được phẩm hiệu quả đối với các chế phẩm tiêm được được biết đến rõ đối với những người có trình độ kỹ thuật thông thường trong lĩnh vực này [xem, ví dụ, *Pharmaceutics and Pharmacy Practice*, J. B. Lippincott Company, Philadelphia, PA, Banker and Chalmers, eds., pages 238-250 (1982), và *ASHP Handbook on Injectable Drugs*, Toissel, 4th ed., pages 622 - 630 (1986)]. Với mục đích tiêm, có thể bào chế các chất theo sáng chế dưới dạng dung dịch tương đương, tốt hơn là trong các chất đệm sinh lý phù hợp như dung dịch của Hanks, dung dịch của Ringer, hoặc chất đệm nước muối sinh lý. Để dùng qua tiêm niêm mạc như vậy, chất thấm thích hợp với màng chắn cần được thấm vào được sử dụng trong dạng chế phẩm này. Nhìn chung, các chất thấm này được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Dạng chế phẩm thích hợp cho việc dùng ngoài đường tiêu hóa có thể bao gồm cả các dung dịch tiêm vô trùng, đẳng trương chứa nước và không chứa nước, mà các dung dịch này có thể chứa chất chống oxy hóa, chất đệm, chất kìm hãm sự phát triển vi khuẩn, và chất hòa tan mà chính các chất này làm cho dạng chế phẩm đẳng trương với máu của người nhận được nhắm tới, và các huyền phù vô trùng có nước và không có nước có thể bao gồm các chất tạo hỗn dịch, chất hòa tan, chất làm đặc, chất ổn định, và chất bảo quản. Có thể dùng chất điều trị trong chất pha loãng chấp nhận được về mặt sinh lý trong chất mang được phẩm, như chất lỏng vô trùng hoặc hỗn hợp các chất lỏng, bao gồm nước, nước muối, dextroza chứa nước và dung dịch đường liên quan, rượu, như etanol hoặc rượu hexadexyl, glycol, như propylen glycol hoặc polyetylen glycol, poly(etylen glycol) 400, glyxerol, dimetylsulfoxit, ketal như 2,2-dimetyl-1,3-dioxolan-4-metanol, etc, dầu, axit béo, este axit béo hoặc glyxerit, hoặc glyxerit của axit béo được axetyl hóa có hoặc không có chất hoạt động bề mặt được dùng bổ sung vào, như xà phòng hoặc chất tẩy rửa, chất hỗn dịch, như pectin, carbomer, metylxeluloza, hydroxypropylmetylxeluloza, hoặc carboxymetylxenluloza, hoặc nhũ dịch và các chất bổ trợ được phẩm khác.

Dầu, có thể được sử dụng trong các dạng chế phẩm ngoài đường tiêu hóa, bao gồm dầu hỏa, động vật, thực vật, hoặc dầu tổng hợp. Các ví dụ cụ thể về các loại dầu bao gồm lạc, đậu tương, vừng, hạt bông, ngô, ôliu, sản phẩm chứa parafin, và khoáng sản. Các axit béo thích hợp để sử dụng trong các dạng chế phẩm ngoài đường tiêu hóa bao gồm axit oleic, axit stearic, và axit isostearic. Etyl oleat và isopropyl myristat là các ví dụ về este axit béo thích hợp.

Xà phòng thích hợp để sử dụng trong các dạng chế phẩm ngoài đường tiêu hóa bao gồm kim loại kiềm béo, amoni, và muối trietanolamin, và chất tẩy rửa thích hợp bao gồm (a) chất tẩy rửa cation như, ví dụ, dimetyl dialkyl halogenua amoni, và halogenua alkyl pyridinium, (b) chất tẩy rửa anion như, ví dụ, alkyl, aryl, và sulfonat olefin, alkyl, olefin, ete, và monoglyxerit sulfat, và sulfosuccinat, (c) chất tẩy rửa không chứa ion như, ví dụ, oxit amin béo, axit béo alkanolamit, và chất đồng trùng hợp polyoxyetylenpolypropylen, (d) chất tẩy rửa lưỡng tính như, ví dụ, alkyl-beta-aminopropionat, và muối amoni bậc bốn 2-alkyl-imidazolin, và (e) hỗn hợp của những chất này.

Các dạng chế phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa có thể chứa từ khoảng 0,5% đến khoảng 25% khối lượng thuốc trong dung dịch. Có thể sử dụng chất bảo quản và chất mang. Để giảm thiểu hoặc loại bỏ sự kích thích tại vị trí tiêm, các chế phẩm này có thể chứa một hoặc nhiều chất hoạt động bề mặt không chứa ion có độ cân bằng ưa nước-kị nước (hydrophilic-lipophilic balance - HLB) là từ khoảng 12 đến khoảng 17. Hàm lượng chất hoạt động bề mặt trong dạng chế phẩm thông thường từ khoảng 5% đến khoảng 15% tính theo trọng lượng. Chất hoạt động bề mặt thích hợp bao gồm este của axit béo polyetylen glycol sorbitan, như sorbitan monooleat và sản phẩm cộng khối lượng phân tử cao của etylen oxit với chất nền kỵ nước, được tạo ra bởi sự ngưng tụ propylen oxit với glycol propylen. Dạng chế phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa có thể được đặt trong vật chứa kín có liều lượng đơn vị hoặc vật chứa kín đa liều, như ống thuốc tiêm và lọ nhỏ, và có thể được bảo quản trong điều kiện khô đông lạnh (đông khô) yêu cầu duy nhất là bổ sung chất dẫn thuốc vô trùng, ví dụ, nước, để tiêm, ngay lập tức trước khi sử dụng. Các dung dịch tiêm và hỗn dịch tiêm chế ngay tức thì có thể được bào chế từ các loại bột vô trùng, hạt vô trùng, và các viên nén cùng một loại được mô tả từ trước.

Chất điều trị có thể được bào chế dưới dạng đặt âm đạo bằng cách trộn với nhiều loại chất nền, như chất nền nhũ hóa hoặc chất nền hòa tan nước. Dạng chế phẩm thích hợp để dùng qua đường âm đạo có thể được thể hiện dưới dạng vòng tránh thai, băng vệ sinh, các loại kem, gel, bột nhão, bột, dạng phun hoặc chứa, ngoài hoạt chất ra là, các chất mang như được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này sao cho thích hợp.

Các chất dự định được dùng trong tế bào có thể được dùng bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã được biết đến đối với những người có trình độ kỹ thuật thông thường trong lĩnh vực này. Ví dụ, các chất này có thể được bao bên trong liposom. Liposom là lipit hình cầu hai lớp với nội bào chứa nước. Các phân tử có mặt trong dung dịch có chứa nước tại thời điểm hình thành liposom được tích hợp vào nội bào chứa nước. Các thành phần liposom đều được bảo vệ khỏi vi môi trường bên ngoài và, vì các liposom dung hợp với màng tế bào, chúng được phân phối hiệu quả vào trong tế bào chất. Ngoài ra, do tính kỵ nước của chúng, các phân tử hữu cơ nhỏ có thể được dùng trực tiếp trong tế bào. Các vật liệu và phương pháp được mô tả cho một khía cạnh theo sáng chế có thể cũng được sử dụng trong khía cạnh khác của sáng chế. Ví dụ, vật liệu như là axit nucleic hoặc kháng thể được mô tả cho việc sử dụng trong các thử nghiệm sàng lọc cũng có thể được sử dụng làm chất điều trị và ngược lại.

Các kháng thể chống sốt dengue theo sáng chế có thể được cấp cho một đối tượng trước khi, trong khi, và/hoặc sau khi chẩn đoán bệnh nhân bị nhiễm dengue. Nhiễm dengue là do một loại bất kỳ trong số bốn kiểu huyết thanh của virus dengue (DENV) khác biệt nhưng có sự liên hệ mật thiết với nhau, (được gọi là DENV-1, DENV-2, DENV-3, và DENV-4) gây ra. Những virus dengue này là virus ARN sợi đơn thuộc họ Flaviviridae và gen Flavivirus - một họ bao gồm nhiều virus do vector truyền bệnh đáng kể về mặt y học (ví dụ, virus West Nile, virus sốt vàng, virus viêm não Nhật Bản, virus St. Louis Encephalitis, và những loại virus tương tự). Virus dengue là arbovirus (virus do động vật chân đốt sinh ra) chủ yếu bị lây truyền vào người qua vết cắn của loài muỗi truyền nhiễm Aedes. Sự truyền nhiễm này cũng có thể xảy ra qua sự truyền máu bị nhiễm bệnh hoặc cấy ghép bộ phận hoặc các mô bị nhiễm bệnh. Sự lây truyền dengue ở người cũng được biết là xảy ra sau khi phơi nhiễm nghề nghiệp trong môi trường y tế (ví dụ, tổn thương do kim tiêm) và các trường hợp lây truyền dọc đã được mô tả trong các tài liệu (có nghĩa là, lây truyền từ người mẹ mang thai bị nhiễm

dengue sang thai nhi trong tử cung hoặc đứa con sơ sinh của mình trong lao động và phân phối).

Việc nhiễm một kiểu bất kỳ trong số bốn kiểu huyết thanh của dengue có thể tạo ra một phổ đầy đủ về bệnh và mức độ nghiêm trọng. Phổ bệnh có thể nằm trong phạm vi từ triệu chứng sốt nhẹ, không đặc hiệu cho tới bệnh sốt Dengue cổ điển (dengue fever - DF), cho tới một vài hình thức nghiêm trọng của bệnh, sốt xuất huyết Dengue (dengue hemorrhagic fever - DHF) và hội chứng sốc dengue (dengue shock syndrome - DSS). Dạng nghiêm trọng thường biểu hiện sau hai tới bảy ngày sốt và thường được báo trước bởi các dấu hiệu lâm sàng và thí nghiệm. Việc kiểm soát dengue có thể bao gồm việc sử dụng kịp thời và đúng lúc sự chăm sóc hỗ trợ, bao gồm việc tiêm tĩnh mạch các dịch hoặc dạng keo đẳng trương, và giám sát chặt chẽ các dấu hiệu quan trọng và tình trạng huyết động học, cân bằng chất lỏng, và các thông số huyết học.

Thông thường, DHF có thể được phân biệt với DF bởi tiến triển của bệnh này thông qua ba giai đoạn sinh lý bệnh dự đoán của nó. Giai đoạn sốt có thể bao gồm các tình trạng sốt cao do virus huyết. Giai đoạn rò rỉ nghiêm trọng/huyết tương có thể bao gồm sự khởi phát đột ngột với các mức độ rò rỉ huyết tương khác nhau vào khoang màng phổi và bụng. Pha dưỡng bệnh hoặc tái hấp thụ có thể bao gồm sự ngừng đột ngột hiện tượng rò rỉ huyết tương với tái hấp thụ đồng thời huyết tương bị tràn mạch và các chất dịch. Các kháng thể kháng dengue theo sáng chế có thể được dùng trong bất kỳ giai đoạn nào hoặc kết hợp các giai đoạn.

Bệnh nhân nhiễm Dengue thì hoặc không có triệu chứng hoặc họ có thể có một trong ba biểu hiện lâm sàng: sốt không phân biệt được, sốt Dengue có hoặc không kèm theo xuất huyết, hoặc sốt xuất huyết dengue hoặc hội chứng sốc dengue. Hơn một nửa trong số các đối tượng bị nhiễm dengue là không có triệu chứng, tức là, họ không có biểu hiện lâm sàng hoặc các triệu chứng của bệnh.

Với sốt không phân biệt được, giai đoạn lâm sàng đầu tiên là diễn tiến tương đối lành tính mà bệnh nhân phải chịu sốt với các triệu chứng nhẹ không rõ ràng có thể giống bất kỳ bệnh sốt cao cấp tính khác. Bệnh nhân có thể có biểu hiện không giống như tiêu chuẩn định nghĩa cho bệnh DF. Các bệnh nhân mắc sốt Dengue kèm theo

hoặc không kèm theo chảy máu thông thường là trẻ vị thành niên hoặc người trưởng thành và những người này có thể biểu hiện sốt cao trong vòng hai tới bảy ngày (thỉnh thoảng cả hai gia đoạn) và có hai hoặc nhiều triệu chứng như sau: đau đầu dữ dội, đau hố mắt, đau cơ, đau khớp, phát ban nốt sần ban đỏ khuếch tán, và biểu hiện xuất huyết nhẹ. Biểu mô xuất huyết nhỏ khó phát hiện, dưới các dạng đốm xuất huyết, thường được tìm thấy ở chi dưới (nhưng có thể xảy ra trên niêm mạc miệng, hàm ếch cứng và mềm hoặc dưới kết mạc), dễ bị bầm tím trên da, hoặc bệnh nhân có thể có xét nghiệm ga rô dương tính. Các dạng xuất huyết khác như chảy máu cam, chảy máu lợi, chảy máu đường tiêu hóa, chảy máu niệu đạo cũng có thể xảy ra, nhưng hiếm. Hiện tượng giảm bạch cầu thường được phát hiện và có thể đi kèm với mức độ giảm tiểu cầu khác nhau. Trẻ em có thể bị buồn nôn và nôn. Nhìn chung, các bệnh nhân nhiễm DF không phát triển thành rò rỉ huyết tương đáng kể (như trong DHF và DSS) hoặc xuất huyết lâm sàng nhiều. Việc xét nghiệm huyết thanh học cho các kháng thể IgM kháng dengue hoặc xét nghiệm phân tử cho ARN của virus Dengue hoặc phân lập virus có thể khẳng định sự chẩn đoán. Biểu hiện lâm sàng của DF và giai đoạn đầu của DHF là giống nhau. Với sự giám sát các chỉ số chính, có thể phát hiện ra sự phát triển của DHF tại thời điểm giảm sốt để có thể bắt đầu phương pháp điều trị sớm và phù hợp.

Sốt xuất huyết Dengue (DHF) và/hoặc hội chứng sốc dengue (DSS) có biểu hiện lâm sàng khác nhau. DHF có thể có ba giai đoạn: giai đoạn sốt, giai đoạn nguy hiểm (rò rỉ huyết tương), và pha dưỡng bệnh (tái hấp thụ). Trong giai đoạn đầu, các bệnh nhân nhiễm DHF có thể biểu hiện giống như DF, nhưng họ cũng có thể xuất huyết mà không thấy vàng da (sau đó sốt cao). Các biểu hiện xuất huyết có thể xảy ra trong giai đoạn đầu nhiễm DHF bao gồm thường xuyên nhất là biểu hiện xuất huyết nhẹ giống như DF. Ít phổ biến hơn là, chảy máu cam, chảy máu nướu, xuất huyết tiêu hóa hoặc xảy ra trong khi bệnh nhân vẫn còn sốt (xuất huyết tiêu hóa có thể bắt đầu vào thời điểm này, nhưng thường không trở nên rõ ràng cho đến khi phân chứa máu xuất hiện nhiều trong thời kỳ nhiễm bệnh). Virus huyết do dengue thông thường thì cao nhất trong ba tới bốn ngày đầu tiên sau khi sốt nhưng sau đó giảm xuống nhanh chóng tới mức độ không thể phát hiện trong vài ngày tiếp theo. Mức độ xuất huyết và sốt thường đi kèm nhau, và các kháng thể IgM kháng dengue gia tăng khi hạ sốt.

Vào thời điểm hạ sốt, bệnh nhân bước vào giai đoạn nguy hiểm cao nhất do sự

phát triển các biểu hiện nghiêm trọng là rỉ huyết tương và xuất huyết. Vào thời điểm này, có thể theo dõi dấu hiệu về hiện tượng xuất huyết và rò rỉ huyết tương vào khoang màng phổi và bụng và có thể thực hiện các phương pháp điều trị thích hợp thay thế các tổn thất nội mạch và làm ổn định thể tích tuần hoàn máu hiệu quả. Nếu không được điều trị, điều này có thể dẫn đến sự suy giảm thể tích nội mạch và bệnh lý tim mạch. Dấu hiệu rò rỉ huyết tương bao gồm sự gia tăng đột ngột tỷ lệ hồng cầu (tăng 20% hoặc hơn so với mức cơ sở), xuất hiện cổ trướng, tràn dịch màng phổi mới trên tư thế nằm chụp X quang ngực, hoặc albumin huyết thanh hoặc protein thấp đối với lứa tuổi và giới tính. Bệnh nhân bị rò rỉ huyết tương có thể được theo dõi về những thay đổi các thông số huyết động học phù hợp với sốc bù như tăng nhịp tim (nhịp tim nhanh) so với tuổi đặc biệt là trong trường hợp không sốt, mạch yếu và nhỏ, chân tay lạnh, huyết áp kẹt (huyết áp tâm thu trừ huyết áp tâm trương $<20\text{mmHg}$), nạp mao mạch bị trì hoãn (> 2 giây), và giảm đi tiểu (chứng giảm niệu). Bệnh nhân biểu hiện những dấu hiệu về sự suy giảm tăng mạch, dọa sốc hoặc sốc luôn, hoặc xuất huyết nghiêm trọng có thể được xác nhận với đơn vị chăm sóc đặc biệt mức độ thích hợp để theo dõi và thay thế thể tích mạch. Khi bệnh nhân phải chịu sốc thẳng, họ có thể được phân loại là nhiễm DSS. Sốc kéo dài là yếu tố chính liên quan đến các biến chứng có thể dẫn đến tử vong bao gồm cả xuất huyết tiêu hóa lớn. Đáng quan tâm là, nhiều bệnh nhân nhiễm DHF/DSS vẫn còn tỉnh táo và minh mẫn trong suốt quá trình của bệnh, thậm chí tại các điểm cao nhất của tình trạng sốc.

Các chỉ số kiểm soát và giám sát phòng ngừa có thể được sử dụng trong các phương pháp điều trị sử dụng hiệu quả trước khi bệnh nhân bước vào giai đoạn nghiêm trọng. Giảm bạch cầu ban đầu ($\text{WBC} < 5.000$ tế bào/ mm^3) với chứng tăng lymphô bào và sự gia tăng tế bào lympho không điển hình chỉ ra rằng tình trạng sốt có thể sẽ tiêu tan trong vòng 24 giờ tới và bệnh nhân đang bước vào giai đoạn nghiêm trọng. Chỉ số cho thấy bệnh nhân đã bước vào giai đoạn nghiêm trọng bao gồm thay đổi đột ngột nhiệt độ từ cao ($> 38,0^\circ\text{C}$) tới bình thường hoặc dưới bình thường, giảm tiểu cầu (100.000 tế bào/ mm^3 hoặc ít hơn) với tỷ lệ hồng cầu tăng hoặc cao (20% trở lên tăng so với ban đầu), giảm albumin máu hoặc sự giảm cholesterol huyết, tràn dịch màng phổi mới hoặc cổ trướng, và các dấu hiệu và triệu chứng của dọa sốc hoặc sốc luôn.

Giai đoạn nghiêm trọng có thể kéo dài ít hơn 24 đến 48 giờ. Hầu hết các biến chứng phát sinh trong giai đoạn này, chẳng hạn như xuất huyết và rối loạn chuyển hóa (ví dụ, giảm canxi máu, hạ đường huyết, tăng đường huyết, nhiễm axit lactic, và hạ natri máu) thường liên quan đến sốc kéo dài. Mục đích chính trong giai đoạn này có thể để ngăn chặn sốc kéo dài và hỗ trợ các hệ thống quan trọng cho đến khi thuyên giảm rò rỉ huyết tương. Chú ý cẩn thận đối với dịch truyền tĩnh mạch (hoặc sản phẩm máu nếu cần truyền máu) được sử dụng, tỷ lệ, và thể tích nhận được theo thời gian. Giám sát thường xuyên thể tích nội mạch, chức năng cơ quan quan trọng, và phản ứng của bệnh nhân có thể được thực hiện. Có thể thực hiện giám sát sự xuất huyết bên ngoài và bên trong. Có thể được thực hiện việc truyền các sản phẩm máu thay thế thể tích nếu nghi ngờ xuất huyết đáng kể trong giai đoạn này.

Pha dưỡng bệnh (tái hấp thụ) có thể bắt đầu khi kết thúc giai đoạn nghiêm trọng và được đặc trưng khi dừng rò rỉ huyết tương và tái hấp thụ bắt đầu. Trong giai đoạn này, chất lỏng bị rò rỉ từ các không gian nội mạch (ví dụ, huyết tương và dịch trong tĩnh mạch được cấp) trong giai đoạn nghiêm trọng được tái hấp thụ. Các chỉ số cho thấy rằng bệnh nhân đang bước vào pha dưỡng bệnh bao gồm cảm giác được cải thiện tốt của bệnh nhân, sự thèm ăn trở lại, sự ổn định các dấu hiệu sống (áp suất mạch mở ra, mạch sờ thấy rõ), nhịp tim chậm, mức tỷ lệ hồng cầu trở lại bình thường, lượng nước tiểu tăng, và sự xuất hiện của chứng phát ban đặc trưng trong giai đoạn dưỡng bệnh dengue (ví dụ, đôi khi kèm theo ngứa, phát ban xuất huyết với nhiều nốt tròn nhỏ của vùng da không bị ảnh hưởng). Tại thời điểm này, có thể theo dõi cẩn thận để nhận ra những dấu hiệu chỉ ra rằng thể tích nội mạch đã ổn định (tức là rò rỉ huyết tương đã dừng lại) và tái hấp thụ đã bắt đầu. Có thể thực hiện việc thay đổi tốc độ và thể tích dịch trong tĩnh mạch (và thường nhiều lần gián đoạn dịch trong tĩnh mạch hoàn toàn) để tránh tình trạng quá tải chất lỏng khi chất lỏng tràn ra quay trở lại khoang nội mạch. Những phức tạp nảy sinh trong pha dưỡng bệnh (tái hấp thụ) thường xuyên liên quan đến việc kiểm soát dịch trong tĩnh mạch. Tình trạng quá tải chất dịch có thể do việc sử dụng các dịch trong tĩnh mạch nhược trương hoặc sử dụng quá tải hoặc sử dụng liên tục các dịch trong tĩnh mạch đẳng trương trong pha dưỡng bệnh.

Để chẩn đoán bình thường cho những bệnh nhân bị nghi ngờ nhiễm dengue, có thể thu thập mẫu huyết thanh pha cấp tính để xét nghiệm huyết thanh ít nhất 7 ngày

trước khi khởi phát sốt và kết hợp với huyết thanh pha dưỡng bệnh được lấy ra ít nhất 7 ngày sau pha cấp tính, tối ưu là từ 14 đến 21 ngày sau khi khởi phát sốt (Halstead, Annu Rev Entomol, 53:273-291 (2008);... Kurosu et al., Commun Biophys Res Biochem 394:398-404 (2010)....).

Các ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được làm rõ hơn nhờ các ví dụ sau đây, các ví dụ này được dùng để minh họa, mà không làm giới hạn sáng chế.

Ví dụ 1

Nghiên cứu này là nghiên cứu đầu tiên cho biết tầm quan trọng của việc sử dụng các PBMC từ các bệnh nhân ở pha cấp tính để điều chế các HuMAb trung hòa kiểu phức. Trong nghiên cứu này, các mẫu máu (khoảng 10ml trong mỗi mẫu) dùng để dung hợp tế bào được thu thập từ chín bệnh nhân nhiễm dengue người Thái tại Bệnh viện Bệnh Nhiệt đới, Khoa y học nhiệt đới, Đại học Mahidol (Bảng 1). Những người tham gia được chọn dựa trên chẩn đoán lâm sàng và các kết quả của thử nghiệm nhanh bằng sắc ký miễn dịch (SD BIOLINE Dengue Duo kit, SD, Kyonggi-do, Hàn Quốc). Các mẫu máu cũng được thu thập từ bốn bệnh nhân ở pha cấp tính (khoảng 1 tuần sau khi khởi phát sốt) và năm bệnh nhân ở pha dưỡng bệnh (khoảng hai tuần sau khi khởi phát sốt). Các quy trình nghiên cứu cho các mẫu của người được sự chấp thuận của Ủy ban Đạo đức thuộc Khoa y học nhiệt đới, Đại học Mahidol.

SPYMEG (theo tác giả Kubota-Koketsu và các cộng sự, Biochem. Biophys. Res. Commun., 387:180 -185 (2009)) được sử dụng làm các tế bào đối tác dung hợp, để làm phát triển các tế bào lai sản xuất HuMAb đặc hiệu. Duy trì các tế bào SPYMEG trong môi trường của Eagle được Dulbecco cải biến (DMEM) được bổ sung với huyết thanh nhau thai bò (FBS) 15% trong tủ ấm CO₂ 5% ở nhiệt độ 37°C. Duy trì các tế bào vero trong môi trường cần thiết tối thiểu (MEM) với FBS 10% trong tủ ấm CO₂ 5% ở nhiệt độ 37°C. Duy trì dòng tế bào dẫn xuất từ muỗi C6/36 trong Môi trường Leibovitz L-15 với FBS 10% và canh thang tryptophan phosphat 0,3% trong tủ ấm ở nhiệt độ 28°C.

Các DENV được sử dụng trong nghiên cứu này là DENV-1 chủng Mochizuki, DENV-2 chủng 16681 và New Guinea C (NGC), DENV-3 chủng H87, và DENV-4

chủng H241. Sử dụng những chất nổi trên bề mặt từ các tế bào C6/36 được gây nhiễm bởi các chủng riêng biệt làm nguyên liệu virus. Hiệu giá virus được đánh giá theo đơn vị tạo đám huỳnh quang (focus-forming unit - FFU), theo mô tả trước đây (theo tác giả Kurosu và các cộng sự, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 394:398-404 (2010)).

Thực hiện phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) - phiên mã ngược (RT) đối với kiểu huyết thanh của DENV như sau. Chiết ARN tổng số từ huyết tương của bệnh nhân bằng cách sử dụng bộ QIAamp Viral RNA kit (của hãng QIAGEN, Hilden, Đức) theo quy trình chuẩn của nhà sản xuất. Sử dụng ARN này làm mẫu cho quá trình phiên mã ngược nhờ Bộ kit tổng hợp cADN SuperScript III - SuperScript III cDNA synthesis kit (của hãng Invitrogen, Carlsbad, California). Sử dụng các cặp mồi của oligonucleotit đã được báo cáo trước đây về kiểu huyết thanh (theo tác giả Yenchitsomanus và các cộng sự, *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, 27: 228-236 (1996)) để khuếch đại gen DENV E, các cặp mồi này bao gồm hầu hết các phần trong vùng III: các mồi PCR thứ nhất DEUL (5'-TGGCTGGTGCACAGACAATGGTT-3') SEQ ID No. 199/ DEUR (5'-GCTGTGTCACCCAGAATGGCCAT-3') SEQ ID No. 200, phổ biến với tất cả các kiểu huyết thanh của DENV và các mồi PCR thứ hai D1L (5'-GGGGCTTCAACATCCCAAGAG-3') SEQ ID No: 201/ D1R (5'-GCTTAGTTTCAAAGCTTTTTCAC-3') SEQ ID No. 202, D2L (5'-ATCCAGATGTCATCAGGAAAC-3') SEQ ID No. 203/ D2R (5'-CCGGCTCTACTCCTATGATG-3') SEQ ID No. 204, D3L (5'-CAATGTGCTTGAATACCTTTGT-3') SEQ ID No. 205/ D3R (5'-GGACAGGCTCCTCCTTCTTG-3') SEQ ID No. 206, và D4L (5'-GGACAACAGTGGTGAAAGTCA-3') SEQ ID No. 207/ D4R (5'-GGTTACACTGTTGGTATTCTCA-3') SEQ ID No. 208, đặc hiệu với các kiểu huyết thanh riêng biệt của DENV, tương ứng là DENV-1, DENV-2, DENV-3, và DENV-4.

Các tế bào lai được điều chế như sau. Khoảng 10ml máu thu được từ những bệnh nhân riêng biệt và các PBMC được điều chế bằng cách ly tâm thông qua máy Ficoll-PaqueTM PLUS (của hãng GE Healthcare, Uppsala, Thụy Điển) trong 40 phút với tốc độ 1700 vòng/phút (520g). Cho các PBMC dung hợp với các tế bào SPYMEG

theo tỷ lệ 10:1 với polyetylen glycol 1500 (của hãng Roche Diagnostics Japan, Tokyo, Nhật Bản). Nuôi cấy các tế bào được dung hợp này trong DMEM được bổ sung FBS 15% và BM-condimed 3% (của hãng Roche Diagnostics Japan, Tokyo, Nhật Bản) trong đĩa vi thể 96 giếng trong thời gian từ 10 đến 14 ngày với sự có mặt của hypoxantin-aminopterin-thymidin (HAT). Thực hiện quá trình sàng lọc thứ nhất cho môi trường nuôi cấy về tính đặc hiệu của kháng thể đối với DENV bằng thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang gián tiếp (indirect immunofluorescence - IF). Tiếp theo, tạo dòng tế bào cho các giếng sinh kháng thể đặc hiệu bằng cách pha loãng giới hạn. Sau thời gian từ 10 đến 14 ngày, thực hiện quá trình sàng lọc thứ hai cũng bằng thử nghiệm IF.

Thực hiện quá trình tinh chế các HuMAb bằng phương pháp sắc ký cột ái lực với protein G như sau. Các HuMAb được tinh chế từ tế bào lai trong môi trường nuôi cấy trên quy mô lớn có thể tích 1 lít bằng cách sử dụng môi trường không có huyết thanh (Tế bào lai SFM, Life Technologies). Kháng thể IgG trong các dịch nuôi cấy được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột với protein G (HiTrap Protein G HP Columns, GE health care), theo hướng dẫn được khuyến cáo bởi công ty. Sau khi tinh chế, thẩm tách các HuMAb tinh chế này bằng hệ Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes, 10K MWCO, dung tích 0,5 - 3ml (của hãng Thermo Scientific) và lọc chúng bằng bộ lọc ống tiêm (kích thước lỗ 0,2µm). Nồng độ của IgG được đo theo phương pháp BCA bằng cách sử dụng Bộ kit phân tích protein Pierce^(R) BCATM (của hãng Thermo Scientific).

Thử nghiệm IF được chuẩn bị như sau. Gây nhiễm mô phỏng hoặc gây nhiễm cho các tế bào vero, với mật độ $2,5 \times 10^4$ mỗi giếng trong đĩa vi thể 96 giếng bởi DENV. Sau khi ủ trong khoảng thời gian từ 16 đến 24 giờ, cố định các tế bào này bằng formaldehyt 3,7% trong nước muối đệm phosphat (PBS) và làm thẩm bằng Triton X-100 1% trong PBS. Sử dụng các dịch nuôi cấy tế bào lai không pha loãng cho các HuMAb. Ngoài ra, pha loãng 2 lần theo dãy HuMAb tinh chế 10,0 microgam/ml và sử dụng các độ pha loãng này. Ủ các tế bào vero trong đĩa vi thể 96 giếng với các dịch nuôi cấy hoặc các dung dịch pha loãng theo dãy chứa tế bào lai. Với vai trò là mẫu đối chứng dương tính, các tế bào được ủ với 4G2, MAb của chuột kháng protein E của flavivirus (theo tác giả Falconar và các cộng sự, Arch Virol 144: 2313-2330 (1999)).

Làm hiển thị kháng thể liên kết bằng cách cho phản ứng với kháng thể thứ cấp kháng người và kháng chuột được liên hợp với AlexaFluor 488 (1:1,000; Invitrogen). Giá trị nghịch đảo của độ pha loãng cuối cùng cho thấy phản ứng dương tính nhờ thử nghiệm IF gián tiếp được sử dụng làm hiệu giá ngưng kết của các HuMAb riêng biệt.

Tiến hành thử nghiệm VN trên môi trường nuôi cấy các dòng tế bào lai riêng biệt, theo mô tả trước đây (theo tác giả Okuno và các cộng sự, Biken J 21: 137-147 (1978)). Trộn 25 microlit chất nổi trên bề mặt nuôi cấy tế bào lai, hoặc DMEM được bổ sung với FBS 15% (là mẫu đối chứng âm tính) với 100 FFU gồm các kiểu huyết thanh của DENV riêng biệt (25 microlit). Sau khi ủ trong 15 phút, sử dụng hỗn hợp này để gây nhiễm các tế bào vero trong đĩa vi thể 96 giếng. Sau khi ủ ở 37°C trong 2 giờ, bổ sung 100 microlit MEM với FBS 3% vào. Sau khi ủ ở 37°C qua đêm, cố định các tế bào này bằng formaldehyt 3,7% trong PBS và làm thấm bằng Triton X-100 1% trong PBS. Nhuộm màu cho đĩa bằng 4G2 ở 4°C qua đêm, như đối với thử nghiệm IF. Làm hiển thị kháng thể liên kết bằng cách cho phản ứng thêm với kháng thể kháng chuột được liên hợp với AlexaFluor 488 (1:1,000; Invitrogen). Thực hiện lặp lại các thử nghiệm này hai lần và các kết quả được thể hiện dưới dạng trung bình. Hoạt tính VN của HuMAb trong môi trường nuôi cấy từ các dòng tế bào lai được thể hiện là "-" (<50%), "+" (50% đến <90%), hoặc "++" (giảm 90% theo FFU), so với mẫu đối chứng âm tính. Ngoài ra, trộn 25 microlit HuMAb tinh chế với các nồng độ biến đổi của IgG (các dung dịch pha loãng theo dãy 2 lần 25,0 microgam/ml) hoặc PBS (là mẫu đối chứng âm tính) với 100 FFU các kiểu huyết thanh của DENV riêng biệt (25 microlit). Sau khi ủ ở 37°C trong 15 phút, sử dụng hỗn hợp này để gây nhiễm các tế bào vero trong đĩa vi thể 96 giếng. Sau khi tiêm truyền ở 37°C trong 2 giờ, loại bỏ chất nổi trên bề mặt ra. Và bổ sung 100 microlit MEM với carboxymethylxenluloza 1%, FBS 2% vào. Sau khi ủ ở 37°C qua đêm, cố định các tế bào này bằng formaldehyt 3,7% trong PBS và làm thấm bằng Triton X-100 1% trong PBS. Nhuộm màu cho đĩa bằng 4G2 ở 4°C qua đêm, như đối với thử nghiệm IF. Làm hiển thị kháng thể liên kết bằng cách cho phản ứng thêm với kháng thể kháng chuột được liên hợp với AlexaFluor 488 (1:1,000; Invitrogen). Thực hiện lặp lại các thử nghiệm này ba lần và các kết quả được thể hiện dưới dạng số trung bình và độ lệch chuẩn. Hoạt tính trung hòa được thể hiện dưới dạng nồng độ cho thấy giảm 50% theo FFU so với mẫu đối chứng âm tính được

tính theo Phương pháp Behrens-Karber (Klassen CD (1991) Principles of Toxicology. In Pharmacological Basis of Therapeutics, pp. 49-61. Edited by Gilman AG, Tall TW, Nies AS, Taylor P. 8th edition. McGraw-Hill) (được gọi là VN50).

Thực hiện thử nghiệm tăng cường phụ thuộc kháng thể như sau. Ủ các HuMAb tinh chế (dãy pha loãng 10 lần từ 10,0 microgam/ml) với DV1 đến DV4 ở 37°C trong 30 phút. Sau đó, tiêm truyền các tế bào THP-1 mà không có điều kiện FBS bởi dung dịch hỗn hợp chứa HuMAb-DENV và ủ hỗn hợp này ở 37°C trong 1 giờ nữa. Sau khi bổ sung FBS với nồng độ cuối cùng là 2%, nuôi cấy dung dịch THP-1 với HuMAb và DENV ở 37°C trong 3 ngày. Đặt ARN tổng số được chiết từ các tế bào bị gây nhiễm thu được bằng cách sử dụng thuốc thử TRIzol^(R) (của hãng Life Technologies) vào quy trình PCR thời gian thực một bước. Quy trình PCR thời gian thực một bước được thực hiện theo mô tả trước đây (Shu et al., J Clin Microbiol. 41:2408-2416 (2003)). Nói một cách vắn tắt, các cặp mồi của oligonucleotit được sử dụng cho quy trình PCR thời gian thực một bước: DV-F (5'-CAATATGCTGAAACGCGAGAGAAA-3') (SEQ ID No. 209),/DV-N (5'-CCCCATCTATTCAGAATCCCTGCT-3') (SEQ ID No. 210), được thiết kế để tạo ra các amplicon từ tất cả các kiểu huyết thanh của DENV và GAPDH-F (5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3') (SEQ ID No. 211),/GAPDH-R (5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3') (SEQ ID No. 212), được thiết kế để tạo ra các amplicon từ GAPDH. Sử dụng Bộ kit PCR thời gian thực một bước PrimeScript^(R) Phiên bản 2 (của hãng Takara) cho thử nghiệm này theo hướng dẫn được khuyến cáo bởi công ty. Thực hiện quy trình PCR thời gian thực bằng cách sử dụng Hệ thống phát hiện PCR thời gian thực CFX96 (BIORAD). Phân tích các dữ liệu thu được từ PCR thời gian thực bởi phương pháp phân tích Ct delta-delta (Schmittgen et al., Nat Protoc 3:1101-1108 (2008)) mà phương pháp này sử dụng giá trị t của GAPDH làm mẫu đối chứng bên trong.

Sử dụng các vector biểu hiện sau đây cho các protein của DENV. Vector CMV4-HA được sử dụng cho việc tạo dòng phân tử của dạng dung hợp của protein E và prM (prM-E) và protein E của các gen DENV. Oligo ADN sợi kép có nguồn gốc từ sự gắn mồi mồi liên kết chặn FW-CMV3-HA (GGCCGCAGGCGATATCTACCCCTACGACGTGCCCGACTACGCCTGAG) SEQ

ID No. 213) và mỗi liên kết chặn RV-CMV3-HA (GATCCTCAGGCGTAGTCGGGCACGTCGTAGGGGTAGATATCGCCTGC) SEQ ID No. 214) được chèn vào giữa các vị trí NotI và BamHI trên Vector biểu hiện pFLAG-CMVTM-4 (Sigma). Các vùng mã hóa riêng biệt cho protein E có nguồn gốc từ chủng DENV-2 NGC và cho protein prM-E có nguồn gốc từ các chủng DENV-2 16681 và DENV-2 NGC được khuếch đại bởi PrimeSTAR GXL DNA polymerase (Takara) với các mỗi đặc hiệu gen (NGC env Fw NotI, GGCGCGGCCGCCATGCGTTGCATAGGAATATCAAATA (SEQ ID No. 215); NGC env Rv EcoRV, GCGGATATCTCAGGCCTGCACCATAACTCCCAAAT (SEQ ID No. 216); prM-NotI Fw, GGAGCGGCCGCGTTCCATTTAACCACACGTAACGG (SEQ ID No. 217); và Env-EcoRV Rv, GGCGATATCGGCCTGCACCATGACTCCCAAATAC (SEQ ID No. 218)) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các đoạn ADN khuếch đại được thủy phân bởi NotI và EcoRV và được gắn kết với Vector biểu hiện CMV4-HA được thủy phân bởi NotI- và EcoRV. Vector pcDNA3-C-Flag được sử dụng cho việc tạo dòng phân tử của các gen prM và C DENV. Plasmid pcDNA3 (Invitrogen) biểu hiện ở động vật có vú được thủy phân bởi các enzym cắt giới hạn (EcoRV và XhoI), và oligoADN sợi kép (5'-ATCGACTACAAAGACGATGACGACAAGCT (SEQ ID No. 219) và 5'-TCGATCAAAGCTTGTGTCATCGTCTTTGTAGTCGATATC-3' (SEQ ID No. 220)) được chèn vào giữa các vị trí của EcoRV và XhoI. Các vùng mã hóa cho protein prM từ các chủng 16681 và NGC của DENV-2 được khuếch đại bởi PrimeSTAR GXL DNA polymerase (Takara) với các mỗi đặc hiệu gen (DV2 prM F BglII, CGAGATCTGCCACCATGTTCCATTTAACCACACGTAAC (SEQ ID No. 221); và DV2 prM R SmaI, GCCCCGGGGATATCTGTCAATTGAAGGAGTGACAGC (SEQ ID No. 222)) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các đoạn ADN khuếch đại được thủy phân bởi BglII và SmaI và được gắn kết với Vector pcDNA3-C-Flag được thủy phân bởi BamHI- và EcoRV. Gen C của DENV-2 được khuếch đại bởi PrimeSTAR Max DNA polymerase (của Takara) với các mỗi đặc hiệu gen (D2 C F, GGATCTCCAGCCATGAATGACCAACGGAAAAAGGCG (SEQ ID No. 223); và D2 C R, GTCGATGGGGATATCTCTGCGTCTCCTATTCAAGATG (SEQ ID No. 224)) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các đoạn ADN khuếch đại được tạo dòng vào

các plasmid với bộ kit tạo dòng In-Fusion Advantage PCR cloning kit (của Takara). Gen NS1 được tạo dòng theo báo cáo trước đây (Kurosu et al., Biochem Biophys Res Commun 362: 1051-1056 (2007)). Tóm lại, các bộ mã đặc hiệu (GGCGGATCCGCCATGGCCGATAGTGGTTGCGTTGTGAGC (SEQ ID No. 225) và GCGCTCGAGTCAGGCTGTGACCAAGGAGTTGACC(SEQ ID No. 226)) được sử dụng để khuếch đại gen đặc hiệu NGC NS1. Trình tự được khuếch đại này được chèn vào vào các vị trí BamHI/XhoI của pGEX-6P-1 (Invitrogen). Các tế bào 293T được chuyển nạp với các plasmid riêng biệt được sử dụng làm các kháng nguyên virus để xác định của các protein của virus được nhận dạng bởi các HuMAb bằng thử nghiệm IF.

Các HuMAb được xác định lớp như sau. Các HuMAb thu được được xác định lớp bằng bộ Định lượng Human IgG ELISA Quantitation set, Human IgM ELISA Quantitation set, và Human IgA ELISA Quantitation set (của hãng Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, Texas). Sử dụng các dịch nuôi cấy từng dòng tế bào lai riêng biệt cho việc xác định lớp kháng thể này. Ngoài ra, để phân lớp các HuMAb, Bộ ELISA microplates Maxsorp (của hãng Nunc, Copenhagen, Đan Mạch) được phủ qua đêm ở 4°C bởi 50 microlit IgG kháng người của dê (của Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) trong dung dịch đệm Natri Bicacbonat 0,05 M, độ pH 8,6 (1 microgam/ml). Sau khi rửa 5 lần bằng 300 microlit PBS-0,1% Tween-20, ủ các giếng với 300 microlit BSA 0,5% trong dung dịch đệm phong bế PBS trong 1 giờ ở 37°C. Sau khi rửa lại lần nữa, ủ các giếng với 50 microlit chất nổi bề mặt tế bào lai hoặc huyết thanh đối chứng trong 2 giờ ở 37°C. Sau khi rửa lại lần nữa, ủ các giếng với 50 microlit HRP kháng IgG1 (của hãng SouthernBiotech, Birmingham, Alabama) (1:2000), HRP kháng IgG2 (SouthernBiotech) (1:2000), HRP kháng IgG3 (SouthernBiotech) (1:2000), và HRP kháng IgG4 (SouthernBiotech) (1:2000) trong 1 giờ ở 37°C. Rửa các giếng 5 lần, tiếp theo là ủ với 50 microlit cơ chất của TMB peroxidaza (KPL, Gaithersburg, MD) ở nhiệt độ trong phòng trong bóng tối. Sau 20 phút, làm ngừng phản ứng bằng dung dịch H₂SO₄ 2 N. Đọc màu sắc mẫu ở 450nm trong máy đọc tiêu bản ELISA (Corona Electric, Tokyo, Nhật Bản). Chạy tất cả các mẫu trong ba lần.

Thực hiện đánh giá *in vivo* cho các HuMAb ở chuột con đang bú mẹ như sau.

Chuột con đang bú mẹ BALB/c được mua từ hãng Japan SLC Inc., Shizuoka, Nhật Bản. Chuột con đang bú mẹ 2 ngày tuổi được tiêm truyền trong não bằng 20 microlit chứa 20,000 FFU của DENV-2 (chủng 16681) mỗi con mà trước đó đã được ủ với 1 microgam và 0,2 microgam HuMAb được tinh chế mỗi con, hoặc PBS là mẫu đối chứng âm tính, trong 30 phút ở điều kiện băng giá.

Sự sắp xếp thứ tự của các vùng biến đổi của HuMAb được thực hiện như sau. Chiết ARN tổng số từ các tế bào tế bào lai bằng cách sử dụng bộ RNeasy Mini Kit (của hãng Qiagen, Hilden, Đức). Cho ARN tổng số thu được qua quy trình RT-PCR bằng cách sử dụng bộ PrimeScript RT reagent Kit (Takara) với mỗi oligo(dT). Vùng mã hóa của các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của HuMAb được khuếch đại bởi kỹ thuật PCR, với các mồi sau đây: 5'-ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCT-3' (SEQ ID No. 227) mồi xuôi gắn trên chuỗi nặng và mồi ngược gắn trên chuỗi nặng 5'-CCTTGGTGTGCTGGGCTTGTGAT-3' (SEQ ID No. 228); mồi xuôi gắn trên chuỗi nhẹ 5'-ATGGCCTGGWYYCCTCTCYTYCTS-3' (SEQ ID No. 229) và mồi ngược gắn trên chuỗi nhẹ 5'-TGGCAGCTGTAGCTTCTGTGGGACT-3' (SEQ ID No. 230). Các sản phẩm PCR được gắn kết vào véc-tơ pGEM T-Easy (của hãng Promega, Madison, Wisconsin), và các trình tự của chúng được phân tích bằng cách sử dụng Bộ BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit và ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (của hãng Applied Biosystems, Foster City, California).

Trong nghiên cứu này, việc điều chế các tế bào lai sản xuất các HuMAb kháng lại DENV bằng cách sử dụng các mẫu từ các bệnh nhân người Thái được xem xét. Các mẫu PBMC được thu từ các bệnh nhân ở pha cấp tính (khoảng một tuần sau khi khởi phát sốt) và các pha dưỡng bệnh (khoảng hai tuần sau khi khởi phát sốt). Trong thử nghiệm thứ nhất, sử dụng tổng cộng chín mẫu từ các bệnh nhân người Thái: ba bệnh nhân (D30, D32, và D33) ở pha cấp tính, trong khoảng 6-8 ngày sau khi khởi phát sốt; bốn bệnh nhân (D22, D25, D27, và D28) ở pha dưỡng bệnh, 12-15 ngày sau khi khởi phát sốt; và một bệnh nhân ở cả pha cấp tính (D23; 5 ngày sau khi khởi phát sốt) và pha dưỡng bệnh (D26; 19 ngày sau khi khởi phát sốt) (Các Bảng 1). D22, D27, và D30, được chẩn đoán lâm sàng là nhiễm DHF và những người khác thì tất cả đều nhiễm DF. D22, D27, D28, D30. Không có chênh lệch đáng kể về giới tính ($P=0,798$), tuổi ($P=0,856$), hoặc mức độ nghiêm trọng của bệnh ($P=0,685$) giữa các bệnh nhân ở pha

cấp tính và các pha dưỡng bệnh. Số liệu thu được từ các bộ kit thử nghiệm nhanh đã cho thấy rằng tất cả các bệnh nhân ở pha cấp tính là dương tính đối với cả hai IgG và IgM kháng dengue, điều này chỉ ra rằng các bệnh nhân này đã bị nhiễm DENV thứ phát.

Bảng 1

Bảng 1. Tóm tắt về tình trạng của các bệnh nhân và các HuMab thu được trong nghiên cứu này

Bệnh nhân	Giới tính	Tuổi	Chẩn đoán	Thu thập máu		Thử nghiệm nhanh ³		PCR	Dòng huyết thanh		Phân lập HuMab		
				Ngày	Pha	IgG	IgM		thu được	IgG	IgA	IgM	Kiểm có ⁴
D23 ¹	Nữ	33	ĐF	5	Cấp tính	+	+	DENV-2	75	70	3	0	2
D30	Nữ	23	DHF cấp độ 1	8	Cấp tính	+	+	DENV-2	25	22	3	0	0
D32	Nam	19	ĐF	6	Cấp tính	+	+	DENV-2	5	5	0	0	0
D33	Nam	31	ĐF	8	Cấp tính	+	+	DENV-2	16	14	2	0	0
D22	Nữ	25	DHF cấp độ 3	12	Dưỡng bệnh	+	+	NT ⁵	4	3	0	0	1
D25	Nam	27	ĐF	14	Dưỡng bệnh	+	+	NT	5	5	0	0	0
D26 ¹	Nữ	33	ĐF	19	Dưỡng bệnh	+	+	NT	2	2	0	0	0
D27	Nam	21	DHF cấp độ 2	13	Dưỡng bệnh	+	+	NT	2	2	0	0	0
D28	Nữ	23	ĐF	15	Dưỡng bệnh	+	+	NT	2	1	0	0	1

¹ D23 và D26 có nguồn gốc từ cùng một bệnh nhân ở pha cấp tính và pha dưỡng bệnh theo tương ứng² Máu được thu thập vào các ngày sau khi phát sốt: 5-8 ngày đối với pha cấp tính và 12-19 ngày đối với pha dưỡng bệnh³ Thử nghiệm nhanh cho D22, D25-D28 được thực hiện với huyết tương của những bệnh nhân này khi họ ở pha cấp tính⁴ Các HuMab không được cho phản ứng với bất kỳ loại nào trong số IgG, IgA, hoặc IgM⁵ Không được thử nghiệm, do không có sẵn lượng đủ huyết tương của những bệnh nhân ở pha cấp tính dùng cho quy trình RT-PCR

Các mẫu huyết tương trong pha cấp tính cũng được cho qua quy trình RT-PCR, theo kiểu huyết thanh của DENV. Thực hiện PRC thứ nhất với các môi DEUL và DEUR, các môi này phổ biến với tất cả các kiểu huyết thanh của DENV. Sau đó, cho các sản phẩm thu được qua quy trình PRC thứ hai với các môi đặc hiệu với các kiểu huyết thanh riêng biệt của DENV: D1L và D1R cho DENV-1; D2L và D2R cho DENV-2; D3L và D3R cho DENV-3; và D4L và D4R cho DENV-4. Các sản phẩm thu được được phát hiện chỉ bằng D2L và D2R, mà không phải bằng các bộ môi khác, trong tất cả các mẫu từ 4 bệnh nhân ở pha cấp tính (số liệu không được thể hiện), chỉ

ra rằng tất cả 4 bệnh nhân là các trường hợp nhiễm thứ phát do DENV-2. Về phần các bệnh nhân, các mẫu máu lấy từ các bệnh nhân này có thể dùng để điều chế tế bào lai ở pha dưỡng bệnh, các mẫu huyết tương từ bệnh nhân ở pha cấp tính được sử dụng chỉ để dùng cho thử nghiệm nhanh đã cho thấy tất cả kết quả dương tính cho cả hai loại là IgG và IgM kháng dengue, điều này chỉ ra rằng các bệnh nhân này cũng thuộc các trường hợp nhiễm thứ phát.

Các tế bào lai được điều chế như sau. Sử dụng các phần phân đoạn PBMC được điều chế từ bốn bệnh nhân ở pha cấp tính và năm bệnh nhân ở pha dưỡng bệnh để điều chế tế bào lai bằng cách dung hợp với các tế bào SPYMEG. Làm kết hạt các tế bào được dung hợp và nuôi cấy chúng khoảng thời gian từ 10 đến 14 ngày trong môi trường chọn lọc HAT trong các đĩa vi thể 96 giếng. Đáng ngạc nhiên là, bước sàng lọc đầu tiên cho từng dịch nuôi cấy trong giếng riêng biệt bộc lộ những hiệu quả cao. Với việc bổ sung các tế bào bị nhiễm DENV, các giếng có các PBMC ở pha cấp tính thường xuyên cho kết quả dương tính qua IF hơn (734 giếng) so với các giếng có các PBMC ở pha dưỡng bệnh (57 giếng). Trong số những giếng này, 272 giếng có các PBMC ở pha cấp tính dương tính theo IF và 29 giếng có các PBMC ở pha dưỡng bệnh dương tính theo IF được chọn để tạo dòng tế bào khi các giếng biểu hiện các phản ứng mạnh hơn và chứa những cụm khuẩn lạc rời rạc trong suốt. Theo tóm tắt trong các Bảng 1 (các Bảng 2 cho số liệu về các HuMAb riêng biệt), sau bước sàng lọc thứ hai bằng thử nghiệm IF sau khi ủ trong 2 tuần, 121 tế bào lai ở pha cấp tính và 15 tế bào lai ở pha dưỡng bệnh thể hiện sự tăng sinh ổn định và đạt được mục đích sản xuất các MAb kháng DENV. Việc xác định lớp đã cho thấy kiểu IgG chiếm 91,7% (111/121) trong số các HuMAb từ các tế bào pha cấp tính và 86,6% (13/15) trong số HuMAb từ các tế bào pha dưỡng bệnh. Kiểu IgA được phát hiện ra chỉ chiếm 6,6% (8/121) trong số các HuMAb từ các tế bào pha cấp tính. Không có trường hợp nào dương tính đối với kiểu IgM. Không có các phản ứng dương tính nào trong bốn dòng đối với kiểu bất kỳ trong số IgG, IgA, và IgM trong các điều kiện được xem xét bằng cách sử dụng các dịch nuôi cấy dòng tế bào lai.

Tính phản ứng chéo của các HuMAb được xác định như sau. Đặc trưng của các HuMAb thu được theo mô tả ở trên là về tính phản ứng huyết thanh học của chúng đối với tất cả bốn kiểu huyết thanh của DENV qua các thử nghiệm IF và VN. Các

HuMAb trong các dịch nuôi cấy tế bào lai riêng biệt được sử dụng cho các thử nghiệm này. Như được thể hiện trên FIG.1, các HuMAb được phân loại thành các nhóm 1 đến 10 và các nhóm A đến X dựa trên tính phản ứng chéo của chúng với bốn kiểu huyết thanh của DENV trong các thử nghiệm IF và VN, theo tương ứng: nhóm A đã cho thấy không có hoạt tính VN với bất kỳ kiểu nào trong số bốn kiểu huyết thanh; các nhóm 1-2 và các nhóm B-E đã cho thấy các phản ứng đặc hiệu với một kiểu huyết thanh duy nhất; các nhóm 3-6 và các nhóm F-H đã cho thấy các phản ứng chéo với hai kiểu huyết thanh; các nhóm 7-9 và các nhóm I-O đã cho thấy các phản ứng chéo với ba kiểu huyết thanh; và nhóm 10 và các nhóm P-X đã cho thấy các phản ứng chéo với tất cả bốn kiểu huyết thanh. Thử nghiệm IF đã bộc lộ rằng 109 trong số 121 dòng (90,1%) có nguồn gốc từ các bệnh nhân ở pha cấp tính thì phản ứng chéo với tất cả bốn kiểu huyết thanh (FIG.1): 65 trong số 75 dòng (86,7%) từ D23, 23 trong số 25 dòng (92,0%) từ D30, năm trong số năm dòng (100%) từ D32, và 16 trong số 16 dòng (100%) từ D33 (FIG.2 và Bảng 2). Ngược lại, chỉ 7 trong số 15 dòng (46,7%) có nguồn gốc từ các bệnh nhân ở pha dưỡng bệnh được thể hiện là phản ứng chéo với tất cả bốn kiểu huyết thanh (FIG.1): ba trong số bốn dòng (75,0%) từ D22, hai trong số năm dòng (40,0%) từ D25, một trong số hai dòng (50,0%) từ D26, một trong số hai dòng (50,0%) từ D27, và không dòng nào trong số hai dòng từ D28 (0%) (FIG.2 và Bảng 2). Vì vậy, các HuMAb thu được phản ứng chéo với tất cả bốn kiểu huyết thanh thì có hiệu quả nhiều hơn đáng kể bằng cách sử dụng các PBMC của các bệnh nhân ở pha cấp tính, so với các bệnh nhân ở pha dưỡng bệnh ($P=0,008$). Các mẫu IF của một số HuMAb đại diện qua thử nghiệm IF được thể hiện trong FIG.3: D28-2B11D10 và D23-4A7D6 là đặc hiệu với kiểu huyết thanh, D28-2B11F9 và D23-1B11A5 thì phản ứng chéo với hai kiểu huyết thanh, D25-4D3D2 và D23-3E6D7 thì phản ứng chéo với ba kiểu huyết thanh, và D22-1B7G2 thì phản ứng chéo với tất cả bốn kiểu huyết thanh. MAb 4G2 của chuột được sử dụng làm mẫu đối chứng dương tính cho các kháng thể phản ứng với tất cả bốn kiểu huyết thanh (tương ứng với nhóm 10). Tiếp theo, các tác giả sáng chế đã kiểm tra hoạt tính VN của HuMAb. Các dịch nuôi cấy của từng dòng tế bào lai riêng biệt được cho phản ứng với DENV-1 đến DENV-4. Dưới những điều kiện này, 4G2 trong mẫu đối chứng đã cho thấy mức giảm 90% theo FFU so với mẫu đối chứng âm tính (DMEM với FBS 15%) trong tất cả bốn kiểu huyết thanh của

DENV và, do đó, MAb này được phân loại thành nhóm X.

Bảng 2-1

Bảng 2. Kết quả tóm tắt về tính phân ứng chéo của các HuMAb riêng biệt

Bệnh nhân	Hybridoma	Tính phản ứng theo IF					Hoạt tính VN ¹					Isotip	Protein đích
		DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4	JEV	DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4	JEV		
Cấp tính	D23	D23-1A2B6	+	+	+	+	+	++	+	++	-	IgG	E
		D23-1A5D7	+	+	+	+	+	-	-	-	-	IgG	E
		D23-1A8H5	+	+	-	+	-	+	-	-	+	IgG	E
		D23-1A10H7	+	+	+	+	++	++	++	++	-	IgG	E
		D23-1B1E5	+	+	+	+	-	++	+	+	+	IgG	E
		D23-1B3B9	+	+	+	+	+	++	++	++	+	IgG	E
		D23-1B8F7	+	+	+	+	-	+	-	+	-	IgG	E
		D23-1B10C7	+	+	+	+	-	++	+	+	+	IgG	E
		D23 1B11A5	+	-	-	+	-	+	-	-	+	ND ²	Khác ³
		D23-1C1G4	+	+	+	+	++	++	++	++	-	IgG	E
		D23-1C2D2	+	+	+	+	++	++	++	++	+	IgG	E
		D23-1C3B11	+	+	+	+	-	-	+	-	-	IgG	Khác ³
		D23-1C6F6	+	+	+	+	+	++	+	++	+	IgG	E
		D23-1D4E2	+	+	+	+	-	++	+	+	-	IgG	E
		D23 1D5G10	+	+	+	+	-	-	-	-	-	IgG	prM
		D23-1D8B3	+	+	+	+	-	-	-	-	-	IgG	Khác ³
		D23-1E3R1	+	+	+	+	+	++	+	+	-	IgG	E
		D23-1E12E8	+	+	+	+	-	++	+	+	-	IgG	E
		D23-1G1H8	+	+	+	+	+	++	+	++	-	IgG	E
		D23-1G5C8	+	+	+	+	+	++	+	+	+	IgG	E
		D23-1G7C2	+	+	+	+	++	++	+	++	+	IgG	E
		D23-1G10A3	+	+	+	+	+	++	+	++	-	IgG	E
		D23-1H5A11	+	+	+	+	++	++	++	++	+	IgG	E
		D23-1H11C2	+	+	+	+	-	-	-	-	-	IgG	prM
		D23-2A5B5	+	+	+	+	-	-	-	+	-	IgG	prM
		D23-2A8D2	+	+	+	+	-	-	-	-	+	IgG	NS1
		D23-2A8G5	+	+	+	-	-	-	-	-	-	IgG	NS1
		D23-2A11B7	+	+	+	+	+	++	+	+	-	IgG	E
		D23-2A12B9	-	+	-	+	-	-	-	-	-	IgA	Khác ³
		D23-2C3D8	+	+	+	+	+	-	-	-	-	IgG	prM
		D23 2C11G6	+	+	+	+	+	++	+	+	-	IgG	E
		D23-2D12C6	+	+	+	+	+	++	+	+	+	IgG	E
		D23-2E1D7	+	+	+	+	-	++	-	+	-	IgG	E
		D23-2E10D7	+	+	+	+	+	++	+	+	-	IgG	E
		D23-2F2B1	+	+	+	+	+	++	-	+	-	IgG	E
		D23-2G4E7	+	+	+	+	-	++	+	+	-	IgG	E
		D23-3A2F9	+	+	+	+	-	-	-	-	-	IgG	prM
		D23 3A10G12	+	+	+	+	++	++	++	++	+	IgG	E
		D23-3B2G9	+	+	+	+	+	++	+	-	+	IgG	E
		D23-3C5A9	+	+	+	+	-	-	-	-	-	IgG	prM
		D23-3E6D7	+	+	-	+	+	++	+	++	+	IgG	E
		D23-4A6F9	+	+	+	+	+	++	++	++	+	IgG	E
		D23-4A11A2	+	+	+	+	+	++	+	++	+	IgG	E
		D23-4A7D6	-	-	-	+	-	-	-	-	-	ND ²	Khác ³
		D23-4B9H3	+	+	+	+	+	++	+	++	-	IgG	E
		D23-4B12C5	+	+	+	+	++	++	+	+	-	IgG	E
		D23-4C5D7	+	+	+	+	+	++	+	++	-	IgG	E

Bảng 2-2

Bảng 2 (tiếp theo - 1). Kết quả tóm tắt về tính phản ứng chéo của các HuMAb riêng biệt

Bệnh nhân	Hybridoma	Tính phản ứng theo IF					Hoạt tính VN ¹					Isotip	Protein đích
		DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4	JEV	DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4	JEV		
Cấp tính (tiếp theo)	D23	D23-4D6F9	+	+	+	+	+	++	+	+	-	IgG	E
		D23-4D9G5	+	+	+	+	-	-	-	-	-	IgG	prM
		D23-4D10E9	+	+	+	+	++	++	+	++	+	IgG	E
		D23-4E9A10	+	+	+	+	+	++	+	+	+	IgG	E
		D23-4F5E1	+	+	+	+	++	++	+	++	+	IgG	E
		D23-4F10H7	+	+	+	+	-	+	+	-	-	IgG	E
		D23-4H12C8	+	+	+	+	+	++	++	+	-	IgG	E
		D23-5A2C10	+	+	+	+	+	++	+	+	+	IgG	E
		D23-5A4E8	+	+	+	+	+	++	+	+	-	IgG	E
		D23-5A5A6	+	+	+	+	+	+	-	+	-	IgG	Khác ³
		D23-5A7F6	+	+	+	+	-	++	+	+	-	IgG	E
		D23-5A8B1	+	+	+	+	-	-	-	+	-	IgG	prM
		D23-5B5E1	+	+	+	+	+	++	+	+	-	IgG	E
		D23-5B9C9	+	+	+	+	+	++	+	+	-	IgG	E
		D23-5C1G7	+	+	+	+	+	++	+	+	+	IgG	E
		D23-5C3B2	+	+	+	+	+	+	+	-	-	IgG	E
		D23-5C7G1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	IgG	NS1
		D23-5D6D1	+	+	+	+	+	++	+	+	-	IgG	E
		D23-5E3G3	-	+	+	-	+	++	++	-	-	IgG	E
		D23-5E6B1	+	+	+	+	++	++	++	++	-	IgG	E
		D23-5E8B8	+	+	+	+	++	++	+	++	-	IgG	E
		D23-5F3B8	+	+	+	+	+	++	+	+	+	IgG	E
		D23-5F4B3	+	+	+	+	+	++	+	+	+	IgG	E
		D23-5G2D2	+	+	+	+	++	++	+	++	+	IgG	E
		D23-5G4B6	-	+	-	-	-	-	-	-	-	IgA	Khác ³
		D23-5G7F10	-	+	-	+	-	-	-	-	-	IgA	Khác ³
		D23-5G8E3	+	+	+	+	++	++	++	++	+	IgG	E
		D23-5G10G8	+	+	+	+	-	++	+	+	-	IgG	E
D30		D30-1A4F4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	IgG	E
		D30-1B5D8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	IgG	E
		D30-1D10C7	+	+	+	+	+	+	+	+	-	IgG	E
		D30-1E7B8	+	+	+	+	++	++	++	++	+	IgG	E
		D30-1E12C3	+	+	+	+	+	+	+	++	-	IgG	E
		D30-1G1E6	+	+	+	+	+	++	+	++	+	IgG	E
		D30-1G7D6	+	+	+	+	+	++	+	++	+	IgG	E
		D30-1G11D7	+	+	+	+	+	+	+	+	-	IgG	E
		D30-2B1G5	+	+	+	-	+	+	+	+	+	IgG	NS1 ⁴
		D30-2B2G7	+	+	+	+	+	+	+	+	-	IgG	E
		D30-2C1B8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	IgG	E
		D30-2C12B4	+	+	+	+	+	+	+	+	-	IgG	E
		D30-2D4D10	+	+	+	+	-	-	-	-	+	IgG	E
		D30-2G8B10	+	+	+	+	+	+	+	-	-	IgG	E
		D30-2G8H12	-	+	+	+	-	-	-	+	+	IgG	Khác ³

Bảng 2-3

Bảng 2 (tiếp theo - 2). Kết quả tóm tắt về tính phản ứng chéo của các HuMAb riêng biệt

Bệnh nhân	Hybridoma	Tính phản ứng theo IF					Hoạt tính VN ¹					Isotíp	Protein đích
		DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4	JEV	DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4	JEV		
Cấp tính (tiếp theo)	D30	D30-2G12F10	+	+	+	+	+	+	+	++	+	IgG	E
		D30-3A1E2	+	+	+	+	++	++	++	++	+	IgG	E
		D30-3B1H9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	IgG	E
		D30-3B5B3	+	+	+	+	+	+	+	+	-	IgG	E
		D30-3B6C7	+	+	+	+	+	++	+	++	-	IgG	E
		D30-3B10E7	+	+	+	+	++	++	++	++	+	IgA	E
		D30-3G8F5	+	+	+	+	+	+	+	+	-	IgG	E
		D30-3H3G2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	IgA	E
		D30-3H5C9	+	+	+	+	+	++	+	+	-	IgG	E
		D30-3H9F8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	IgA	E
	D32	D32-1B5G5	+	+	+	+	-	+	+	+	-	IgG	E
		D32-2D1G5	+	+	+	+	++	++	++	++	+	IgG	E
		D32-2D9C2	+	+	+	+	-	-	-	-	-	IgG	E
		D32-2H8G1	+	+	+	+	+	++	++	++	+	IgG	E
		D32-5B12F7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	IgG	E
	D33	D33-1A10D8	+	+	+	+	-	+	-	-	-	IgG	Khác ³
		D33-1B6H10	+	+	+	+	-	+	-	-	-	IgG	E
		D33-1C8D2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	IgG	E
		D33-1D3D10	+	+	+	+	+	+	+	+	-	IgG	E
		D33-1F9B11	+	+	+	+	+	+	+	+	-	IgG	E
		D33-2H1G4	+	+	+	+	-	-	-	-	+	IgG	E
		D33-2H9D10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	IgA	E
		D33-3A4A6	+	+	+	+	-	-	-	-	-	IgG	E
		D33-3A5C7	+	+	+	+	-	+	+	+	-	IgG	E
		D33-3A7B4	+	+	+	+	+	+	+	+	-	IgG	E
		D33-3D8A9	+	+	+	+	-	+	+	+	+	IgG	E
		D33-3D12D4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	IgA	E
		D33-3E4H10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	IgG	E
		D33-3G12C3	+	+	+	+	-	-	+	-	-	IgG	E
		D33-4C10C10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	IgG	E
		D33-5D12B11	+	+	+	+	-	-	-	-	-	IgG	E
Dưỡng bệnh	D22	D22-1B7G2	+	+	+	+	-	-	-	-	-	IgG	prM
		D22-2G4E3	+	+	+	+	-	-	-	-	-	IgG	E
		D22-3H2G5	-	+	+	+	-	-	-	-	-	ND ²	Khác ³
		D22-3H10F10	+	+	+	+	-	-	-	-	-	IgG	Khác ³
	D25	D25-2B11C3	+	+	+	-	-	-	-	-	-	IgG	NS1
		D25-2B11G11	+	+	+	+	-	+	+	+	+	IgG	NS1 ³
		D25-4D3D2	+	+	+	-	-	-	-	-	+	IgG	NS1
		D25-4D4C3	+	+	+	-	-	-	-	-	+	IgG	NS1
		D25-4D4F10	+	+	+	+	-	+	+	+	-	IgG	NS1 ⁶
	D26	D26-5A2G2	+	+	+	+	+	++	+	++	-	IgG	E
		D26-5A2B12	+	+	+	-	-	-	-	-	+	IgG	NS1
	D27	D27-1E8A3	+	+	+	+	-	+	-	+	-	IgG	prM
		D27-1E8A4	+	+	+	-	-	-	-	-	+	IgG	NS1
	D28	D28-2B11D10	-	+	-	-	-	-	-	-	-	ND ²	Khác ³
		D28-2B11F9	+	+	-	-	-	-	-	-	-	IgG	NS1

1: "-" cho <50%, "+" cho ≤ 50% và <90%, và "++" cho ≤ 90% về mức giảm FFU so với mẫu đối chứng âm tính

2: Không có phản ứng với bất kỳ loại nào trong số IgG, IgA hoặc IgM

3: Không có phản ứng ít nhất với prM-E, E, prM và NS1

4: Ngoài NS1 ra, protein E cũng phản ứng nhẹ với HuMAb này

5: Ngoài NS1, protein E và prM cũng phản ứng nhẹ với HuMAb này

6: Ngoài NS1, protein prM cũng phản ứng nhẹ với HuMAb này

Mặt khác, 103 trong số 121 dòng ở pha cấp tính (85,1%) và bốn trong số 15 dòng ở pha dưỡng bệnh (26,7%) đã cho thấy mức giảm 50% về sự sao chép của virus (FIG.1). Mức giảm 90% về sự sao chép của virus được phát hiện ra ở 62 trong số 121 dòng ở pha cấp tính (51,2%) và một trong số 15 dòng ở pha dưỡng bệnh (6,7%) (FIG.1). Tổng cộng 70 dòng ở pha cấp tính (57,9%) và một dòng ở pha dưỡng bệnh (6,7%) đã cho thấy hoạt tính trung hòa (mức giảm 50% về sự sao chép của virus) đối với tất cả bốn kiểu huyết thanh, trong khi đó chỉ 11 dòng ở pha cấp tính (9,1%) và không có dòng nào ở pha dưỡng bệnh (0%) đã cho thấy hoạt tính trung hòa (mức giảm 90% về sự sao chép của virus) đối với tất cả bốn kiểu huyết thanh (FIG.1 và Bảng 2).

Các mối tương quan giữa các kết quả của thử nghiệm IF và VN (mức giảm

50% và 90%) đối với từng HuMAb riêng biệt được thể hiện trong FIG.4. Các HuMAb thu được thì không đồng nhất lắm. Các HuMAb có các hoạt tính trung hòa đối với tất cả bốn kiểu huyết thanh của DENV thu được hiệu quả hơn bằng cách sử dụng các PBMC ở pha cấp tính. Có nhiều mâu thuẫn giữa các số liệu thu được của IF và VN liên quan đến bốn HuMAb: một từ bệnh nhân D23 thuộc nhóm 4-C (trong các thử nghiệm IF và VN, theo tương ứng), một từ bệnh nhân D23 thuộc nhóm 5-K, một từ bệnh nhân D23 thuộc nhóm 8-U, và một từ bệnh nhân D30 thuộc nhóm 7-N.

Các Bảng 2-4 cho thấy các kết quả tóm tắt về protein của virus được các HuMAb nhận dạng. Các tế bào 293T được chuyển nạp với các vector biểu hiện đối với các protein prM, E, NS1, và C của DENV-2, hoặc đối với protein dung hợp prM-E, được sử dụng làm các đích nhắm để xác định các protein của virus được các HuMAb riêng biệt nhận dạng bằng thử nghiệm IF. Số liệu tóm tắt về các protein của virus được các HuMAb riêng biệt nhận dạng phân loại trong các nhóm 1 đến 10 bằng thử nghiệm IF và trong các nhóm A đến X bằng thử nghiệm VN được thể hiện lần lượt trong các Bảng 3 và 4, (các kết quả từ các HuMAb riêng biệt được thể hiện trong Bảng 2). Trong số các HuMAb ở pha cấp tính, 99 phản ứng với E, tám phản ứng với prM, bốn phản ứng với NS1, và không HuMAb nào phản ứng với C. Dịch nuôi cấy của 10 dòng tế bào lai còn lại thì không phản ứng với các protein E, prM, NS1, hoặc C (“Khác”). Trong số các HuMAb ở pha dưỡng bệnh, hai phản ứng với E, hai phản ứng với prM, tám phản ứng với NS1, và không HuMAb nào phản ứng với C, và ba dòng tế bào lai còn lại không phản ứng với bất kỳ protein nào được thử nghiệm (“Khác”). Đáng quan tâm là, năm HuMAb thu được từ D25 thì tất cả đều phản ứng đối với NS1 (Bảng 2). Các Bảng 3 và 4 tổng kết các protein của virus được các HuMAb nhận dạng được phân chia theo nhóm có tính phản ứng (các nhóm 1 đến 10 bằng thử nghiệm IF và các nhóm A đến X bằng thử nghiệm VN). 98 HuMAb nhận dạng E (96 trong số 99 HuMAb từ pha cấp tính và hai của hai HuMAb từ pha dưỡng bệnh) tất cả đều trong nhóm 10 (phản ứng chéo với tất cả bốn kiểu huyết thanh) theo thử nghiệm IF (Bảng 3). Trong số những HuMAb, 70 HuMAb ở pha cấp tính và một HuMAb pha dưỡng bệnh đã cho thấy mức hoạt tính VN 50% đối với tất cả bốn kiểu huyết thanh của DENV (các nhóm P đến X). Trong số 70 HuMAb ở pha cấp tính, 11 HuMAb cũng đã cho thấy mức hoạt tính VN 90% đối với tất cả bốn kiểu huyết thanh của DENV (nhóm X).

Bảng 3. Các protein virus đích của các HuMAb được phân loại theo các kết quả IF

DENV					IF							
kiểu huyết thanh					Cấp tính				Dưỡng bệnh			
1	2	3	4		E	prM	NS1	Khác ¹	E	prM	NS1	Khác ¹
1	-		-	-				1 (0) ⁵				2 (0)
2	-	-	-					1 (0)				
3			-	-							1 (0)	
4		-	-					1 (0)				
5	-			-	1 (0)							
6	-		-					2 (0)				
7				-			3 ² (1 ³)				5 (0)	
8			-		2 (2)							
9	-							1 (0)				
10					96 (91)	8 (0)	1 (0)	4 (2)	2 (2)	2 (0)	2 ^{3,4} (1 ³)	1 (1)

1: Không phản ứng ít nhất với prM-E, E, prM và NS1

2: HuMAb (D30-2B1G5) cũng phản ứng nhẹ với E

3: HuMAb (D25-2B11G11) cũng phản ứng nhẹ với E và prM

4: HuMAb (D25-4D4F10) cũng phản ứng nhẹ với prM

5: Số dòng HuMAb cho thấy phản ứng dương tính với JEV được thể hiện trong dấu ngoặc đơn

Bảng 4. Protein đích được phân loại theo kết quả Nt

Kiểu huyết thanh DENV					VN								
					Cấp tính				Dương bệnh				
	1	2	3	4	E	prM	NS1	Khác ¹	E	prM	NS1	Khác ¹	
A ³	-	-	-	-	5 (2) ⁶	5 (0)	3 (1)	5 (0)	1 (0)	1 (0)	6 (4)	3 (0)	
B	-	-	-	-		1 (0)							
C	-	-	-	-	3 (1)			1 (1)					
D	-	-	-	-	1 (0)			2 (0)					
E	-	-	-	-		2 (0)		1 (1)					
F	-	-	-	-	2 (0)								
G	-	-	-	-	1 (0)				1 (0)				
H	-	-	-	-	1 (0)								
I	-	-	-	-	4 (1)								
J	-	-	-	-	1 (1)								
K	-	-	-	-	1 (0)								
L	-	-	-	-				1 (0)					
M	-	-	-	-	1 (0)								
N	-	-	-	-	2 (1)		1 ² (1 ³)				2 ^{3,4} (1 ³)		
O	-	-	-	-	7 (2)								
P	-	-	-	-	19 (10)								
Q	-	-	-	-	17 (7)								
R	-	-	-	-	2 (1)								
S	-	-	-	-	1 (0)								
T	-	-	-	-	1 (0)								
U	-	-	-	-	11 (5)				1 (0)				
V	-	-	-	-	5 (4)								
W	-	-	-	-	3 (3)								
X	-	-	-	-	11 (8)								

¹ Không phản ứng ít nhất với prM-E, E, prM, và NS1.

² HuMAb (D30-2B1G5) cũng phản ứng yếu với E.

³ HuMAb (D25-2B11G11) cũng phản ứng yếu với E và prM.

⁴ HuMAb (D25-4D4F10) cũng phản ứng yếu với prM.

⁵ Các HuMAb cho thấy các phản ứng dương tính với DENV theo IF, nhưng không có hoạt tính VN với kiểu huyết thanh bất kỳ của DENV.

⁶ Số dòng HuMAb cho thấy phản ứng dương tính với JEV được thể hiện trong dấu ngoặc đơn

Các Bảng 2-4 cho thấy kết quả tóm tắt về tính phản ứng chéo của các HuMAb với Virut viêm não Nhật Bản (Japanese Encephalitis Virus - JEV). Tiếp theo, các tác giả sáng chế đã xem xét tính phản ứng chéo có thể có của các HuMAb này với các tế bào JEV bị nhiễm bằng thử nghiệm IF. Đáng quan tâm là, nhiều dòng HuMAb đã cho thấy các phản ứng dương tính với JEV: 96 trong số 121 (79,3%) HuMAb từ pha cấp tính và bốn trong số 15 (26,7%) HuMAb từ pha dưỡng bệnh (Bảng 2 thể hiện số liệu về các HuMAb riêng biệt). Hầu hết các HuMAb được phân loại thành nhóm 10: 91 HuMAb nhận dạng DENV E và hai HuMAb nhận dạng “Khác” từ pha cấp tính; và hai HuMAb nhận dạng DENV E, một HuMAb nhận dạng NS1, và một HuMAb nhận dạng “Khác” từ pha dưỡng bệnh. Ba HuMAb từ pha cấp tính đã phản ứng với JEV và thuộc về các nhóm khác với nhóm 10: hai trong nhóm 8 đã nhận dạng DENV E và một trong nhóm 7 đã nhận dạng NS1. Tiếp theo, các HuMAb đã được kiểm tra về hoạt tính VN kháng lại JEV. Tổng cộng 55 dòng HuMAb đã cho thấy hoạt tính VN 50% kháng lại JEV, mặc dù không dòng nào cho thấy mức hoạt tính VN 90%. Theo tóm tắt trong Bảng 4, 50 (46 nhận dạng E, hai nhận dạng NS1, và hai nhận dạng “Khác”) trong số 55 các HuMAb ở trên là từ pha cấp tính và năm HuMAb còn lại nhận dạng NS1 là từ pha dưỡng bệnh (Bảng 2 cho thấy số liệu đối với từng HuMAb riêng biệt). Đáng quan tâm là, hoạt tính VN kháng lại JEV đã được nhận thấy không chỉ đối với các HuMAb phản ứng chéo với tất cả bốn kiểu huyết thanh của DENV (38 trong các nhóm P đến X từ pha cấp tính), mà còn đối với các HuMAb phản ứng chéo với hai hoặc ba các kiểu huyết thanh của DENV (sáu từ pha cấp tính và một từ pha dưỡng bệnh trong các nhóm F đến O), đối với các HuMAb đặc hiệu với kiểu huyết thanh của DENV (ba từ pha cấp tính trong các nhóm B đến E), và đối với các HuMAb không có hoạt tính VN với bất kỳ kiểu nào trong số các kiểu huyết thanh của DENV (ba từ pha cấp tính và bốn từ pha dưỡng bệnh trong nhóm A). Sự chọn lọc 18 dòng tế bào lai sản xuất các kháng thể trung hòa mạnh hơn với tất cả bốn kiểu huyết thanh của DENV. Tổng cộng 18 dòng tế bào lai sản xuất các HuMAb đặc hiệu kháng lại DENV được chọn với vai trò là nguồn sản xuất kháng thể với các hiệu giá trung hòa cao hơn từ tổng cộng 136 dòng tế bào lai, 121 thu được từ 4 bệnh nhân người Thái ở pha cấp tính và 15 từ 5 bệnh nhân người Thái ở pha dưỡng bệnh, theo các kết quả bởi thử nghiệm hoạt tính trung hòa của virut bằng cách sử dụng các dịch nuôi cấy tế bào lai riêng biệt đối với các chủng trong

phòng thí nghiệm là các kiểu huyết thanh DENV-1 đến DENV-4 (theo Setthapramote và các cộng sự, *Biochem Biophys Res Commun* 423: 867-872 (2012)). Tất cả 18 dòng này được chọn với vai trò là nguồn sản xuất các HuMAb cho thấy mức ức chế sự sao chép của virus >85% ở tất cả bốn kiểu huyết thanh có nguồn gốc từ ba bệnh nhân ở pha cấp tính (Bảng 5). Tất cả ba bệnh nhân là người lớn: 13 HuMAb được điều chế với các PBMC vào ngày 5 sau khi khởi phát bệnh sốt Dengue ở bệnh nhân nữ D23 33 tuổi; 3 HuMAb được điều chế với các PBMC vào ngày 8 sau khi khởi phát bệnh sốt xuất huyết dengue ở bệnh nhân nữ D30 23 tuổi; và 2 HuMAb được điều chế với các PBMC vào ngày 6 sau khi khởi phát bệnh sốt Dengue ở bệnh nhân nam D32 19 tuổi. Tất cả các HuMAb này là IgG1, ngoại trừ D30-1E7B8 là IgG4, và nhận dạng protein E của DENV. Hai HuMAb khác cho thấy hoạt tính trung hòa mạnh tương tự đối với tất cả 4 kiểu huyết thanh được tách loại ra khỏi các HuMAb được chọn, do D30-3B10E7 là IgA, mà IgA thì khó tinh chế, và dòng tế bào lai sản sinh D23-4D10E8 sản xuất lượng kháng thể giảm khi các tác giả sàng chế thu hồi dòng tế bào lai từ điều kiện đóng băng.

Bảng 5**Bảng 5. Tình hình của các HuMAb thu được bằng cách dung hợp với các PBMC của bệnh nhân và các hoạt tính của chúng đối với DENV-1 đến DENV-4**

Dòng HuMAb	Bệnh nhân	Bệnh Số ngày sau khi khởi phát sốt	DENV theo RT-PCR	Thử nghiệm IF				Thử nghiệm VN (%)				Isotip IgG
				DENV1	DENV2	DENV3	DENV4	DENV1	DENV2	DENV3	DENV4	
D23-1A10H7	D23 Nữ 33 tuổi	DF Ngày 5	Thử phát bởi DENV2	+	+	+	+	94,9	100	92,0	93,4	IgG ₁
D23-1B3B9				+	+	+	+	89,7	100	90,5	94,3	IgG ₁
D23-1C1G4				+	+	+	+	97,4	100	91,2	94,3	IgG ₁
D23-1C2D2				+	+	+	+	97,4	100	94,9	95,3	IgG ₁
D23-1G7C2				+	+	+	+	97,4	100	89,1	93,4	IgG ₁
D23-1H2A11				+	+	+	+	100	100	93,4	94,3	IgG ₁
D23-3A10G12				+	+	+	+	97,4	100	92,7	97,2	IgG ₁
D23-4A6F9				+	+	+	+	87,2	100	93,4	90,5	IgG ₁
D23-4F5E1				+	+	+	+	92,3	100	89,8	91,5	IgG ₁
D23-1H12C8				+	+	+	+	87,2	100	92,0	87,7	IgG ₁
D23-5E6B1				+	+	+	+	92,3	100	92,0	91,5	IgG ₁
D23-5G2D2				+	+	+	+	92,3	100	85,4	92,4	IgG ₁
D23-5G8E3	D30, Nữ 23 tuổi	DHF (cấp độ 1) Ngày 8	Thử phát bởi DENV2	+	+	+	+	94,9	100	92,7	95,3	IgG ₁
D30-1E7B8				+	+	+	+	92,4	93,9	91,0	92,0	IgG ₁
D30-3A1E2				+	+	+	+	97,0	97,2	90,5	94,9	IgG ₁
D30-3B6C7				+	+	+	+	87,1	93,3	85,2	94,9	IgG ₁
D32-2D1G5	D32 Nam 19 tuổi	DF Ngày 6	Thử phát bởi DENV2	+	+	+	+	90,1	93,3	91,5	90,6	IgG ₁
D32-2H8G1				+	+	+	+	86,3	93,3	93,6	94,2	IgG ₁

Các Bảng 6 cho thấy kết quả tóm tắt về các trình tự của các HuMAb. Các vùng biến đổi của IgG trong 18 HuMAb riêng biệt ở trên, CDR1, CDR2, và CDR3 được tạo dòng và được sắp xếp theo trình tự.

Bảng 6.1 (A) Các trình tự axit amin được suy ra của các CDR trong chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của 18 HuMAb

Dòng HuMAb	CDR1 ^a	CDR2 ^a	CDR3 ^a
D23-1A 10H7	NYAIS (SEQ ID:No. 1) RASQGSNAVA (SEQ ID:No. 100)	GVPTLHITNYVERFQG (SEQ ID:No. 2) GASRLER (SEQ ID:No. 101)	SRYYYSIDASNYGMDV (SEQ ID:No. 3) QQYSSIPYT (SEQ ID:No. 102)
D23-1 B3B9	RYIMN (SEQ ID:No. 4) ASSTGAVTSGHYAN (SEQ ID:No. 103)	WIDTKTGNPTYAQAFT (SEQ ID:No. 5) RTDKKHS (SEQ ID:No. 104)	TLSGYSADWPEDY (SEQ ID:No. 6) LLYRDGGVV (SEQ ID:No. 105)
D23-1 C1G4	SYGVS (SEQ ID:No. 7) SGSSSNIGNNYVY (SEQ ID:No. 106)	WISAYNGDYTNFAQKFQG (SEQ ID:No. 8) SNNQRPS (SEQ ID:No. 107)	GPDYESSDSPWFYD (SEQ ID:No. 9) ATWDDSLSRPV (SEQ ID:No. 108)
D23-1 C2D2	SYTWS (SEQ ID:No. 10) QASQDIKNHLN (SEQ ID:No. 109)	NFHYSGSTNDNPSLKS (SEQ ID:No. 11) DASNLGT (SEQ ID:No. 110)	VAKLFGSATYGMIDV (SEQ ID:No. 12) HQYENLPTI (SEQ ID:No. 111)
D23-1 G7C2	TYAIS (SEQ ID:No. 13) TGTSQDVGGDSLVS (SEQ ID:No. 112)	GIPLYKQSTYAQKFRG (SEQ ID:No. 14) EDHKRPS (SEQ ID:No. 113)	LIAVAGSEAGGSFDI (SEQ ID:No. 15) CSYAISSVRVL (SEQ ID:No. 114)

^a Các trình tự trên và trình tự dưới chỉ ra các CDR của các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ

Bảng 6.2 (A) Các trình tự axit amin được suy ra của các CDR trong chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của 18 HuMab

D23-1 H5A11	TYAMS (SEQ ID:No. 16) SGSSNIGSNFVY (SEQ ID:No. 115)	GIGDSGHSIYYADSVKG (SEQ ID:No. 17) SDNQRPS (SEQ ID:No. 116)	GSQWPGDY (SEQ ID:No. 18) ATWDDSLSGPV (SEQ ID:No. 117)
D23-3 A10G12	NYAMT (SEQ ID:No. 19) SGSSNIANNYYVY (SEQ ID:No. 118)	AIGSGHSIYYGDSVKG (SEQ ID:No. 20) STNQRPS (SEQ ID:No. 119)	GSQWPGDY (SEQ ID:No. 21) AAWDDSLSAPL (SEQ ID:No. 120)
D23-4 A6F9	SNAMS (SEQ ID:No. 22) RASQGSSWLA (SEQ ID:No. 121)	GVNSGGDTYYADSVKGR (SEQ ID:No. 23) ATSSLQS (SEQ ID:No. 122)	TLWTVGSKGGFDY (SEQ ID:No. 24) QQANSFPWT (SEQ ID:No. 123)
D23-4 F5E1	NSAMS (SEQ ID:No. 25) RSSQTILYSSNNNNYLA (SEQ ID:No. 124)	AFSGGGSTYYADSVKG (SEQ ID:No. 26) WASTRES (SEQ ID:No. 125)	VTGGWSDY (SEQ ID:No. 27) QQYYSSPPT (SEQ ID:No. 126)
D23-4 H12C8	TYPMN (SEQ ID:No. 28) ASSTGAVTSGYYPN (SEQ ID:No. 127)	WIDTNTGNPTIYAQAFTG (SEQ ID:No. 29) STSSKHS (SEQ ID:No. 128)	LSGYSADWPEDY (SEQ ID:No. 30) LLYYRGGVV (SEQ ID:No. 129)
D23-5 E6B1	RYTMN (SEQ ID:No. 31) ASSTGAVTSGNYAN (SEQ ID:No. 130)	WIDTKTGNPTIYAQAFTG (SEQ ID:No. 32) RTDKKHS (SEQ ID:No. 131)	LSGYSADWPEDY (SEQ ID:No. 33) LLYRDGGVV (SEQ ID:No. 132)
D23-5 G2D2	KYAIN (SEQ ID:No. 34) RASQGNNSLA (SEQ ID:No. 133)	GHPLITTTIYAQRFG (SEQ ID:No. 35) AASRLHS (SEQ ID:No. 134)	STYYDGSDDLTYGMDV (SEQ ID:No. 36) QQYYSIPT (SEQ ID:No. 135)

^a Các trình tự trên và trình tự dưới chỉ ra các CDR của các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ

Bảng 6.3 (A) Các trình tự axit amin được suy ra của các CDR trong chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của 18 HuMAb

D23-5 G8E3	DYAMH (SEQ ID:No. 37) TGNSSNIGAGYDVH (SEQ ID:No. 136)	VISHVGTSTYQAESYYA (SEQ ID:No. 38) SNTNRPS (SEQ ID:No. 137)	YYCARRGDYSSSAENFQH (SEQ ID:No. 39) QSYDSSLFACV (SEQ ID:No. 138)
D30-1 E7B8	NYAIS (SEQ ID:No. 40) RASQSVSSYL (SEQ ID:No. 139)	AIPMSRTIDYAQKFRG (SEQ ID:No. 41) DASNRAT (SEQ ID:No. 140)	HRVAGGDSHDENNWFPG (SEQ ID:No. 42) QQRDNWPTY (SEQ ID:No. 141)
D30-3 A1E2	DYYMI (SEQ ID:No. 43) TGRSSNIGAGHDVH (SEQ ID:No. 142)	YISNSGDMTYHADSVKG (SEQ ID:No. 44) GNNIRPS (SEQ ID:No. 143)	GMTGFTTSNTESFDL (SEQ ID:No. 45) QSYDGSLSGLV (SEQ ID:No. 144)
D30-3 B6C7	GSSFY (SEQ ID:No. 46) ASSTGAVTSDYFPN (SEQ ID:No. 145)	IGSIDYRGNTYYNPSLKS (SEQ ID:No. 47) HTGKKHS (SEQ ID:No. 146)	PGGLISDEAMAGYFDY (SEQ ID:No. 48) LLYHVD AHLV (SEQ ID:No. 147)
D32-2 D1G5	SYSSIS (SEQ ID:No. 49) TGSSRDFGDYDHVS (SEQ ID:No. 148)	GTIPFGRASYAQKFQG (SEQ ID:No. 50) DVTKRPS (SEQ ID:No. 149)	AGPIAATGVQYEMDV (SEQ ID:No. 51) CSYAGSYTWV (SEQ ID:No. 150)
D32-2 H8G1	SSGMH (SEQ ID:No. 52) RASQNI AKYLN (SEQ ID:No. 151)	VVSFDGSKTYADSAKG (SEQ ID:No. 53) AASSLQS (SEQ ID:No. 152)	GGGRFSGSGNYYYGMDV (SEQ ID:No. 54) LQITYTAPLT (SEQ ID:No. 153)

^a Các trình tự trên và trình tự dưới chỉ ra các CDR của các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ

FIG.7 thể hiện tóm tắt các hoạt tính VN và ADE của 18 HuMAb với bốn kiểu huyết thanh của DENV. Các tác giả sáng chế đã kiểm tra các hiệu giá của 18 HuMAb được chọn ở trên bằng thử nghiệm IF gián tiếp, thử nghiệm VN, và thử nghiệm ADE. Lượng đủ các HuMAb được tinh chế sắc ký cột protein G từ các dịch nuôi cấy dòng tế bào lai riêng biệt đã được làm thích nghi với môi trường không có huyết thanh và được nuôi cấy với quy mô lớn. Cho các dãy pha loãng của các HuMAb tinh chế từ các dòng tế bào lai riêng biệt phản ứng với DENV-1 đến DENV-4. Sử dụng các dãy pha loãng 2 lần từ 25,0 microgam/ml cho phản ứng với các protein của virus trong các tế bào vero bị nhiễm nhờ thử nghiệm IF gián tiếp. Sử dụng các độ pha loãng thấp nhất của các HuMAb với các kiểu huyết thanh của DENV riêng biệt cho các hoạt tính gắn kết với protein của virus. Các tác giả sáng chế đã sử dụng E MAb kháng DENV của chuột 4G2 với vai trò là mẫu đối chứng dương tính và PBS và 5E4 HuMAb của IgG1 được điều chế bởi các PBMC của người cho được tiêm vắc-xin phòng bệnh cúm và cho thấy mức trung hòa mạnh đối với virus cúm A H1N1 2009 (theo tác giả Yasugi và các cộng sự, chưa được công bố) làm các mẫu đối chứng âm tính. Như được thể hiện trong FIG.5, nhận thấy các hoạt tính gắn kết với DENV ở tất cả 18 HuMAb mạnh hơn so với 4G2, đặc biệt là với DENV-1 và DENV-2, D23-5G8E3 đã cho thấy hoạt tính thấp hơn một chút đối với DENV-3 và DENV-4, và D23-4H12C8 đã cho thấy hoạt tính thấp hơn một chút đối với DENV-4, so với các hoạt tính với 4G2. Tiếp theo, sử dụng các dãy pha loãng 2 lần của các HuMAb cho hiệu giá gắn kết IF và hiệu giá VN50 (FIG.7) với từng DENV-1 đến DENV-4 riêng biệt trong các tế bào vero. Ngoài ra, thực hiện thử nghiệm ADE cho các HuMAb với các tế bào THP-1 đối với các kiểu huyết thanh riêng biệt của DENV. FIG.7 cho thấy các hoạt tính của các HuMAb riêng biệt với các nồng độ nằm trong khoảng từ 25,0 đến 0,20 microgam/ml theo dãy pha loãng 2 lần từ 25,0 microgam/ml đối với thử nghiệm VN với DENV-2 trong các tế bào vero và với các nồng độ nằm trong khoảng từ 10,0 đến 0,0001 microgam/ml theo dãy pha loãng 10 lần từ 10,0 microgam/ml đối với thử nghiệm ADE với DENV-2 trong các tế bào THP-1. Với vai trò là các mẫu đối chứng, các tác giả sáng chế đã sử dụng MAb của chuột 4G2 làm mẫu đối chứng dương tính và MAb chống bệnh cúm của người 5E4 làm mẫu đối chứng âm tính. Các kết quả

đối với VN và ADE được thể hiện trong các HuMAb riêng biệt. Mặc dù các nồng độ HuMAb cho thấy hoạt tính ADE cao nhất là khác nhau, nhưng tất cả các HuMAb đã cho thấy các hoạt tính ADE. Trong FIG.8, các mẫu có hoạt tính ADE đối với các HuMAb đại diện D23-1B3B9 và D23-1G7C2 được thể hiện. Với vai trò là kháng thể đối chứng, các tác giả sáng chế đã sử dụng MAb của chuột 4G2. Đáng quan tâm là, các hoạt tính ADE của các HuMAb này đối với DENV-1 thì thấp hơn so với hoạt tính đối với 4G2 và các hoạt tính ADE đối với DENV-2 và DENV-4 thì gần như tương tự với hoạt tính đối với 4G2. Hầu như là không có các hoạt tính ADE của các HuMAb đối với DENV-1, tương tự như 4G2. Số liệu ở trên thu được bằng cách sử dụng các chủng đại diện trong phòng thí nghiệm thuộc bốn kiểu huyết thanh riêng biệt của DENV. Tiếp đó, các tác giả sáng chế đã kiểm tra độ phản ứng của 18 HuMAb với tổng cộng 20 phân lập lâm sàng, nghĩa là, năm phân lập lâm sàng trong mỗi kiểu huyết thanh của DENV, được điều chế từ các mẫu máu của các bệnh nhân vào năm 2007 đến 2010 (Bảng 7). Độ phản ứng của các HuMAb trong các dịch nuôi cấy tế bào lai riêng biệt cho 20 phân lập lâm sàng này đã được kiểm tra nhờ thử nghiệm IF gián tiếp (Bảng 7). Tất cả các HuMAb đã cho thấy tính phản ứng với tất cả các phân lập lâm sàng được xem xét, mặc dù D23-1C1G4 đối với DV1-1 đến -5 và D23-1C1G4 và D23-1H5A11 đối với DV4-3 đã cho thấy tính phản ứng yếu. Khi các tác giả xem xét một cách tương đối các giới hạn phát hiện bằng thử nghiệm IF (FIG.9) và VN50 (FIG.10) của ba HuMAb đại diện, D23-1A10H7, D23-1B3B9, và D23-1G7C2 đối với các phân lập lâm sàng này, thì các kết quả đã cho thấy các hoạt tính về cơ bản là mạnh với cả hai hoạt tính theo thử nghiệm IF (FIG.9) và thử nghiệm VN (FIG.10) so với DENV-2, 16681 được đối chứng (các FIG.5 và 6).

Bảng 7. Kết quả tóm tắt về tính phản ứng của các HuMAb với các phản lập lâm sàng DENV theo thử nghiệm IF gián tiếp a

Kiểu huyết thành của DV			Phản lập lâm sàng	Năm phản lập	D23														D30				D32	
					1A 10H7	1B 3B9	1C 1G4	1C 2D2	1G 7C2	1H 5A11	3A 10G12	4A 6F9	4F 5E1	4H 12C8	5E 6B1	5G 2D2	5G 8E3	1E 7B8	3A 1E2	3B 6C7	2D 1G5	2H 8G1		
DV1	DV1-1	2007	+	+	Yếu	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
	DV1-2	2008	+	+	Yếu	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
	DV1-3	2008	+	+	Yếu	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
	DV1-4	2008	+	+	Yếu	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
	DV1-5	2008	+	+	Yếu	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
DV2	DV2-1	2008	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
	DV2-2	2008	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
	DV2-3	2008	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
	DV2-4	2008	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
	DV2-5	2009	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
DV3	DV3-1	2008	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
	DV3-2	2008	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
	DV3-3	2008	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
	DV3-4	2009	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
	DV3-5	2010	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
DV4	DV4-1	2007	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
	DV4-2	2007	+	+	Yếu	+	+	+	Yếu	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
	DV4-3	2008	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
	D4-4	2008	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
	D4-5	2008	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				

a Dịch môi cấy hybridoma sản xuất các HuMAb được sử dụng cho các tính phản ứng với các tế bào Vero bị nhiễm bởi từng phản lập lâm sàng và được cố định bởi glutaraldehyt theo thử nghiệm IF gián tiếp

FIG.1 minh họa tóm tắt về các HuMAb và tính phản ứng chéo đối với DENV-1 đến DENV-4 trong các thử nghiệm IF và VN. Tổng cộng 121 HuMAb trong pha cấp tính và 15 HuMAb trong pha dưỡng bệnh đã được kiểm tra về tính phản ứng chéo và tính trung hòa chéo đối với các kiểu huyết thanh của DENV trong các thử nghiệm IF và VN, theo tương ứng. Sử dụng các dịch nuôi cấy dòng tế bào lai sản xuất HuMAb. Các HuMAb được phân loại thành các nhóm 1 đến 10 và các nhóm A đến X theo tính phản ứng chéo của chúng đối với bốn kiểu huyết thanh của DENV trong thử nghiệm IF và thử nghiệm VN, theo tương ứng. Các nhóm riêng biệt được thể hiện bằng các màu sắc khác nhau. Các tế bào vero do từng kiểu DENV-1 đến DENV-4 gây nhiễm riêng biệt được sử dụng làm các tế bào đích trong các thử nghiệm này. Số liệu thu được từ thử nghiệm VN được thể hiện qua mức độ trung hòa (mức trung hòa "-", <50%; "+", 50% đến <90%; và "++", 90%).

FIG.2 minh họa việc biểu diễn các tỷ lệ phần trăm của các HuMAb thu được từ những bệnh nhân riêng biệt theo tỷ lệ chéo của chúng với DENV-1 đến DENV-4 bằng các thử nghiệm IF và VN. Tổng cộng 121 HuMAb trong pha cấp tính (75 từ D23, 25 từ D30, năm từ D32, và 16 từ D33) và 15 HuMAb trong pha dưỡng bệnh (bốn từ D22, năm từ D25, hai từ D26, hai từ D27, và hai từ D28) đã được kiểm tra về tính phản ứng chéo của chúng và tính trung hòa chéo đối với bốn kiểu huyết thanh của DENV. Các dịch nuôi cấy dòng tế bào lai riêng biệt sản xuất HuMAb được sử dụng cho các thử nghiệm này. Các HuMAb được phân loại thành các nhóm 1 đến 10 và các nhóm A đến X theo tính phản ứng chéo của chúng với bốn kiểu huyết thanh của DENV như được đánh giá tương ứng bằng thử nghiệm IF và thử nghiệm VN. Các nhóm riêng biệt được thể hiện bằng các màu sắc khác nhau. Các tế bào vero do từng kiểu DENV-1 đến DENV-4 gây nhiễm riêng biệt được sử dụng làm các tế bào đích trong các thử nghiệm này. Số liệu thu được từ các thử nghiệm VN được thể hiện qua mức độ trung hòa (mức trung hòa "+", 50% đến <90%; và "++", 90%).

FIG.3 thể hiện các mẫu nhuộm màu của các HuMAb bằng thử nghiệm IF. Các HuMAb trong các dịch nuôi cấy dòng tế bào lai sản xuất các kháng thể đặc hiệu với kiểu huyết thanh của DENV (D28-2B11D10 trong nhóm 1 và D23-4A7D6 trong nhóm 2), các kháng thể phản ứng chéo với hai kiểu huyết thanh (D28-2B11F9 trong nhóm 3

và D23-1B11A5 trong nhóm 4), và các kháng thể phản ứng chéo với ba kiểu huyết thanh (D25-4D3D2 trong nhóm 7 và D23-3E6D7 trong nhóm 8), và các kháng thể phản ứng chéo với tất cả bốn kiểu huyết thanh (D22-1B7G2 trong nhóm 10) được sử dụng cho thử nghiệm IF. Các tế bào vero do PBS gây nhiễm giả hoặc do từng kiểu DENV-1 đến DENV-4 gây nhiễm riêng biệt được sử dụng làm các tế bào đích. MAb của chuột kháng protein E của flavivirus 4G2 được sử dụng làm mẫu đối chứng dương tính.

FIG.4 thể hiện mối tương quan giữa các kết quả của thử nghiệm IF và VN. Tổng cộng 121 HuMAb trong pha cấp tính và 15 HuMAb trong pha dưỡng bệnh được thể hiện một cách riêng biệt để làm nổi bật sự tương quan giữa IF và VN (mức trung hòa "-", <50%; "+", 50% đến <90%; và "++", 90%) theo tính phản ứng chéo của chúng với các kiểu huyết thanh của DENV khác nhau (các nhóm 1 đến 10 theo thử nghiệm IF và các nhóm A đến X theo thử nghiệm VN). Tác giả sáng chế sử dụng các dịch nuôi cấy dòng tế bào lai sản xuất HuMAb. Các nhóm riêng biệt được thể hiện bằng các màu sắc khác nhau, như trong FIG.1. Các tế bào vero do từng kiểu DENV-1 đến DENV-4 gây nhiễm riêng biệt được sử dụng làm các tế bào đích trong các thử nghiệm này.

FIG.5 thể hiện các giới hạn gắn kết của 18 HuMAb với bốn kiểu huyết thanh của DENV bằng thử nghiệm IF gián tiếp. Gây nhiễm các tế bào vero trong đĩa vi thể 96 giếng bởi DENV. Sau khi ủ trong 2 ngày, cố định các tế bào này bằng focmandehyt, sau đó cho chúng phản ứng với dãy pha loãng 10 lần của các HuMAb riêng biệt đã qua tinh chế (10,0 microgam/ml). Theo hiệu giá về tính phản ứng đối với các kiểu huyết thanh riêng biệt của DENV nhờ thử nghiệm IF gián tiếp, nồng độ kháng thể cuối cùng cho thấy phản ứng dương tính được thể hiện trong hình.

FIG.6 thể hiện hoạt tính VN của 18 HuMAb với bốn kiểu huyết thanh của DENV. Gây nhiễm các tế bào vero trong đĩa vi thể 96 giếng bởi các kiểu huyết thanh riêng biệt của DENV đã được ủ với các dãy pha loãng 2 lần của các HuMAb tinh chế (25,0 microgam/ml) ở 37°C trong 30 phút, và ủ các tế bào này ở 37°C qua đêm. Cuối cùng, cố định các tế bào này và phát hiện ra các tế bào bị nhiễm bằng thử nghiệm IF nhờ 4G2.

Các FIG.7 thể hiện các hoạt tính VN và ADE của 18 HuMAb với DENV-2.

Đối với thử nghiệm VN, gây nhiễm các tế bào vero bởi DENV2 (chủng 16681) mà đã được ủ với dãy pha loãng 2 lần của các HuMAb tinh chế (25,0 microgam/ml) ở 37°C trong 30 phút, và ủ các tế bào này ở 37°C qua đêm. Cuối cùng, cố định các tế bào này và phát hiện ra các tế bào bị nhiễm bằng thử nghiệm IF nhờ 4G2. Đối với thử nghiệm ADE, gây nhiễm các tế bào THP-1 bởi DENV-2 (chủng 16681) đã được ủ với dãy pha loãng 10 lần của các HuMAb tinh chế (10,0 microgam/ml) ở 37°C trong 30 phút, sau đó ủ các tế bào này trong 3 ngày. Chiết ARN tổng số từ các tế bào bị nhiễm và đưa lượng ARN này vào quy trình PCR thời gian thực một bước để định lượng số bản sao gen của virus. Đường màu xanh lá cây thẳng đứng biểu thị 1 microgam/ml của HuMAb trong cả hai số liệu cơ bản về các kết quả VN và ADE. Đường màu đỏ nằm ngang trong các số liệu về các kết quả ADE biểu thị mức cơ sở (x1) trong trong mẫu đối chứng (PBS). FIG.7-1 cho thấy 4G2, 5E4, D23-1A10H7 và D23-1B3B9. FIG.7-2 cho thấy D23-1C2D2, D23-1G7C2, D23-1H5A11 và D23-3A10G2. FIG.7-3 cho thấy D23-4A6F9, D23-4F5E1, D23-4H12C8 và D23-5E6B1. FIG.7-4 cho thấy D23-5G2D2, D23-5G8E3, D23-1C1G4 và D30-1E7B8. FIG.7-5 cho thấy D30-3A1E2, D30-3B6C7, D32-2D1G5 và D32-2H8G1.

FIG.8 thể hiện hoạt tính ADE của hai HuMAb đại diện đối với bốn kiểu huyết thanh của DENV. Đối với các thử nghiệm ADE, bốn kiểu huyết thanh của DENV (Chủng Mochizuki của DENV-1; chủng 16681 của DENV-2; chủng H87 của DENV-3; và chủng H241 của DENV-4) được sử dụng như trong FIG.7. Thực hiện gây nhiễm với giá trị MOI (số lượng hạt virus trung bình gây nhiễm mỗi tế bào) là 0,05.

FIG.9 thể hiện hoạt tính gắn kết IF của các HuMAb đại diện với các phân lập lâm sàng của DENV. Các HuMAb đại diện, D23-1A10H7, D23-1B3B9, và D23-1G7C2 đã được kiểm tra về giới hạn phát hiện bằng thử nghiệm IF với các phân lập lâm sàng DV1-1 đến DV1-5, DV2-1 đến DV2-5, DV3-1 đến DV3-5, và DV4-1 đến DV4-5.

FIG.10 thể hiện hoạt tính VN của các HuMAb đại diện đối với các phân lập lâm sàng của DENV. Các HuMAb đại diện, D23-1A10H7, D23-1B3B9, và D23-1G7C2 đã được kiểm tra đối với thử nghiệm VN50 với các phân lập lâm sàng DV1-1 đến DV1-5, DV2-1 đến DV2-5, DV3-1 đến DV3-5, và DV4-1 đến DV4-5.

FIG.11 thể hiện các kết quả về hiệu quả điều trị *in vivo* của các HuMAb ở chuột con đang bú mẹ.

FIG.12 thể hiện các ví dụ về những hình ảnh trong Thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang của mẫu đối chứng dương tính, mẫu đối chứng âm tính, các dòng tế bào lai DMSc-17, DMSc-14 và DMSc-36.

FIG.13 thể hiện sự minh họa với 22 dòng cho thấy sự giảm VN đối với DENV1, DENV2, DENV3, DENV4 cao hơn 80%. Tất cả các dòng đã cho thấy VN với DENV1 và DENV2 cao hơn 90%. Mười dòng đã cho thấy VN với DENV3 và 16 dòng đã cho thấy VN với DENV4 cao hơn 90%.

Tiếp theo, xem xét các HuMAb để trung hòa DENV-1 đến DENV-4 theo thử nghiệm *in vivo* như trên về tính hiệu quả điều trị *in vivo* của chúng bởi mô hình động vật bằng cách sử dụng chuột con đang bú mẹ. Chuột (n=10) được tiêm trong não với các HuMAb đại diện, D23-1B3B9 và D23-1G7C2 (1 microgam hoặc 0,2 microgam mỗi con) đã được được ủ với 20,000 FFU của DENV-2 16681 mỗi con trong 30 phút dưới điều kiện băng giá. Sử dụng PBS thay cho dung dịch chứa HuMAb làm mẫu đối chứng âm tính. Thời gian quan sát 25 ngày, một trong 10 con chuột được xử lý bởi các HuMAb đã bị chết, mặc dù tất cả những con chuột được xử lý bởi PBS đã bị chết khoảng 13 đến 15 ngày sau khi tiêm truyền virus (FIG.11).

Tổng cộng 136 dòng tế bào lai sản xuất các HuMAb đặc hiệu đối với DENV thu được bằng cách sử dụng các PBMC của chín mẫu máu của tám bệnh nhân. Bốn bệnh nhân ở pha cấp tính đều bị nhiễm thứ phát bởi DENV-2. Những mẫu này đã tạo ra một cách hiệu quả các tế bào lai sản xuất đặc hiệu và các HuMAb mạnh [121 dòng: 99 nhận dạng E, tám nhận dạng prM, bốn nhận dạng NS1, không có dòng nào nhận dạng C, và 10 nhận dạng (các) protein của virus khác chưa biết], so với các dòng từ năm bệnh nhân ở pha dưỡng bệnh (15 dòng: hai nhận dạng E, hai nhận dạng prM, tám nhận dạng NS1, không có dòng nào nhận dạng C, và ba nhận dạng các protein chưa biết khác). Ngoài ra, 90,1% (109/121) trong số các dòng HuMAb ở pha cấp tính thì phản ứng chéo với tất cả bốn kiểu huyết thanh của DENV bằng thử nghiệm IF. Hầu hết các dòng này (88,1%; 96/109) đã nhận dạng protein E của virus, trong khi chỉ 7,3% (8/109) đã nhận dạng prM, 0,9% (1/109) đã nhận dạng NS1, và 3,7% (4/109) đã nhận

dạng các protein virus khác mà không được nhận dạng trong nghiên cứu này. Ngược lại, 46,7% (7/15) trong số các HuMAb ở pha dưỡng bệnh thì phản ứng chéo với tất cả bốn kiểu huyết thanh của DENV bằng thử nghiệm IF: 28,6% (2/7) đã nhận dạng E, 28,6% (2/7) đã nhận dạng prM, 28,6% (2/7) đã nhận dạng NS1, và 14,3% (1/7) đã nhận dạng các protein chưa biết khác. Các thử nghiệm VN cũng đã bộc lộ rằng một tỷ lệ lớn hơn của các HuMAb được điều chế từ các PBMC ở pha cấp tính là có thể trung hòa tất cả bốn kiểu huyết thanh của DENV [57,9% (70/121) các dòng ở pha cấp tính, so với 6,7% (1/15) các dòng ở pha dưỡng bệnh]. Các kháng thể ở pha cấp tính đã cho thấy tính phản ứng chéo phức tạp với tất cả bốn kiểu huyết thanh của DENV, với hoạt tính VN mạnh hơn nhiều không chỉ kháng lại DENV-2, đang sao chép ở bệnh nhân, mà còn kháng lại các kiểu huyết thanh của DENV khác và kháng lại JEV. Đáng chú ý là, 18 dòng tế bào lai mà được chọn làm nguồn sản xuất các HuMAb để trung hòa tất cả bốn kiểu huyết thanh của DENV với các tỷ lệ cao hơn có đặc tính tương tự: hoạt tính gắn kết mạnh hơn với kháng nguyên DENV và hoạt tính VN mạnh hơn với tất cả bốn kiểu huyết thanh của DENV so với MAb trung hòa của chuột 4G2 đối chứng; và các hoạt tính ADE với DENV-1 đến DENV-4 thấp hơn so với 4G2.

Có nhiều lựa chọn về các phương pháp điều chế các HuMAb: nhân tính hóa các MAb ở chuột, tạo thể khảm của các MAb ở người và chuột, điều chế HuMAb bằng cách hiển thị thể thực khuẩn, bất tử hóa các tế bào sản xuất kháng thể bởi EBV, và dung hợp tế bào với tế bào cho các tế bào sản xuất kháng thể của người với các tế bào u tủy (Marasco et al., Nat Biotech 25: 1421-1434 (2007)). Trong nghiên cứu này, tác giả sáng chế sử dụng quy trình dung hợp tế bào với các tế bào đối tác dung hợp mới được phát triển gần đây, được gọi là các tế bào SPYMEG, mà với các tế bào này nhiều tác giả cũng đã điều chế một vài HuMAb kháng lại virus gây bệnh cúm theo mùa từ những tình nguyện viên khỏe mạnh được tiêm truyền bởi vắc xin cúm (Kubota-Koketsu et al., Biochem Biophys Res Commun 387: 180-185 (2009)). Vì vậy, quy trình này có thể cho phép sản sinh các HuMAb với tỷ lệ cao.

Các mẫu PBMC trong nghiên cứu này được thu thập từ các bệnh nhân ở pha cấp tính (5-8 ngày sau khi khởi phát sốt) hoặc ở pha dưỡng bệnh (12-19 ngày đối với pha dưỡng bệnh) bị nhiễm thứ phát. Nghiên cứu này đã cho phép các tác giả sáng chế

so sánh hiệu quả của các HuMAb thu được ở từng giai đoạn. Từ các PBMC ở pha cấp tính, thu được các HuMAb với 81,8% kháng E, 6,6% kháng prM, và 3,3% kháng NS1, trong khi các HuMAb với 13,3% kháng E, 13,3% kháng prM, và 53,3% kháng NS1 thu được từ các PBMC ở pha dưỡng bệnh. Một số nhóm đã sử dụng các PBMC của pha dưỡng bệnh, mà không phải của pha cấp tính ở các bệnh nhân để điều chế các HuMAb bằng cách bất tử hóa các tế bào B có nguồn gốc từ bệnh nhân bởi EBV. Dejnirattisai et al. (Dejnirattisai et al., *Science* 328: 745-748 (2010)) đã điều chế các HuMAb kháng E và kháng prM bằng cách sử dụng các tế bào B từ 7 bệnh nhân bị nhiễm DENV 15-24 ngày sau khi giảm sốt. Các tác giả này đã nhận thấy rằng 89% các HuMAb kháng E thì phản ứng chéo với tất cả bốn kiểu huyết thanh. Đáng bất ngờ là, các nghiên cứu của họ đã dẫn đến việc điều chế nhiều HuMAb kháng prM hơn so với HuMAb kháng E. Các HuMAb kháng prM thì cũng có tính phản ứng chéo cao với tất cả bốn kiểu huyết thanh của DENV (94%) và ADE được xúc tiến có hiệu lực. Trái ngược với các HuMAb kháng E (mà đã thể hiện tính phản ứng chéo 64%), chỉ 3% trong số các HuMAb kháng prM phản ứng chéo với JEV. Cũng bằng cách sử dụng phương pháp bất tử hóa, theo tác giả Beltramello và các cộng sự (Beltramello et al., *Cell Host Microbe* 8: 271-283 (2010)) đã sử dụng các tế bào B của ba bệnh nhân bị nhiễm nguyên phát vào lúc 200 ngày đến 8 năm sau khi nhiễm và của hai bệnh nhân bị nhiễm thứ phát vào lúc 212-510 ngày sau khi nhiễm. Do vùng III của protein E là đích chính của các kháng thể trung hòa ở chuột kháng flavivirus (theo tác giả Oliphant và các cộng sự, *J Virol* 81: 11828-11839 (2007)), các tác giả này cũng đã thực hiện xét nghiệm rộng rãi để đạt được những hiểu biết thấu đáo về tính đặc hiệu vùng và tính phản ứng chéo của các kháng thể đặc hiệu thuộc vùng III của protein E được phân lập từ hai bệnh nhân, một người bị nhiễm nguyên phát (người cho 13) và người kia bị nhiễm thứ phát (người cho 12). Từ người cho 13, 18 trong số 152 HuMAb đã phản ứng với vùng III (13 đặc hiệu theo kiểu, một phản ứng chéo với ba kiểu huyết thanh, và bốn phản ứng chéo với tất cả bốn kiểu huyết thanh). Từ người cho 12, 138 trong số 313 HuMAb đã phản ứng với vùng III (44 đặc hiệu theo kiểu, 31 phản ứng chéo với hai hoặc ba kiểu huyết thanh, và 63 phản ứng chéo với tất cả bốn kiểu huyết thanh). Một nghiên cứu của tác giả de Alwis và các cộng sự (de Alwis et al., *PLoS Negl Trop Dis* 5: e1188 (2011)) đã cho biết việc điều chế các HuMAb kháng DENV bằng cách sử

dụng các tế bào B ghi nhớ của hai bệnh nhân đã bị nhiễm bởi DENV 1-8 năm trước đây. Hầu hết các HuMAb mà các tác giả này thu được thì trung hòa yếu và không nhận dạng protein E. Vì vậy, hiệu quả của việc điều chế các HuMAb trung hòa phản ứng chéo phức tạp với DENV là cao hơn đáng kể trong các trường hợp nhiễm thứ phát. Thực vậy, theo tác giả Beltramello và các cộng sự đã phân biệt các HuMAb thành hai loại: các HuMAb mà nhận dạng vùng III của E DENV và cho thấy hoạt tính trung hòa phản ứng chéo phức tạp, và các HuMAb mà nhận dạng vùng I/vùng II và phản ứng chéo phổ biến hơn nhưng thể hiện hoạt tính trung hòa thấp hơn. Hơn nữa, số liệu của các tác giả trong nghiên cứu này là bước đầu tiên để cho biết hiệu quả của việc sử dụng các PBMC của các bệnh nhân ở pha cấp tính để điều chế các HuMAb với hoạt tính VN mạnh kháng lại tất cả bốn kiểu huyết thanh của DENV theo thử nghiệm bằng cách sử dụng các tế bào vero.

Thật bất ngờ khi phát hiện ra rằng các PBMC ở pha cấp tính thì hiệu quả hơn khi sản xuất các HuMAb đặc hiệu với DENV so với các PBMC ở pha dưỡng bệnh, bởi vì các hiệu giá kháng thể trung hòa có xu hướng cao hơn một chút ở các bệnh nhân trong pha dưỡng bệnh. Phát hiện này cũng tương tự như các kết quả nghiên cứu của tác giả Wrammert và các cộng sự (Wrammert et al., *Nature* 453: 667-671 (2008)), họ đã chứng minh một hiện tượng tương tự về các HuMAb kháng lại virus gây bệnh cúm ở những người cho được tiêm vaccin. Nghiên cứu đó đã phát hiện mức cảm ứng nhanh và mạnh của các tế bào huyết tương tiết kháng thể IgG+ đặc hiệu với bệnh cúm, chiếm tới 6% trong số các tế bào B trong máu ngoại vi tại pic (đỉnh) đáp ứng, khoảng chừng 7 ngày sau khi tiêm vaccin. Tuy nhiên, các tế bào B ghi nhớ IgG+ đặc hiệu với bệnh cúm đã giảm xuống trung bình 1% trong số tất cả các tế bào B vào khoảng 14-21 ngày sau khi tiêm vaccin. Nhìn chung, các báo cáo cho thấy sự khác biệt về kiểu hình của tế bào B giữa các bệnh nhân ở pha cấp tính và pha dưỡng bệnh mắc các bệnh nhiễm (theo tác giả Leyendeckers và các cộng sự, *Eur J Immunol* 29: 1406-1417 (1999)).

Do đó, nhiều HuMAb cho thấy có thể đạt được hoạt tính trung hòa ở pha cấp tính. Ngoài ra, thử nghiệm VN về các HuMAb thu được trong nghiên cứu này đã phân loại chúng thành các nhóm không đồng nhất: các HuMAb đặc hiệu với kiểu huyết thanh và các HuMAb phản ứng chéo với hai, ba, và tất cả bốn kiểu huyết thanh của

DENV. Các HuMAb này cũng sẽ rất hữu ích làm các cực dò để hiểu được các cơ chế phức tạp mà qua đó các kháng thể giống nhau gián tiếp gây ra sự trung hòa và ADE của các kiểu huyết thanh khác loại của DENV. Các nghiên cứu thêm nữa về lập bản đồ epitop của các HuMAb này sẽ giúp làm sáng tỏ vấn đề quan trọng này.

Toàn bộ 18 HuMAb đã cho thấy mức trung hòa mạnh, cao hơn nhiều đối với tất cả bốn kiểu huyết thanh của DENV so với 4G2 mà các tác giả sáng chế đã sử dụng làm mẫu đối chứng dương tính từ protein E kháng DENV của chuột. Ngược lại, các HuMAb này đã cho thấy các hoạt tính ADE với DENV-1 đến DENV-4 là thấp hơn nhiều so với 4G2. Về cơ bản, các hoạt tính VN của các HuMAb này thì tương tự nhau ngay cả khi các tác giả sáng chế đã kiểm tra đối với các phân lập lâm sàng của DENV-1 đến DENV-4 ở Thái Lan. Nhiều kháng thể đã cho thấy các hoạt tính VN mạnh hơn so với các hoạt tính với các chủng trong phòng thí nghiệm. Điều này có vẻ là xuất phát từ nguồn gốc các HuMAb, các PBMC của các bệnh nhân đã nhập viện Bệnh viện Y học Nhiệt đới tại Đại học Mahidol từ tháng Bảy đến tháng Tám năm 2010 (theo tác giả Puiprom và các cộng sự, *Biochem Biophys Res Commun* 413: 136-142 (2011)). Các phân lập lâm sàng được điều chế từ mẫu máu của các bệnh nhân đã nhập viện bệnh viện trên từ năm 2007 đến 2010. Do đó, các HuMAb nhận dạng các DENV có vẻ như là rất gần với các phân lập lâm sàng mà các tác giả đã sử dụng trong nghiên cứu này.

Các báo cáo trước đây đã cho thấy rằng các kháng thể từ các trường hợp nhiễm nguyên phát thì đặc hiệu theo kiểu nhiều hơn, trong khi các kháng thể từ các trường hợp nhiễm thứ phát thì khác kiểu hơn và có phạm vi rộng về khả năng phản ứng chéo của chúng với các kiểu huyết thanh khác nhau (theo tác giả Beltramello và các cộng sự, *Cell Host Microbe* 8: 271-283 (2010); theo tác giả Wahala và các cộng sự, *Virology* 392: 103-113 (2009)). 18 HuMAb trong nghiên cứu này tất cả đều có nguồn gốc từ các tế bào lympho sản xuất kháng thể của 3 bệnh nhân ở pha cấp tính bị nhiễm thứ phát bởi DENV-2. Vì không thu được các HuMAb như vậy với hoạt tính VN mạnh hơn từ 5 bệnh nhân ở pha dưỡng bệnh, các kháng thể này có thể nhanh chóng được tạo ra chỉ ở pha cấp tính sau khi nhiễm thứ phát bởi DENV-2, mà điều này có thể đóng vai trò quan trọng là kích thích tăng cường các tế bào lympho miễn dịch. Do đó, tất cả ba

bệnh nhân có thể bị nhiễm nguyên phát bởi kiểu huyết thanh của DENV-2 khác với DENV-2 và do đó các HuMAb được sử dụng trong nghiên cứu này được sản xuất bằng cách mồi các kiểu huyết thanh khác với DENV-2 có vẻ được kích thích tăng cường bởi nhiễm thứ phát do DENV-2. Đáng quan tâm là, D23-1G7C2 mà các tác giả đã sử dụng cho thử nghiệm ADE đối với tất cả bốn kiểu huyết thanh làm đại diện đã cho thấy hoạt tính ADE cao hơn nhiều đối với DENV-2 và hoạt tính ADE cao hơn đối với DENV-4 so với các hoạt tính đối với DENV-1 và DENV-3. Những đặc điểm hoạt tính ADE này với HuMAb này thì rõ ràng là khác với những đặc điểm hoạt tính với MAb của chuột đối chứng, 4G2. Một giả thuyết thú vị khác là vùng epitop được hầu hết các HuMAb nhận dạng trong nghiên cứu này có thể là vùng trung tâm cho việc sản xuất tạm thời các kháng thể trung hòa thông thường trong suốt thời gian tương tác của chúng với tác nhân DENV, bởi vì các HuMAb này có thể không thu được bằng cách dung hợp các PBMC của bất kỳ trong số 5 bệnh nhân ở pha dưỡng bệnh (khoảng 2 tuần sau khi khởi phát bệnh).

Cuối cùng, các tác giả sáng chế đã nhận thấy hiệu quả đầy đủ của HuMAb bằng cách sử dụng D23-1G7C2 và D23-1B3B9 làm đại diện dựa trên khả năng gây chết khi tiêm DENV bằng cách sử dụng chuột con đang bú mẹ. Những nghiên cứu sâu hơn là cần thiết để mô tả đặc điểm những hiệu quả dương tính và âm tính của chúng trong các hệ thống đánh giá *in vivo* khác, như khi đuôi dài, khi đuôi sóc, và chuột (theo tác giả Bernardo và các cộng sự, Clin Vaccine Immunol 16:1829-1831 (2009); tác giả Zompi và các cộng sự, Viruses 4:62-82 (2012); tác giả Sukupolvi-Petty và các cộng sự, J Virol 84: 9227-9239 (2010); tác giả Omatsu và các cộng sự, J Gen Virol 92: 2272-2280 (2011); tác giả Omatsu và các cộng sự, J Med Primatol, in press (2012)) để áp dụng những kết quả nghiên cứu này vào việc phát triển kháng thể điều trị có thể đạt được.

Tài liệu tham khảo

Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Platnev SV, Corver J, Lenches E, Jones CT, Mukhopadhyay S, Chipman PR, Strause EG, Baker TS, Strauss JH (2002) Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. Cell

108: 717-725.

Innis BL, Thirawuth V, Hemachudha C (1989) Identification of continuous epitopes of the envelope glycoprotein of dengue type 2 virus. *Am J Trop Med Hyg* 40: 676-687.

Calisher CH, Karabatsos N, Dalrymple JM, Shope RE, Porterfield JS, Westaway EG, Brandt WE (1989) Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. *J Gen Virol* 70: 37-43.

Braciale TJ, Hahn YS, Burton DR (2006) The adaptive immune response to viruses. In *Fields Virology*, pp. 279-325. Edited by Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA. 5th edition. Lippincott Williams & Wilkins.

van der Schaar HM, Wilschut JC, Smit JM (2009) Role of antibodies in controlling dengue virus infection. *Immunobiology* 214: 613-629.

Sangkawibha N, Rojanasuphot S, Ahandrik S, Viriyapongse S, Jatanasen S, Salitul V, Phanthumachinda B, Halstead SB (1984) Risk factors in dengue shock syndrome: a prospective epidemiologic study in Rayong, Thailand. I. The 1980 outbreak. *Am J Epidemiol* 120: 653-669.

Halstead SB, O'Rourke EJ (1977) Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. *J Exp Med* 146: 201-217.

Diamond MS, Pierson TC, Fremont DH (2008) The structural immunology of antibody protection against West Nile virus. *Immunol Rev* 225: 212-225.

Reiter P (2010) Yellow fever and dengue: a threat to Europe *EuroSurveill* 15: 19509.

Garcia G, Sierra B, Perez AB, Aguirre E, Rosado I, Gonzalez N, Izquierdo A, Pupo M, Diaz DRD, Sanchez L, Marcheco B, Hirayama K, Guzman MG (2010) Asymptomatic dengue infection in a Cuban population confirms the protective role of the RR variant of the Fc RIIa polymorphism. *Am J Trop Med Hyg* 82: 1153-1156.

Harris E, Videz E, Perez L, Sandoval E, Tellez Y, Perez ML, Cuadra R, Rocha J, Idiaquez W, Alonso RE, Delgado MA, Campo LA, Acevedo F, Gonzalez A, Amador JJ, Balmaseda A (2000) Clinical, epidemiologic, and virologic features of dengue in the 1998 epidemic in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg* 63: 5-11.

Beltramello M, Williams KL, Simmons CP, Macagno A, Simonelli L, Quyen NT, Sukupolvi-Petty S, Navarro-Sanchez E, Young PR, de Silva AM, Rey FA, Varani L, Whitehead SS, Diamond MS, Harris E, Lanzavecchia A, Sallusto F (2010) The human

immune response to dengue virus is dominated by highly cross-reactive antibodies endowed with neutralizing and enhancing activity. *Cell Host Microbe* 8: 271-283.

Wahala WMPB, Kraus AA, Haymore LB, Accavitti-Loper MA, de Silva AM (2009) Dengue virus neutralization by human immune sera: role of envelope protein domain III-reactive antibody. *Virology* 392: 103-113.

Schieffelin JS, Costin JM, Nicholson CO, Orgeron NM, Fontaine KA, Isern S, Michael SF, Robinson JE (2010) Neutralizing and non-neutralizing monoclonal antibodies against dengue virus E protein derived from a naturally infected patient. *Virol J* 7: 28.

Dejnirattisai W, Jumnainsong A, Onsirirakul N, Fitton P, Vasanawathana S, Limpitikul W, Puttikhunt C, Edwards C, Duangchinda T, Supasa S, Chawansuntati K, Malasit P, Mongkolsapaya J, Screaton G (2010) Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans. *Science* 328: 745-748.

de Alwis R, Beltramello M, Messer WB, Sukupolvi-Petty S, Wahala WMPB, Kraus A, Olivarez NP, Pham Q, Brian J, Tsai W-Y, Wang W-K, Halstead S, Kliks S, Diamond MS, Baric R, Lanzavecchia A, Sallusto F, de Silva AM (2011) In-depth analysis of the antibody response of individuals exposed to primary dengue virus infection. *PLoS Negl Trop Dis* 5: e1188.

Smith SA, Zhou Y, Olivarez NP, Broadwater AH, de Silva AM, Crowe JE, Jr (2012) Persistence of circulating memory B cell clones with potential for dengue virus disease enhancement for decades following infection. *J Virol* 86: 2665-2675.

de Alwis R, Smith SA, Olivarez NP, Messer WB, Huynh JP, Wahala WMPB, White LJ, Diamond MS, Baric RS, Crowe JE, Jr (2012) Identification of human neutralizing antibodies that bind to complex epitope on dengue virions. *Proc Natl Acad Sci USA* (2012) 109:7439-7444.

Teoh EP, Kukkaro P, Teo EW, Lim AP, Tan TT, Yip A, Schul W, Aung M, Kostyuchenko VA, Leo YS, Chan SH, Smith KG, Chan AH, Zou G, Ooi EE, Kemeny DM, Tan GK, Ng JK, Ng ML, Alonso S, Fisher D, Shi PY, Hanson BJ, Lok SM, Macary PA (2012) The structural basis for serotype-specific neutralization of dengue virus by a human antibody. *Sci TM* 4: 139ra83.

Zou G, Kukkaro P, Lok S-M, Ng JKW, Tan GK, Hanson BJ, Alonso S, MacAry PA,

- Shi P-Y (2012) Resistance analysis of an antibody that selectively inhibits dengue virus serotype-1. *Antiviral Res* 95: 216-223 2012.
- Setthapramote C, Sasaki T, Puiprom O, Limkittikul K, Pitaksajjakul P, Pipattanaboon C, Sasayama M, Leuangwutiwong P, Phumratanaprapin W, Chamnachanan S, Kusolsuk T, Jittmittraphap A, Asai A, Arias JF, Hirai I, Kuhara M, Okuno Y, Kurosu T, Ramasoota P, Ikuta K (2012) Human monoclonal antibodies to neutralize all dengue virus serotypes using lymphocytes from patients at acute phase of the secondary infection. *Biochem Biophys Res Commun* 423: 867-872.
- Kozbor D, Roder JC (1981) Requirements for the establishment of high-titered human monoclonal antibodies against tetanus toxoid using the Epstein-Barr virus technique. *J Immunol* 127: 1275-1280.
- Steinitz M, Tamir S, Frodin JE, Lefvert AK, Mellstedt H (1988) Human monoclonal anti-idiotypic antibodies. I. Establishment of immortalized cell lines from a tumor patient treated with mouse monoclonal antibodies. *J Immunol* 141: 3516-3522.
- Lanzavecchia A, Corti D, Sallusto F (2007) Human monoclonal antibodies by immortalization of memory B cells. *Curr Opin Biotechnol* 18: 523-528.
- Kozbor D, Lagarde AE, Roder JC (1982) Human tế bào lai constructed with antigen-specific Epstein-Barr virus-transformed cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 6651-6655.
- Karpas A, Dremucheva A, Czepulkowski BH (1998) A human myeloma cell line suitable for the generation of human monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 1799-1804.
- Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS, Winter G (1986) Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* 321: 522-525.
- McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ (1990) Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 348: 552-554.
- Green LL (1999) Antibody engineering via genetic engineering of the mouse: XenoMouse strains are a vehicle for the facile generation of therapeutic human monoclonal antibodies. *J Immunol Methods* 231: 11-23.
- Traggiai E, Becker S, Subbarao K, Kolesnikova L, Uematsu Y, Gismondo MR,

- Murphy BR, Rappuoli R, Lanzavecchia A (2004) An efficient method to make human monoclonal antibodies from memory B cells: potent neutralization of SARS coronavirus. *Nat Med* 10: 871-875.
- Simmons CP, Bernasconi NL, Suguitan AL, Mills K, Ward JM, Chau NV, Hien TT, Sallusto F, Ha do Q, Farrar J, de Jong MD, Lanzavecchia A, Subbarao K (2007) Prophylactic and therapeutic efficacy of human monoclonal antibodies against H5N1 influenza. *PLoS Med* 4: e178.
- Frank AL, Six HR, Marchini A (1989) Human monoclonal antibodies to influenza virus: IgG subclass and light chain distribution. *Viral Immunol* 2: 31-36.
- Wrammert J, Smith K, Miller J, Langley WA, Kokko K, Larsen C, Zheng N-Y, Mays I, Garman L, Helms C, James J, Air GM, Capra JD, Ahmed R, Wilson PC (2008) Rapid cloning of high-affinity human monoclonal antibodies against influenza virus. *Nature* 453: 667-671.
- Kubota-Koketsu R, Mizuta H, Oshita M, Ideno S, Yunoki M, Kuhara M, Yamamoto N, Okuno Y, Ikuta K (2009) Broad neutralizing human monoclonal antibodies against influenza virus from vaccinated healthy donors. *Biochem Biophys Res Commun* 387: 180-185.
- Halstead SB (2008) Dengue virus-mosquito interactions. *Annu Rev Entomol* 53: 273-291.
- Kurosu T, Khamlert C, Phanthanawiboon S, Ikuta K, Anatapreecha S (2010) Highly efficient rescue of dengue virus using a co-culture system with mosquito/mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 394: 398-404.
- Yenchitsomanus P, Sricharoen P, Jaruthasana I, Pattanakitsakul S, Nitayaphan S, Mongkolsapaya J, Malasit P (1996) Rapid detection and identification of dengue viruses by polymerase chain reaction (PCR). *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 27: 228-236.
- Falconar AKI (1999) Identification of an epitope on the dengue virus membrane (M) protein defined by cross-protective monoclonal antibodies: design of an improved epitope sequence based on common determinants present in both envelope (E and M) proteins. *Arch Virol* 144: 2313-2330.
- Okuno Y, Igarashi A, Fukai K (1978) Neutralization tests for dengue and Japanese

encephalitis viruses by the focus reduction method using peroxidase-anti-peroxidase staining. *Biken J* 21: 137-147.

Klassen CD (1991) Principles of Toxicology. In *Pharmacological Basis of Therapeutics*, pp. 49-61. Edited by Gilman AG, Tall TW, Nies AS, Taylor P. 8th edition. McGraw-Hill.

Kurosu T, Chaichana P, Yamate M, Anantapreecha S, Ikuta K (2007) Secreted complement regulatory protein clusterin interacts with dengue virus nonstructural protein 1. *Biochem Biophys Res Commun* 362: 1051-1056.

Shu PY, Chang SF, Kuo YC, Yueh YY, Chien LJ, Sue CL, Lin TH, Huang JH (2003) Development of group- and serotype-specific one-step SYBR green I-based real-time reverse transcription-PCR assay for dengue virus. *J Clin Microbiol.* 41:2408-2416.

Schmittgen TD, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *comparative C(T) method. Nat Protoc* 3:1101-1108.

Marasco WA, Sui J (2007) The growth and potential of human antiviral monoclonal antibody therapeutics. *Nat Biotech* 25: 1421-1434.

Oliphant T, Nybakken GE, Austin SK, Xu Q, Bramson J, Loeb M, Throsby M, Fremont DH, Pierson TC, Diamond MS (2007) Induction of epitope-specific neutralizing antibodies against West Nile virus. *J Virol* 81: 11828-11839.

Leyendeckers H, Odendahl M, Lohndorf A, Irsch J, Spangfort M, Miltenyi S, Hunzelmann N, Assenmacher M, Radbruch A, Schmitz J (1999) Correlation analysis between frequencies of circulating antigen-specific IgG-bearing memory B cells and serum titers of antigen-specific IgG. *Eur J Immunol* 29: 1406-1417.

Puiprom O, Yamashita A, Sasayama M, Limkittikul K, Boonha K, Jittmitraphap A, Leaungwutiwong P, Kurosu T, Ramasoota P, Ikuta K (2011) Co-existence of major and minor viral populations from two different origins in patients secondarily infected with dengue virus serotype 2 in Bangkok. *Biochem Biophys Res Commun* 413: 136-142.

Bernardo L, Fleitas O, Pavon A, Hermida L, Guillen G, Guzman MG (2009) Antibodies induced by dengue virus type 1 and 2 envelope domain III recombinant proteins in monkeys neutralize strain with different genotypes. *Clin Vaccine Immunol* 16:1829-1831.

Zompi S, Harris E (2012) Animal models of dengue virus infection. *Viruses* 4:62-82.

Sukupolvi-Petty S, Austin SK, Engle M, Brien JD, Dowd KA, Williams KL, Johnson S, Rico-Hesse R, Harris E, Pierson TC, Fremont DH, Diamond MS (2010) Structure and function analysis of therapeutic monoclonal antibodies against dengue virus type 2. *J Virol* 84: 9227-9239.

Omatsu T, Moi ML, Hirayama T, Takasaki T, Nakamura S, Tajima S, Ito M, Yoshida T, Saito A, Katakai Y, Akari H, Kurane I (2011) Common marmoset (*Callithrix jacchus*) as a primate model of dengue virus infection: development of high levels of viraemia and demonstration of protective immunity. *J Gen Virol* 92: 2272-2280.

Omatsu T, MOi ML, Takasaki T, Nakamura S, Katakai Y, Tanjima S, Ito M, Yoshida T, Saito A, Akari H, Kurane I (2012) Changes in hematological and serum biochemical parameters in common marmosets (*Callithrix jacchus*) after inoculation with dengue virus *J Med Primatol*, in press.

Ví dụ 2

Trong thử nghiệm thứ hai, các mẫu máu (1-8ml trong mỗi mẫu) được sử dụng dùng để dung hợp tế bào được thu thập từ 8 bệnh nhân nhi người Thái bị mắc bệnh sốt dengue tại Bệnh viện Pranangklaio (Bảng 8). Những người tham gia được chọn dựa trên chẩn đoán lâm sàng và các kết quả về mức IgG và IgM. Các quy trình nghiên cứu cho các mẫu của người được sự chấp thuận của Ủy ban Đạo đức thuộc Khoa Khoa học y tế, Bộ Y tế, Thái Lan.

Trong nghiên cứu này, SPYMEG (theo tác giả Kubota-Koketsu và các cộng sự, *Biochem Biophys Res Commun* 387: 180-185 (2009)) được sử dụng làm các tế bào đối tác dung hợp để làm phát triển các tế bào lai sản xuất các HuMAb đặc hiệu. Duy trì các tế bào SPYMEG trong Môi trường của Eagle được Dulbecco cải biến (DMEM) được bổ sung với huyết thanh nhau thai bò (FBS) 15% trong tủ ấm CO₂ 5% ở 37°C. Duy trì các tế bào vero trong Môi trường cải tiến của Eagle được Dulbecco cải biến (DMEM cải tiến - Advanced DMEM) với FBS 10% trong tủ ấm CO₂ 5% ở 37°C. Duy trì dòng tế bào dẫn xuất từ muỗi C6/36 trong Môi trường Leibovitz L-15 với FBS 10% và canh thang tryptophan phosphat 0,3% trong tủ ấm ở 28°C.

Các DENV được sử dụng trong nghiên cứu này là chủng 16007 của DENV-1, chủng New Guinea C (NGC) của DENV-2, chủng H87 của DENV-3, và chủng H241

của DENV-4. Sử dụng những chất nổi trên bề mặt từ các tế bào C6/36 do các chủng riêng biệt gây nhiễm làm nguyên liệu virus. Hiệu giá virus được đánh giá theo đơn vị tạo đám huỳnh quang (FFU), theo mô tả trước đây (theo tác giả Kurosu và các cộng sự, *Biochem Biophys Res Commun* 394: 398-404 (2010)).

Các kiểu huyết thanh trong nhiễm dengue được phát hiện ra bởi kỹ thuật RT-PCR từ huyết tương vào ngày đầu tiên thăm khám các bệnh nhân tại bệnh viện. Chiết ARN tổng số từ huyết tương của các bệnh nhân bằng cách sử dụng bộ hóa chất QIAamp Viral RNA kit (QIAGEN, Hilden, Đức) hoặc NuclioSpin RNA kit (MN, Đức) bằng cách làm theo quy trình chuẩn của nhà sản xuất. Sử dụng ARN này làm mẫu cho quá trình phiên mã ngược bằng cách sử dụng bộ kit thời gian thực một bước PCR (one-step RT-PCR kit) (QIAGEN, Hilden, Đức). Các cặp mồi của oligonucleotit đã được báo cáo trước đây về kiểu huyết thanh (theo tác giả Yenchitsomanus và các cộng sự, *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 27: 228-236 (1996)) được sử dụng để khuếch đại gen E của DENV bao gồm hầu hết các phần của vùng III: các mồi PCR thứ nhất DUL (5'-TGGCTGGTGCACAGACAATGGTT-3' (SEQ ID No. 231)) / DUR (5'-GCTGTGTCACCCAGAATGGCCAT-3' (SEQ ID No. 232)) mà phổ biến với tất cả các kiểu huyết thanh của DENV và các mồi PCR thứ hai D1L (5'-GGGGCTTCAACATCCCAAGAG-3' (SEQ ID No. 233)) / D1R (5'-GCTTAGTTTCAAAGCTTTTTCAC-3' (SEQ ID No. 234)), D2L (5'-ATCCAGATGTCATCAGGAAAC-3' (SEQ ID No. 235)) / D2R (5'-CCGGCTCTACTCCTATGATG-3' (SEQ ID No. 236)), D3L (5'-CAATGTGCTTGAATACCTTTGT-3' (SEQ ID No. 237)) / D3R (5'-GGACAGGCTCCTCCTTCTTG-3' (SEQ ID No. 238)) và D4L (5'-GGACAACAGTGGTGAAAGTCA-3' (SEQ ID No. 239)) / D4R (5'-GGTTACACTGTTGGTATTCTCA-3' (SEQ ID No. 240)), mà đặc hiệu với các kiểu huyết thanh riêng biệt của DENV, tương ứng là DENV-1, DENV-2, DENV-3, và DENV-4.

Các tế bào lai được điều chế như sau. Khoảng 1-8ml máu thu được từ những bệnh nhân riêng biệt và các PBMC được điều chế bằng cách ly tâm thông qua máy Ficoll-PaqueTM PLUS (GE Healthcare, Uppsala, Thụy Điển) trong 40 phút với tốc độ

1.200x g. Cho các PBMC dung hợp với các tế bào SPYMEG theo tỷ lệ 10:1 với polyetylen glycol 1500 (của hãng Roche Diagnostics Japan, Tokyo, Nhật Bản). Nuôi cấy các tế bào được dung hợp này trong DMEM được bổ sung với FBS 15% và BM-condimed 3% (Roche Diagnostics Japan, Tokyo, Nhật Bản) trong đĩa nuôi cấy mô loại 96 giếng trong khoảng 10 đến 14 ngày với sự có mặt của hypoxantin-aminopterin-thymidin (HAT; Invitrogen, Mỹ hoặc Sigma Aldrich, Mỹ). Thực hiện bước sàng lọc thứ nhất cho môi trường nuôi cấy về tính đặc hiệu của kháng thể đối với kiểu huyết thanh gây nhiễm của DENV bằng thử nghiệm huỳnh quang miễn dịch (IF) gián tiếp. Tiếp theo, cho các giếng sinh kháng thể đặc hiệu tạo dòng tế bào bằng cách pha loãng giới hạn. Sau 10 đến 14 ngày, cũng thực hiện bước sàng lọc thứ hai bằng thử nghiệm IF.

Thử nghiệm IF được thực hiện như sau. Gây nhiễm các tế bào vero với mật độ $2,0 \times 10^4$ mỗi giếng trong đĩa vi thể 96 giếng bởi DENV với MOI bằng 0,5 và ủ đĩa này ở 37°C, CO₂ 5%. Thời gian ủ đối với DENV-1 và DENV-2 là 72 giờ, và đối với DENV-3, DENV-4 là 48 giờ. Sau khi ủ cố định các tế bào này bằng formaldehyt 3,7% trong nước muối đệm phosphat (PBS) ở nhiệt độ trong phòng trong 40-60 phút và sau đó làm thấm các tế bào bằng Triton X-100 1% trong PBS ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút. Rửa các đĩa vi thể bằng PBS 3 lần và bổ sung 50 microlit PBS vào để bảo vệ sự mất nước của tế bào. Để thực hiện thử nghiệm này, bổ sung 50 microlit chất nổi bề mặt trong dịch nuôi cấy tế bào lai, huyết tương được pha loãng của mẫu đối chứng dương tính và âm tính vào mỗi giếng và ủ ở 37°C trong 1 giờ. Sau đó rửa các giếng bằng PBS hai lần và đặt 50 microlit thể liên hợp FITC- IgG kháng người (độ pha loãng 1:500 trong PBS) vào các giếng và tiếp đó ủ ở 37°C trong 45 phút. Rửa sạch kháng thể không được gắn kết theo cách tương tự như được mô tả ở trên và đặt 50 microlit PBS trên bề mặt của các giếng. Làm hiển thị kháng thể liên kết dưới kính hiển vi huỳnh quang.

Thử nghiệm VN được thực hiện như sau. Trộn 50 microlit chất nổi bề mặt chưa pha loãng trong dịch nuôi cấy tế bào lai hoặc các kháng thể tinh chế được pha loãng theo dãy 2 lần từ 25 microgam/ml đến 0,20 microgam/ml, và cũng DMEM cải tiến là mẫu đối chứng âm tính, với 50-100 FFU các kiểu huyết thanh riêng biệt của

DENV (50 microlit) và ủ ở 37°C, CO₂ 5% trong 15 phút. Sau đó, trung hòa các tế bào vero trong đĩa vi thể 96 giếng với hỗn hợp này. Sau khi tiêm truyền ở 37°C trong 1 giờ 30 phút, bổ sung 100 microlit môi trường phủ (CMC 4% được trộn với 2x MEM độ pH 7,0 và FBS 2%, glutamin 200 mMol L 1%) vào. Sau khi ủ ở 37°C, CO₂ 5%, (3 ngày đối với DENV-1, DENV-2 và 2 ngày đối với DENV-3, DENV-4), loại bỏ môi trường phủ này và rửa các đĩa bằng PBS, và sau đó cố định các tế bào này bằng formaldehyt 3,7% trong PBS và làm thấm bằng Triton X-100 1% trong PBS. Cho các tế bào bị nhiễm phản ứng với 4G2 là MAb của chuột kháng flavivirus ở 37°C, 1 giờ. Cho kháng thể liên kết phản ứng với thể liên hợp được pha loãng 1:500 HRP-tho kháng chuột trong chất đệm pha loãng (PBS, FBS 1%, Tween-20 0,05%), và ủ hỗn hợp ở 37°C, 1 giờ. Các đĩa không có gì và được rửa bằng PBS và sau đó bổ sung 50 microlit dung dịch cơ chất [3, 3' DAB 0,1% (Sigma, Mỹ), 0,4% của H₂O₂ 3%) và ủ trong hộp tối ở nhiệt độ trong phòng. Quan sát phản ứng màu dưới kính hiển vi tương phản pha. Thực hiện các thử nghiệm này lặp lại ba lần và các kết quả được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình của chúng. Hoạt tính trung hòa từ các kháng thể tinh chế được thể hiện theo độ pha loãng cao nhất cho thấy mức giảm FFU hơn 50%, so với mẫu đối chứng âm tính, được gọi là VN50. Mặt khác, hoạt tính trung hòa của môi trường nuôi cấy của dòng tế bào lai được thể hiện dưới dạng phần trăm mức giảm FFU, so với mẫu đối chứng âm tính.

Các lớp/phân lớp globulin miễn dịch của các kháng thể được tiết ra từ các dòng tế bào lai được xác định bằng cách sử dụng Bộ kit xác định lớp là Bio-Plex Pro™ Assays Immunoglobulin Isotyping kit (của hãng Bio-Rad, Mỹ). Thử nghiệm này có thể xác định IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE và IgM cùng một lúc. Quy trình thực hiện này là theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Bổ sung 50l chất nổi bề mặt nuôi cấy từ mỗi dòng tế bào lai, nồng độ tiêu chuẩn đã biết, và mẫu đối chứng vào giếng chứa hạt mã hóa màu polystyren có từ tính được đánh dấu cùng với kháng thể khác nhau có hướng kháng lại một cách đặc hiệu tất cả các lớp/phân lớp globulin miễn dịch. Sau 30 phút phản ứng, rửa đĩa để loại bỏ các protein không được gắn kết và bổ sung kháng thể phát hiện được biotinyl hóa đặc hiệu đối với epitop khác trên lớp/phân lớp globulin miễn dịch vào các hạt. Điều này dẫn đến tạo thành các kháng thể nhiều lớp

xung quanh các lớp/phân lớp globulin miễn dịch đặc hiệu. Phản ứng được phát hiện ra bằng cách cho thêm streptavidin-phycoerythrin gắn kết với các kháng thể phát hiện được biotinyl hóa. Hỗn hợp phản ứng của mỗi giếng được nhận dạng và được định lượng dựa trên màu sắc và sự phát huỳnh quang của hạt. Đọc các kết quả và tính toán theo Phần mềm Bio-Plex Manager TH bằng cách sử dụng đường chuẩn có nguồn gốc từ mỗi chuẩn isotip (lớp kháng thể).

Kháng thể từ mỗi dòng tế bào lai được xác định đích đặc hiệu của chúng đối với 4 kháng nguyên virus, protein màng bao (E), prM (tiền màng), NS1, và C (vỏ capsit) bằng thử nghiệm IF. Các vectơ biểu hiện của các protein DENV-2 prM, E, NS1, C và sự dung hợp prM-E đã được đề xuất bởi Giáo sư Kazuyoshi Ikuta, Phòng thí nghiệm Đại học Osaka, Nhật Bản. Tất cả các protein được biểu hiện là các protein dung hợp FLAG. Các tế bào 293T được chuyển nạp với các plasmid riêng biệt bằng cách sử dụng thuốc thử Lipofectamine™ (Invitrogen, Mỹ). Các tế bào chuyển nạp được sử dụng làm các kháng nguyên virus để xác định tính đặc hiệu của kháng thể. Để thực hiện như vậy, trải các tế bào khô tự nhiên lên trên bề mặt các miếng kính hiển vi đa điểm và cố định chúng bằng axeton chứa methanol 40%. Có thể bảo quản các miếng kính này ở -80°C cho đến khi sử dụng. Đặt 10 microlit chất nổi bề mặt nuôi cấy các HuMAb lên trên các miếng kính và ủ trong 60 phút ở nhiệt độ trong phòng. Rửa các miếng kính 3 lần bằng PBS và sau đó làm nhiễm màu các tế bào bằng FITC - IgG thỏ kháng người dạng liên hợp (Dako, Đan Mạch) với độ pha loãng là 1:400 trong 45 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi rửa để loại bỏ protein không được gắn kết, đặt các miếng kính trong PBS chứa glyxerol 10% và kiểm tra các đích gắn kết đặc hiệu dưới kính hiển vi huỳnh quang.

Các vùng CDR của các chuỗi nặng và các chuỗi nhẹ từ 8 dòng tế bào lai cho thấy sự trung hòa mạnh mẽ đối với tất cả các kiểu huyết thanh của dengue được sắp xếp theo trình tự. Để thực hiện được như vậy, chiết ARN từ các tế bào tế bào lai bằng cách sử dụng bộ RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Đức) và cho mẫu qua quy trình RT-PCR bằng cách sử dụng Bộ SuperScript III First-Strand Synthesis Kit (Invitrogen) với mỗi oligo(dT). Vùng mã hóa của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của HuMAb được khuếch đại PRC riêng biệt bằng cách sử dụng mỗi sau đây: 5'-ATG GAC TGG ACC

TGG AGG ATC CTC-3' (SEQ ID No. 241), 5'-ATG GAC ATA CTT TGT TCC ACG CTC CT-3' (SEQ ID No. 242), 5'-ATG AAA CAC CTG TGG TTC TTC CTC CT-3' (SEQ ID No. 243), 5'-ATG TCT GTC TCC TTC CTC ATC TTC CT-3' (SEQ ID No. 244), 5'-ATG GAG TTT GGG CTG AGC TGG GTT-3' (SEQ ID No. 245), 5'-ATG GGG TCA ACC GCC ATC CTC GC-3' (SEQ ID No. 246) cho chuỗi nặng 6 dây xuôi và 5'-CCT TGG TGT TGC TGG GCT TGT GAT-3' (SEQ ID No. 247) cho chuỗi nặng ngược; 5'-ATG GAC ATG AGG GTC CCC GCT CAG-3' (SEQ ID No. 248), 5'-ATG AGG CTC CCT GCT CAG CTC CTG-3' (SEQ ID No. 249), 5'-ATG GAA RCC CCA GCG CAG CTT CTC-3' (SEQ ID No. 250), 5'-ATG GTG TTG CAG ACC CAG GTC TTC AT-3' (SEQ ID No. 251), 5'-ATG GGG TCC CAG GTT CAC CTC CTC-3' (SEQ ID No. 252) cho chuỗi nhẹ kapa 5 dây xuôi và 5'-GAG TTA CCC GAT TGG AGG GCG TTA T-3' (SEQ ID No. 253) cho chuỗi nhẹ kapa ngược; 5'-ATG GCC TGG WYY CCT CTC YTY CTS-3' (SEQ ID No. 254), 5'-ATG GCC TGG ATG ATG CTT CTC CTC G-3' (SEQ ID No. 255), 5'-ATG SCC TGG GCT CYK CTS CTC CTS-3' (SEQ ID No. 256), 5'-ATG GCC TGG RYC YCM YTC YWC CTM-3' (SEQ ID No. 257) cho chuỗi nhẹ lamda 4 dây xuôi và 5'-TGG CAG CTG TAG CTT CTG TGG GAC T-3' (SEQ ID No. 258) cho chuỗi nhẹ lamda ngược. Các sản phẩm PCR được gắn kết vào véc-tơ pGEM T-Easy (của hãng Promega, Madison, WI) và các trình tự của chúng được phân tích bằng cách sử dụng Bộ BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit và ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (của hãng Applied Biosystems, Foster City, CA).

Trong nghiên cứu này, các tác giả sáng chế đã điều chế các tế bào lai sản xuất các HuMAb kháng lại DENV bằng cách sử dụng các mẫu máu của 8 bệnh nhân nhi người Thái (Bảng 8) có độ tuổi từ 6 đến 14 tuổi. Trong số đó, 3 bệnh nhân được chẩn đoán lâm sàng là mắc sốt xuất huyết Dengue (DHF) cấp độ I và 5 bệnh nhân được chẩn đoán là mắc bệnh sốt Dengue (DF). Các bệnh nhân được đặt cuộc hẹn với những người cho PBMC 1-3 ngày sau cuộc thăm khám thứ nhất. Các mẫu PBMC được thu thập vào khoảng 4 đến 12 ngày sau khi khởi phát sốt, 7 mẫu thu được từ các bệnh nhân ở pha cấp tính, và 1 từ bệnh nhân ở pha dưỡng bệnh (12 ngày sau khi khởi phát sốt). Dữ liệu về mức IgM và IgG, được xác định từ các mẫu máu được thu thập vào ngày

điều chế tế bào lai, đã cho thấy tất cả các bệnh nhân bị nhiễm thứ phát bởi DENV. Ngoài ra, các mẫu huyết tương từ cuộc thăm khám thứ nhất cũng được cho qua quy trình RT-PCR xác định kiểu huyết thanh của DENV. Các kết quả đã cho thấy rằng 3 tình nguyện viên bị nhiễm bởi DENV-1, 1 bởi DENV-2, 1 bởi DENV-3 và 3 mẫu khác cho các kết quả âm tính đối với tất cả các kiểu huyết thanh.

Bảng 8. Tóm tắt về tình trạng các bệnh nhân và các HuMAb thu được trong nghiên cứu này

Bệnh nhân	Giới tính	Chẩn đoán	Chẩn đoán	Thu thập máu ³		ELISA ⁷		Kiểu huyết thanh theo PCR ⁸	Hybridoma thu được
				Ngày	Pha	IgG (đơn vị)	IgM (đơn vị)		
A	Nam	12	DHF ¹ cấp độ I	12	Dưỡng bệnh ⁴	10	69	DENV-3	1
B	Nam	11	DF	5	Cấp tính ⁵	35	62	Âm tính	2
C	Nữ	13	DF	4	Cấp tính	90	6	Âm tính	1
D	Nữ	6	DHF cấp độ I	8	Cấp tính	138	100	DENV-1	14
E	Nam	9	DHF cấp độ I	6	Cấp tính	29	63	DENV-2	15
F	Nam	14	DF ²	4	Cấp tính	90	27	DENV-1	3
G	Nữ	11	DF	6	Cấp tính	109	41	DENV-1	4
H	Nữ	6	DF	7	Cấp tính	61	132	Âm tính	3

¹ Sốt xuất huyết Dengue

² Sốt Dengue

³ Thu thập máu vào ngày điều chế hybridoma

⁴ Mẫu máu ở pha dưỡng bệnh được thu thập sau 10 ngày khởi phát bệnh

⁵ Mẫu máu ở pha cấp tính được thu thập trong khoảng 5 đến 9 ngày sau khi khởi phát bệnh

⁷ Kết quả từ các mẫu được thu thập vào ngày điều chế hybridoma

⁸ Kết quả từ các mẫu được thu thập vào ngày thăm khám đầu tiên ở bệnh viện

Các phần phân đoạn PBMC được chuẩn bị từ máu của các bệnh nhân được dùng cho việc điều chế tế bào lai bằng cách dung hợp với các tế bào SPYMEG. Sàng lọc lần thứ nhất các dịch nuôi cấy ở từng giếng riêng biệt trong các đĩa vi thể 96 giếng mà trong đó các tế bào được dung hợp được làm kết hạt và được nuôi cấy trong 10-14 ngày trong môi trường chọn lọc HAT bằng thử nghiệm IF. Tiếp theo, các tế bào trong các giếng thể hiện tín hiệu dương tính bằng thử nghiệm IF được cho tạo dòng tế bào bằng cách pha loãng giới hạn. Sau 2 tuần, sàng lọc lần thứ hai các dịch nuôi cấy trong các giếng chứa khuẩn lạc duy nhất bằng thử nghiệm IF. Nhờ đó, tám thực nghiệm dung hợp với các PBMC của 8 bệnh nhân nhi người Thái bị nhiễm thứ phát bởi mỗi DENV đã sản xuất tổng cộng 43 dòng tế bào lai để sản xuất các HuMAb đặc hiệu với DENV bằng thử nghiệm IF như được thể hiện trong Bảng 8. Trong số tất cả các dòng vô tính hybridoma, bệnh nhân A, bệnh nhân B, bệnh nhân C, bệnh nhân D, bệnh nhân E, bệnh nhân F, bệnh nhân G và bệnh nhân H một cách tương ứng đã tạo ra 1, 2, 1, 14, 15, 3, 4, 3 dòng.

Đặc điểm đặc trưng của 43 HuMAb thu được như đã đề cập ở trên là tính phản ứng huyết thanh học của chúng đối với tất cả 4 kiểu huyết thanh của DENV theo các thử nghiệm IF và VN. Các tác giả sáng chế đã sử dụng các HuMAb trong các dịch nuôi cấy tế bào tế bào lai riêng biệt cho các thử nghiệm này. Tóm tắt về 43 dòng với các hoạt tính huyết thanh học của chúng được thể hiện trong Bảng 9. Số điểm IF và hoạt tính VN thay đổi tùy thuộc vào mỗi dòng, số điểm IF nằm trong khoảng từ âm (-) đến 3+ và VN là từ 0 đến 100%. Các ví dụ về thử nghiệm IF được thể hiện trong FIG.12. Theo thử nghiệm IF, hầu hết các dòng đã cho thấy phản ứng chéo với tất cả các kiểu huyết thanh của DENV và các kết quả IF có thể được phân thành 8 mẫu, (I, II, III, IV, V, VI, VII và VIII) như được thể hiện trong Bảng 10. Đã nhận thấy rằng 29 dòng (67,4%) thuộc về Mẫu I phản ứng chéo với tất cả các kiểu huyết thanh của DENV. Các dòng có đặc điểm như các Mẫu II, III, IV, V, VI, VII và VIII một cách tương ứng là 2, 2, 2, 1, 3, 2, 2. Theo tóm tắt trong Bảng 11 và FIG.13, tổng cộng 22 dòng tế bào lai đã sản xuất các HuMAb với mức trung hòa mạnh (mức giảm sao chép của DENV >80%) đối với tất cả các kiểu huyết thanh của DENV. Đặc biệt là, 10 HuMAb (DMSc- 4, 5, 14, 24, 28, 31, 34, 36, 38, 41) đã cho thấy hoạt tính giảm VN

cao hơn 90% đối với tất cả các kiểu huyết thanh và 12 HuMAb (DMSc-1, 7, 8, 13, 16, 17, 21, 30, 33, 37, 39, 40) đã cho thấy tỷ lệ giảm VN cao hơn 80 % đối với tất cả các kiểu huyết thanh. Đáng quan tâm là, tất cả các dòng thể hiện hoạt tính VN mạnh đối với DENV1 và DENV2 cao hơn 90%, 10 dòng và 16 dòng một cách tương ứng thể hiện mức giảm VN đối với DENV-3 và DENV4 cao hơn 90%. Trong nghiên cứu này, toàn bộ các HuMAb đã cho thấy mức trung hòa thấp nhất đối với DENV-3.

Bảng 9-1. Kết quả tóm tắt về tính phản ứng chéo của 43 HuMab và mức giảm tính trung hòa virus đối với DENV-1 đến DENV-4

Bệnh nhân	STT	Dòng hybridoma	Mã	Thử nghiệm IF				VN (% giảm)			
				DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4	DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4
A (M, 12 yr)	1	15H4	DMSC-1	+	++	+	+	100	100	82,3	98,7
	2	24C2	DMSC-2	+	+++	+	++	69,6	96,0	79,5	83,3
	3	24C3	DMSC-3	-	+	+	-	0	15,1	37,0	25,0
C (F, 13 yr)	4	73E3	DMSC-4	++	++	++	++	98,2	100	90,8	92,7
D (F, 6 yr)	5	74B11	DMSC-5	+	+++	++	+++	100	100	93,9	91,0
	6	74H1	DMSC-6	-	+	-	-	23,3	5,6	18,7	0
	7	74H2	DMSC-7	++	+++	+	++	93,3	99,6	79,7	91,8
	8	74H10	DMSC-8	++	++	++	++	96,4	100	88,4	91,8
	9	75D11	DMSC-9	+++	+++	++	+++	92,8	99,0	73,6	84,8
	10	75E4	DMSC-10	+	+	+	-	100	100	16,7	38,7
	11	76B3	DMSC-11	+	+	++	-	18,7	82,7	60,1	57,4
	12	76C1	DMSC-12	-	-	+	-	9,5	27,9	40,2	42,7
	13	76E3	DMSC-13	++	++	+++	++	97,7	99,6	86,5	94,8
	14	76F3	DMSC-14	++	+++	+	++	99,5	99,6	90,2	93,0
			(NIH111)								
	15	76F6	DMSC-15	++	+++	+	++	93,6	100	58,9	90,2
	16	76H6	DMSC-16	++	+++	++	++	96,6	99,6	79,0	93,4
	17	77G2	DMSC-17	+++	+++	++	+++	98,7	100	88,4	95,3
			(NIH9)								
E (M, 9 yr)	18	77E10	DMSC-18	+	+	+	+	80,7	100	71,6	89,5
	19	78A6	DMSC-19	-	+	+++	-	10,2	31,6	9,1	0,8
	20	78C4	DMSC-20	-	+	-	-	20,0	2,4	42,7	37,8
	21	78C7	DMSC-21	++	+++	++	++	99,5	100	83,9	90,8
	22	78D5	DMSC-22	+++	+++	+++	++	99,2	100	69,6	94,3
	23	78E2	DMSC-23	-	-	+++	-	49,5	4,8	0	4,8
	24	78E3	DMSC-24	+	++	+	++	99,5	100	93,9	98,8
	25	78E5	DMSC-25	++	++	-	-	89,2	95,6	0	43,4
	26	78E6	DMSC-26	+++	++	+++	+++	82,5	100	79,7	83,8

Bảng 9-2. Kết quả tóm tắt của 43 HuMAb, tính phản ứng chéo và mức giảm trung hòa virus đối với DENV-1 đến DENV-4

Bệnh nhân	STT	Dòng Hybridoma	Mã	Thử nghiệm IF						VN (% giảm)			
				DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4	DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4	DENV-3	DENV-4
E (M, 9 yr)	27	78F2	DMSC-27	++	+++	-	++	100	99,4	70	97,4		
	28	78F3	DMSC-28	++	++	+	++	99,6	100	96,3	96,0		
			(NIH 11)										
	29	78F4	DMSC-29	+	++	-	-	91,7	100	27,5	72,7		
	30	78F5	DMSC-30	++	+++	+	+++	99,4	100	88,3	95,4		
	31	78G2	DMSC-31	++	+++	++	+++	99,5	100	90,2	95,3		
	32	78G4	DMSC-32	+	+	-	+	94,3	100	37,7	87,7		
F (M, 14 yr)	33	78H6	DMSC-33	++	++	++	++	91,9	97,4	85,2	97,0		
	34	80C2	DMSC-34	++	++	++	++	100	100	90,8	96,5		
	35	80D5	DMSC-35	+	++	+	+	67,0	94,3	66,7	85,5		
	36	80E5	DMSC-36	++	++	++	++	99,5	99,6	92,6	96,0		
			(NIH 15)										
G (F, 11 yr)	37	84A12	DMSC-37	++	++	++	++	91,1	100	87,3	94,9		
	38	84C10	DMSC-38	++	+++	++	+++	100	100	91,3	93,6		
	39	85C9	DMSC-39	+++	+++	++	++	100	98,9	80,2	93,0		
	40	85H7	DMSC-40	+++	+++	+	++	96,9	100	85,8	91,3		
H (F, 6 yr)	41	87G5	DMSC-41	+	++	+	+	100	100	95,7	100		
	42	88F2	DMSC-42	-	+	+	+	10,5	2,7	36,6	22,8		
	43	88B9	DMSC-43	-	+	+	-	42,2	37,9	73,6	28,0		
	22	78D5	DMSC-22	+++	+++	+++	++	99,2	100	69,6	94,3		
	23	78E2	DMSC-23	-	-	+++	-	49,5	4,8	0	4,8		
	24	78E3	DMSC-24	+	++	+	++	99,5	100	93,9	98,8		
	25	78E5	DMSC-25	++	++	-	-	89,2	95,6	0	43,4		
	26	78E6	DMSC-26	+++	++	+++	+++	82,5	100	79,7	83,8		

Bảng 10

Các mẫu theo thử nghiệm IF của 43 dòng thu được trong nghiên cứu này

Mẫu	IF				Số dòng	Tên dòng
	DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4		
I	+	+	+	+	29	DMSc-1, 2, 4, 5, 7, 8, 9, <u>13</u>, 14, 15, 16, 17, 18, 21, 22, 24, 26, 28, 30, 31, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41
II	+	+	+	-	2	DMSc-10, 11
III	+	+	-	-	2	DMSc-25, 29
IV	+	+	-	+	2	DMSc-27, 32
V	-	+	+	+	1	DMSc-42
VI	-	+	+	-	3	DMSc-3, 19, 43
VII	-	+	-	-	2	DMSc-6, 20
VIII	-	-	+	-	2	DMSc-12, 23

Mẫu I = +++, Mẫu II = ++-, Mẫu III = +- -, Mẫu IV = +- +

Các kết quả về các isotip globulin miễn dịch và các đích gắn kết đặc hiệu của 22 dòng được cho biết trong Bảng 11. Đã nhận thấy rằng tất cả các kháng thể được tiết ra từ tất cả các dòng thuộc về IgG1 và đặc hiệu với protein màng bao.

Bảng 11. Kết quả tóm tắt về 22 HuMAb, cho thấy phản ứng chéo và mức giảm trung hòa virus đối với DENV-1 đến DENV-4, Isotip Ig và protein đích đặc hiệu của chúng

Bệnh nhân	STT	Dòng Hybridoma	Mã	Thử nghiệm IF				NT (% giảm)				Isotip Ig	Protein đích
				DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4	DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4		
A	1	15H4	DMSC-1	+	++	+	+	100	100	82,3	98,7	IgG1	E
	2	73E3	DMSC-4	++	++	++	++	98,2	100	90,8	92,7	IgG1	E
	3	74B11	DMSC-5	+	+++	++	+++	100	100	93,9	91,0	IgG1	nd
	4	74H2	DMSC-7	++	+++	+	++	93,3	99,6	79,7	91,8	IgG1	E
	5	74H10	DMSC-8	++	++	++	++	96,4	100	88,4	91,8	IgG1	E
	6	76E3	DMSC-13	++	++	+++	++	97,7	99,6	86,5	94,8	IgG1	E
	7	76F3	DMSC-14	++	+++	+	++	99,5	99,6	90,2	93,0	IgG1	E
E	8	76H6	(NIH 11)										
			DMSC-16	++	+++	++	++	96,6	99,6	79,0	93,4	IgG1	nd
	9	77G2	DMSC-17	+++	+++	++	+++	98,7	100	88,4	95,3	IgG1	E
F	10	78C7	(NIH 9)										
			DMSC-21	++	+++	++	++	99,5	100	83,9	90,8	IgG1	nd
	11	78E3	DMSC-24	+	++	+	++	99,5	100	93,9	98,8	IgG1	nd
	12	78F3	DMSC-28	++	++	+	++	99,6	100	96,3	96,0	IgG1	E
	13	78F5	DMSC-30	++	+++	+	+++	99,4	100	88,3	95,4	IgG1	nd
	14	78G2	DMSC-31	++	+++	++	+++	99,5	100	90,2	95,3	IgG1	E
	15	78H6	DMSC-33	++	++	++	++	91,9	97,4	85,2	97,0	IgG1	E
G	16	80C2	DMSC-34	++	++	++	++	100	100	90,8	96,5	IgG1	nd
	17	80E5	DMSC-36	++	++	++	++	99,5	99,6	92,6	96,0	IgG1	E
			(NIH 15)										
H	18	84A12	DMSC-37	++	++	++	++	91,1	100	87,3	94,9	IgG1	E
	19	84C10	DMSC-38	++	+++	++	+++	100	100	91,3	93,6	IgG1	E
	20	85C9	DMSC-39	+++	+++	++	++	100	98,9	80,2	93,0	IgG1	nd
	21	85H7	DMSC-40	+++	+++	+	++	96,9	100	85,8	91,3	IgG1	nd
	22	87G5	DMSC-41	+	++	+	+	100	100	95,7	100	IgG1	E

E = protein màng bao; nd = không xác định

Trong nghiên cứu này, các tác giả sáng chế đã chọn các dòng tế bào lai thể hiện mức trung hòa mạnh mẽ đối với tất cả các kiểu huyết thanh của DENV cao hơn 90% để sắp xếp thứ tự CDR. Sự sắp xếp thứ tự CDR của các chuỗi nặng và các chuỗi nhẹ cho 8 trong số 10 dòng được thực hiện đầy đủ như được thể hiện trên Bảng 12.

Bảng 12-1

Bảng 12-1. Các trình tự axit amin được suy ra của các CDR trong chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của 15 HuMAb

Dòng HuMAb	CDR1 ^a	CDR2 ^a	CDR3 ^a
DMSC -4	DYGIQ (SEQ ID: No.55) TGTNSDVGGYNFVS (SEQ ID: No.154)	WINAGNGDTKYSQKLQA (SEQ ID: No.56) DVSNRPS (SEQ ID: No.155) GISWNSGGILYADSVKQ (SEQ ID: No.59) EGTKRPS (SEQ ID: No.158)	GLGYCSNTINCDSYYYYYMDV (SEQ ID: No.57) SSYTTSSSLV (SEQ ID: No.156) DIGHCTTTTCSSVY (SEQ ID: No.60) CSYAGVTPKHV (SEQ ID: No.159)
DMSC -5	DHAMH (SEQ ID: No.58) TGADSDVGVYSLVS (SEQ ID: No.157)	NIKQDGTKEYVVDVKQ (SEQ ID: No.62) EGTKRPS (SEQ ID: No.161) AKGASGDSFPYADSVKQ (SEQ ID: No.65) NNNQRP (SEQ ID: No.164)	GNPFYDISTGYQGAYEDY (SEQ ID: No.63) CSYAGVTPKHV (SEQ ID: No.162) GHQWFGVL (SEQ ID: No.66) TAWDDYLSGPL (SEQ ID: No.165)
DMSC -14	TYWMN (SEQ ID: No.61) TGADSDVGVYSLVS (SEQ ID: No.160)		
DMSC -24	KYAMA (SEQ ID: No.64) SGSTNIGNNYVY (SEQ ID: No.163)		

a Các trình tự trên và trình tự dưới chỉ ra các CDR của các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ

Bảng 12-2 Các trình tự axit amin được suy ra của các CDR trong chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của 15 HuMAb

DMSC -31	DDAYWS (SEQ ID:No.70) TGTSSDVGGYNFVS (SEQ ID:No.169)	YTHSGAAYNPISLS (SEQ ID:No.71) EVIERPS (SEQ ID:No.170) VISYDGSDDKYADSVKG (SEQ ID:No.74) DNKRPS (SEQ ID:No.173) LISGDGGITYYADSVKG (SEQ ID:No.77) EVNERPS (SEQ ID:No.176)	TGSRVLDP (SEQ ID:No.72) SSYGGNNVV (SEQ ID:No.171) GYNSPKSYFDY (SEQ ID:No.75) GTWDGSLAL (SEQ ID:No.174) YTADPWALRDY (SEQ ID:No.78) NSYAGSKIV (SEQ ID:No.177) TSASAGRPTYYFDH (SEQ ID:No.81) CSYVGSYTWV (SEQ ID:No.180) GYNSCHYFDY (SEQ ID:No.84) SSYRINTPI (SEQ ID:No.183) GNPTFYDISTGYQGAYFDY (SEQ ID:No.87) CSYAGVTTPGIV (SEQ ID:No.186) ELVSEWDSDAEYFQY (SEQ ID:No.90) CSYAGRWW (SEQ ID:No.189)
DMSC -36	SEAMH (SEQ ID:No.73) SGSENGNNYVS (SEQ ID:No.172)	VISYDGSDDKYADSVKG (SEQ ID:No.74) DNKRPS (SEQ ID:No.173) LISGDGGITYYADSVKG (SEQ ID:No.77) EVNERPS (SEQ ID:No.176)	
DMSC -38	ASAMQ (SEQ ID:No.76) TGTSSDVGGYNSVS (SEQ ID:No.175)	LISGDGGITYYADSVKG (SEQ ID:No.77) EVNERPS (SEQ ID:No.176)	
DMSC -37	SYVES (SEQ ID:No.79) TGTGSDVGGYNYVS (SEQ ID:No.178)	SIMPVFGSTQYAKTFQG (SEQ ID:No.80) DVSKRPS (SEQ ID:No.179)	
DMSC -8	ASAMQ (SEQ ID:No.82) TGFSSDVGGYNYVS (SEQ ID:No.181)	LISGDGGITYYADSVKG (SEQ ID:No.83) DVTERPS (SEQ ID:No.182)	
DMSC -13	TYWMIN (SEQ ID:No.85) TGADSDVGVYSLVS (SEQ ID:No.184)	NIKQDGTCKYTVDSVKG (SEQ ID:No.86) EGTKRPS (SEQ ID:No.185)	
DMSC -17	NYAMH (SEQ ID:No.88) TGTSSDVGGHNDVS (SEQ ID:No.187)	VISYVVTIKYADSVKG (SEQ ID:No.89) DVNKRPS (SEQ ID:No.188)	

a Các trình tự trên và trình tự dưới chỉ ra các CDR của các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ

Bảng 12-3 Các trình tự axit amin được suy ra của các CDR trong chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của 15 HuMAb

DMSC -30	TGDMCLS (SEQ ID:No.91) AGTSSDINDYNYVS (SEQ ID:No.190)	LHRRDDTYYSISLKT (SEQ ID:No.92) EVSKRPS (SEQ ID:No.191)	SLDYGDYVVGYAFDV (SEQ ID:No.93) NSFTSSSPSVL (SEQ ID:No.192)
DMSC -2	TEETIS (SEQ ID:No.94) RASQSVSSNYLA (SEQ ID:No.193)	ELFVFKTANYAQKFG (SEQ ID:No.95) SAFNRAI (SEQ ID:No.194)	KNCTVNSCYAWFDP (SEQ ID:No.96) QQLRT (SEQ ID:No.195)
DMSC -1	SYSMN (SEQ ID:No.97) TGTSSDVGGYNYVS (SEQ ID:No.196)	SETTSFIAYADSVKG (SEQ ID:No.98) DVSKRPS (SEQ ID:No.197)	VYCSTTSCSPNYFDS (SEQ ID:No.99) CSYAGTYT (SEQ ID:No.198)

a Các trình tự trên và trình tự dưới chỉ ra các CDR của các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ

Nghiên cứu này được thực hiện trên tám bệnh nhân nhi, 3 bệnh nhân được chẩn đoán lâm sàng là mắc DHF và 5 bệnh nhân được chẩn đoán là mắc DF. Tất cả các bệnh nhân được xét nghiệm theo các đơn vị IgG và IgM Dengue. Kiểu huyết thanh trong trường hợp nhiễm dengue theo PCR đã thể hiện các kết quả âm tính đối với 3 bệnh nhân mắc DF. Điều này có thể xuất phát từ số lượng nhỏ các hạt virus có mặt trong máu vào ngày thăm khám thứ nhất. Tổng cộng 43 dòng tế bào lai thu được với vai trò là nguồn sản xuất các HuMAb đặc hiệu đối với DENV bằng cách sử dụng các PBMC của 8 bệnh nhân nhi ở Thái Lan. 29 trong số 43 dòng (67,4%) đã cho thấy phản ứng chéo với tất cả các kiểu huyết thanh của dengue bằng thử nghiệm IF. Trong số đó, 22 dòng đã cho thấy mức trung hòa mạnh mẽ đối với tất cả các kiểu huyết thanh của dengue cao hơn 80%. Ngoài ra, 17 HuMAb (DMSc-4, 5, 8, 13, 14, 17, 24, 28, 30, 31, 33, 34, 36, 37, 38, 40, 41) đã cho thấy mức trung hòa >85% đối với tất cả các kiểu huyết thanh của DENV. Hiện tại, 12 trong số 17 dòng (DMSc- 4, 5, 8, 13, 14, 17, 24, 30, 31, 36, 37, 38,) và 2 dòng (DMSc-1,2) trước đây đã bộc lộ trong đơn sáng chế tạm thời hoàn toàn được sắp xếp theo trình tự. 22 HuMAb có thể là thành phần dự tuyển để phát triển các kháng thể điều trị. Ngoài ra, các HuMAb này cũng rất hữu ích làm các cực dò để hiểu được hiện tượng phức tạp về cách thức các kiểu huyết thanh khác loại của DENV thể hiện mức trung hòa cũng như ADE với các kháng thể giống nhau. Những nghiên cứu sâu hơn về sự lập bản đồ epitop của các HuMAb này sẽ là hữu ích để giải quyết hiện tượng này.

Tài liệu tham khảo

- Innis BL, Thirawuth V, Hemachudha C (1989) Identification of continuous epitopes of the envelope glycoprotein of dengue type 2 virus. *Am J Trop Med Hyg* 40: 676-687.
- Calisher CH, Karabatsos N, Dalrymple JM, Shope RE, Porterfield JS, Westaway EG, Brandt WE (1989) Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. *J Gen Virol* 70: 37-43.
- Sangkawibha N, Rojanasuphot S, Ahandrik S, Viriyapongse S, Jatanasen S, Salitul V, Phanthumachinda B, Halstead SB. (1984) Risk factors in dengue shock syndrome: a prospective epidemiologic study in Rayong, Thailand. I. The 1980 outbreak. *Am J Epidemiol* 120: 653-669.
- Halstead SB, O'Rourke EJ (1977) Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. *J Exp Med* 146: 201-217.
- Diamond MS, Pierson TC, Fremont DH (2008) The structural immunology of antibody protection against West Nile virus. *Immunol Rev* 225: 212-225.
- Harris E, Videz E, Perez L, Sandoval E, Tellez Y, Perez ML, Cuadra R, Rocha J, Idiaquez W, Alonso RE, Delgado MA, Campo LA, Acevedo F, Gonzalez A, Amador JJ, Balmaseda A (2000) Clinical, epidemiologic, and virologic features of dengue in the 1998 epidemic in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg* 63: 5-11.
- Sukupolvi-Petty S, Austin SK, Engle M, Brien JD, Dowd KA, Williams KL, Johnson S, Roco-Hesse R, Harris E, Pierson TC, Fremont DH, Diamond MS (2010) Structural and function analysis of therapeutic monoclonal antibodies against dengue virus type 2. *J Virol* 84: 9227-9239.
- Goncalvez AP, Men R, Wernly C, Purcell RH, Lai CJ (2004) Chimpanzee Fab fragments and a derived humanized immunoglobulin G1 antibody that efficiently cross-neutralize dengue type 1 and type 2 viruses. *J Virol* 78: 12910-12918.
- Reichert JM, Rosensweig CJ, Faden LB, Dewitz MC (2005) Monoclonal antibody successes in the clinic. *Nat Biotechnol* 23: 1073-1078.
- Frogel MP, Stewart DL, Hoopes M, Fernandes AW, Mahadevia PJ (2010) A systematic review of compliance with Palivizumab administration for RSV immunoprophylaxis. *J Manag Care Pharm* 16: 46-58.

- Mansbach J, Kunz S, Acholonu U, Clark S, Camargo CA Jr (2007) Evaluation of compliance with palivizumab recommendations in a multicenter study of young children presenting to the emergency department with bronchiolitis. *Pediatr Emerg Care* 23: 362-367.
- Kozbor D, Roder JC (1981) Requirements for the establishment of high-titered human monoclonal antibodies against tetanus toxoid using the Epstein-Barr virus technique. *J Immunol* 127: 1275-1280.
- Steinitz M, Tamir S, Frodin JE, Lefvert AK, Mellstedt H (1988) Human monoclonal anti-idiotypic antibodies. I. Establishment of immortalized cell lines from a tumor patient treated with mouse monoclonal antibodies. *J Immunol* 141: 3516-3522.
- Lanzavecchia A, Corti D, Sallusto F (2007) Human monoclonal antibodies by immortalization of memory B cells. 2007. *Curr Opin Biotechnol* 18: 523-528.
- Kozbor D, Lagarde AE, Roder JC (1982) Human tế bào lai constructed with antigen-specific Epstein-Barr virus-transformed cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79: 6651-6655.
- Karpas A, Dremucheva A, Czepulkowski BH (1998) A human myeloma cell line suitable for the generation of human monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 1799-1804.
- Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS, Winter G (1986) Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* 321: 522-525.
- McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ (1990) Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 348: 552-554.
- Green LL (1999) Antibody engineering via genetic engineering of the mouse: XenoMouse strains are a vehicle for the facile generation of therapeutic human monoclonal antibodies. *J Immunol Methods* 231: 11-23.
- Traggiai E, Becker S, Subbarao K, Kolesnikova L, Uematsu Y, Gismondo MR, Murphy BR, Rappuoli R, Lanzavecchia A (2004) An efficient method to make human monoclonal antibodies from memory B cells: potent neutralization of SARS coronavirus. *Nat Med* 10: 871-875.
- Simmons CP, Bernasconi NL, Suguitan AL, Mills K, Ward JM, Chau NV, Hien TT,

- Sallusto F, Ha do Q, Farrar J, de Jong MD, Lanzavecchia A, Subbarao K (2007) Prophylactic and therapeutic efficacy of human monoclonal antibodies against H5N1 influenza. *PLoS Med* 4: e178.
- Frank AL, Six HR, Marchini A (1989) Human monoclonal antibodies to influenza virus: IgG subclass and light chain distribution. *Viral Immunol* 2: 31-36.
- Schieffelin JS, Costin JM, Nicholson CO, Orgeron NM, Fontaine KA, Isern S, Michael SF, Robinson JE (2010) Neutralizing and non-neutralizing monoclonal antibodies against dengue virus E protein derived from a naturally infected patient. *Virol J* 7: 28.
- Dejnirattisai W, Jumnainsong A, Onsirisakul N, Fitton P, Vasanawathana S, Limpitikul W, Puttikhunt C, Edwards C, Duangchinda T, Supasa S, Chawansuntati K, Malasit P, Mongkolsapaya J, Screaton G (2010) Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans. *Science* 328: 745-748.
- Beltramello M, Williams KL, Simmons CP, Macagno A, Simonelli L, Quyen NT, Sukupolvi-Petty S, Navarro-Sanchez E, Young PR, de Silva AM, Rey FA, Varani L, Whitehead SS, Diamond MS, Harris E, Lanzavecchia A, Sallusto F (2010) The human immune response to dengue virus is dominated by highly cross-reactive antibodies endowed with neutralizing and enhancing activity. *Cell Host Microbe* 8: 271-283.
- de Alwis R, Beltramello M, Messer WB, Sukupolvi-Petty S, Wahala WMPB, Kraus A, Olivarez NP, Pham Q, Brian J, Tsai W-Y, Wang W-K, Halstead S, Kliks S, Diamond MS, Baric R, Lanzavecchia A, Sallusto F, de Silva AM (2011) In-depth analysis of the antibody response of individuals exposed to primary dengue virus infection. *PLoS NTG* 5: e1188.
- Wrammert J, Smith K, Miller J, Langley WA, Kokko K, Larsen C, Zheng N-Y, Mays I, Garman L, Helms C, James J, Air GM, Capra JD, Ahmed R, Wilson PC (2008) Rapid cloning of high-affinity human monoclonal antibodies against influenza virus. *Nature* 453: 667-671.
- Kubota-Koketsu R, Mizuta H, Oshita M, Ideno S, Yunoki M, Kuhara M, Yamamoto N, Okuno Y, Ikuta K (2009) Broad neutralizing human monoclonal antibodies against influenza virus from vaccinated healthy donors. *Biochem Biophys Res Commun* 387: 180-185.

Kurosu T, Khamlert C, Phanthanawiboon S, Ikuta Km Anatapreecha S (2010) Highly efficient rescue of dengue virus using a co-culture system with mosquito/mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 394: 398-404.

Yenchitsomanus P, Sricharoen P, Jaruthasana I, Pattanakitsakul S, Nitayaphan S, Mongkolsapaya J, Malasit P (1996) Rapid detection and identification of dengue viruses by polymerase chain reaction (PCR). *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 27: 228-236.

Falconar AKI (1999) Identification of an epitope on the dengue virus membrane (M) protein defined by cross-protective monoclonal antibodies: design of an improved epitope sequence based on common determinants present in both envelope (E and M) proteins. *Arch Virol* 144: 2313-2330.

Toàn bộ nội dung của tất cả các tài liệu tham khảo nêu trên được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn. Ngoài ra, khi lượng, nồng độ, hoặc giá trị hoặc thông số khác được đưa ra dưới dạng hoặc là khoảng, khoảng ưu tiên, hoặc danh sách các giá trị thích hợp trên và các giá trị thích hợp dưới, thì cần được hiểu là sáng chế đề cập cụ thể tất cả các khoảng được tạo thành từ cặp bất kỳ của giới hạn khoảng trên bất kỳ hoặc giá trị ưu tiên và giới hạn khoảng dưới bất kỳ hoặc giá trị ưu tiên, mà không giới hạn ở các khoảng được bộc lộ một cách riêng biệt. Trường hợp một khoảng gồm các giá trị số được nêu ra ở đây, trừ khi có quy định khác, thì khoảng này bao gồm các điểm đầu và các điểm cuối của nó, và tất cả các dạng số nguyên và phân số nằm trong khoảng này. Ngoài ra, phạm vi của sáng chế không bị giới hạn ở các giá trị cụ thể được nêu khi xác định khoảng.

Những phương án khác của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này khi xem xét bản mô tả và việc thực hiện sáng chế. Do đó, bản mô tả và các ví dụ nêu trên chỉ được coi là ví dụ minh họa mà không nằm ngoài phạm vi của sáng chế. Phạm vi bảo hộ của sáng chế sẽ được xác định cụ thể ở phần yêu cầu bảo hộ dưới đây.

Danh sách trình tự

GP11-1015PCT.ST25.txt

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể đơn dòng kháng virus dengue (DENV) hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của kháng thể này có hoạt tính trung hòa đối với các kiểu huyết thanh gồm DENV-1, DENV-2, DENV-3 và DENV-4, trong đó kháng thể đơn dòng bao gồm kháng thể đơn dòng của người hoặc kháng thể đơn dòng được làm cho giống người, và trong đó kháng thể đơn dòng bao gồm các trình tự CDR1, CDR2 và CDR3 thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) như lần lượt được nêu trong các SEQ ID No. 13-15 và các trình tự CDR1, CDR2 và CDR3 thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) như lần lượt được nêu trong các SEQ ID No. 112-114.
2. Kháng thể đơn dòng kháng DENV theo điểm 1, trong đó kháng thể đơn dòng là kháng thể đơn dòng của người được sản xuất bởi tế bào lai được tạo bằng cách dung hợp tế bào đơn nhân trong máu ngoại vi (peripheral blood mononuclear cell - PBMC) của bệnh nhân ở pha cấp tính bị nhiễm DENV với tế bào đối tác dung hợp có khả năng dung hợp tế bào hiệu quả.
3. Kháng thể đơn dòng kháng DENV theo điểm 2, trong đó tế bào đối tác dung hợp là tế bào SPYMEG.
4. Kháng thể đơn dòng kháng DENV hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của kháng thể này theo điểm 1 bao gồm IgG, Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, hoặc dsFv.
5. Kháng thể đơn dòng kháng virus dengue (DENV) hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của kháng thể này, bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó:
 - (a) trình tự axit amin thứ nhất của vùng xác định tính bổ khuyết (complementarity-determining region - CDR) thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID No. 13 của CDR1, SEQ ID No. 14 của CDR2, và SEQ ID No. 15 của CDR3; và
 - (b) trình tự axit amin thứ hai của CDR thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID No. 112 của CDR1, SEQ ID No. 113 của CDR2, và SEQ ID No. 114 của CDR3;
 trong đó kháng thể đơn dòng là kháng thể đơn dòng của người hoặc kháng thể đơn dòng được làm cho giống người.

6. Kháng thể đơn dòng kháng DENV theo điểm 5, trong đó kháng thể đơn dòng là kháng thể đơn dòng của người bao gồm IgG, Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, hoặc dsFv.

7. Phương pháp sản xuất kháng thể đơn dòng của người kháng virus dengue (DENV), phương pháp bao gồm các bước:

(i) sản xuất tế bào lai bằng cách dung hợp tế bào đơn nhân trong máu ngoại vi (PBMC) của bệnh nhân ở pha cấp tính bị nhiễm DENV với tế bào đối tác dung hợp có khả năng dung hợp tế bào hiệu quả;

(ii) thu được kháng thể đơn dòng của người kháng DENV từ tế bào lai,

trong đó kháng thể đơn dòng bao gồm các trình tự CDR1, CDR2 và CDR3 thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) như lần lượt được nêu trong các SEQ ID No. 13-15 và các trình tự CDR1, CDR2 và CDR3 thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) như lần lượt được nêu trong các SEQ ID No. 112-114.

8. Phương pháp sản xuất kháng thể đơn dòng của người kháng DENV theo điểm 7, trong đó tế bào đối tác dung hợp là tế bào SPYMEG.

9. Phương pháp sản xuất tế bào lai bao gồm bước dung hợp tế bào đơn nhân trong máu ngoại vi (PBMC) của bệnh nhân ở pha cấp tính nhiễm virus dengue (DENV) với tế bào đối tác dung hợp có khả năng dung hợp tế bào hiệu quả, trong đó tế bào lai tạo ra hoặc có khả năng tạo ra kháng thể đơn dòng bao gồm các trình tự CDR1, CDR2 và CDR3 thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) như lần lượt được nêu trong các SEQ ID No. 13-15 và các trình tự CDR1, CDR2 và CDR3 thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) như lần lượt được nêu trong các SEQ ID No. 112-114.

10. Phương pháp sản xuất tế bào lai theo điểm 9, trong đó tế bào đối tác dung hợp là tế bào SPYMEG.

11. Phương pháp sản xuất tế bào lai theo điểm 9, trong đó kháng thể đơn dòng của người kháng DENV thu được từ tế bào lai có hoạt tính trung hòa đối với các kiểu huyết thanh gồm DENV-1, DENV-2, DENV-3 và DENV-4.

Fig. 1

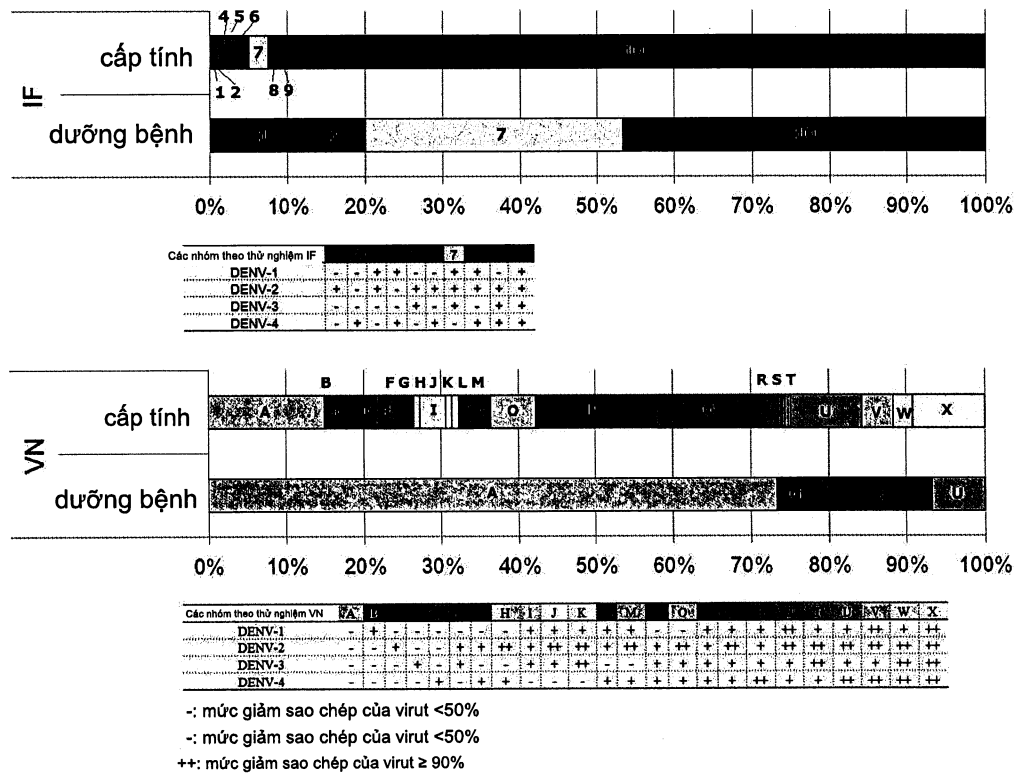


Fig. 2

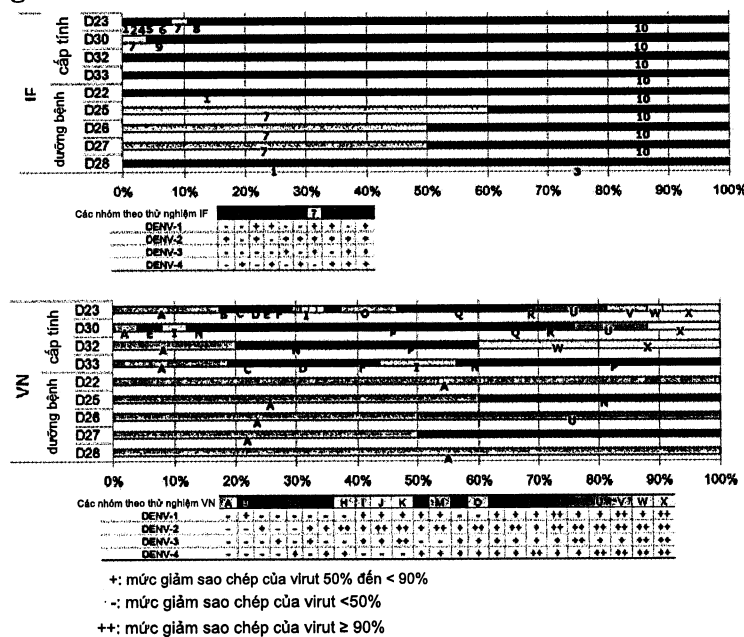


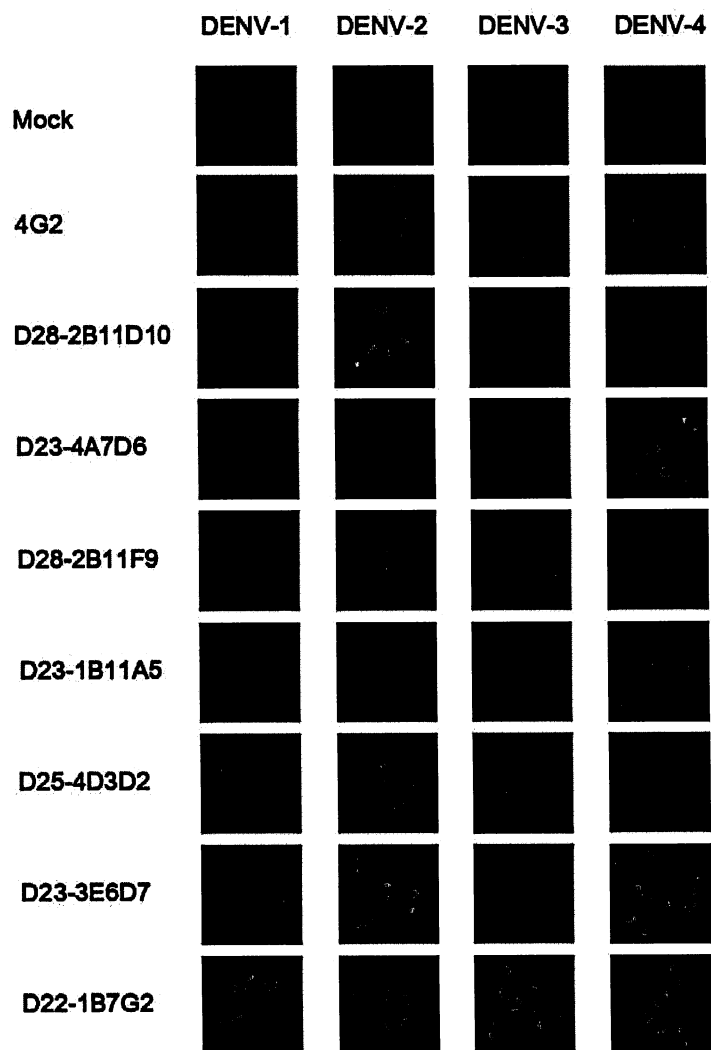
Fig. 3

Fig. 4

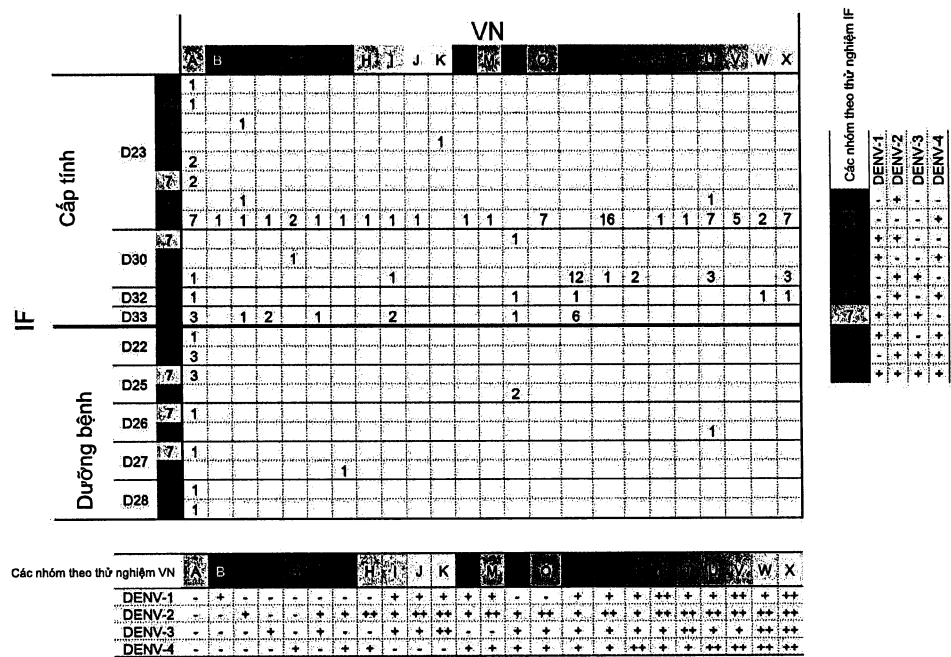


Fig. 5

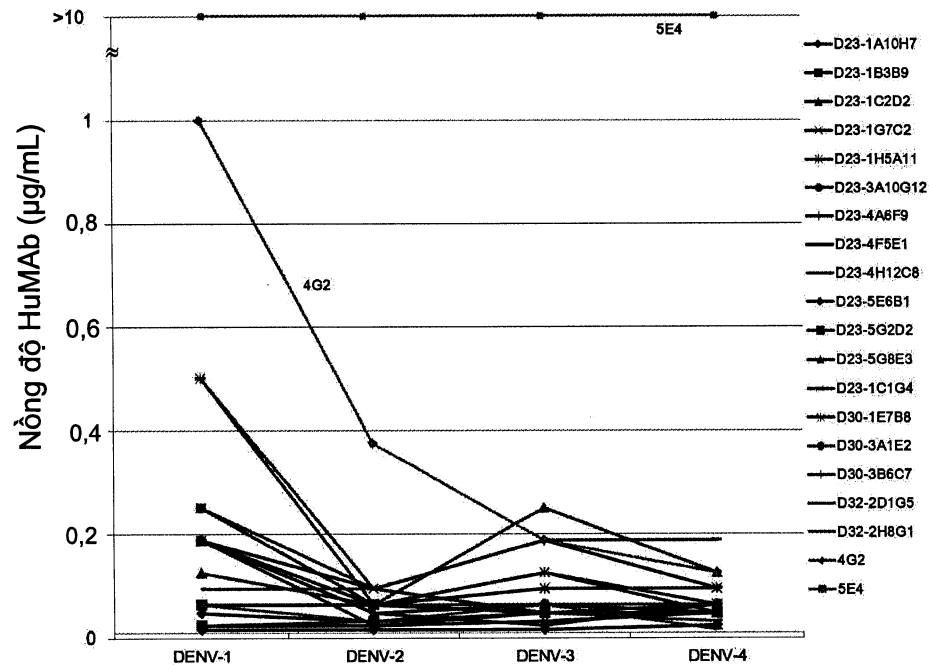


Fig. 6

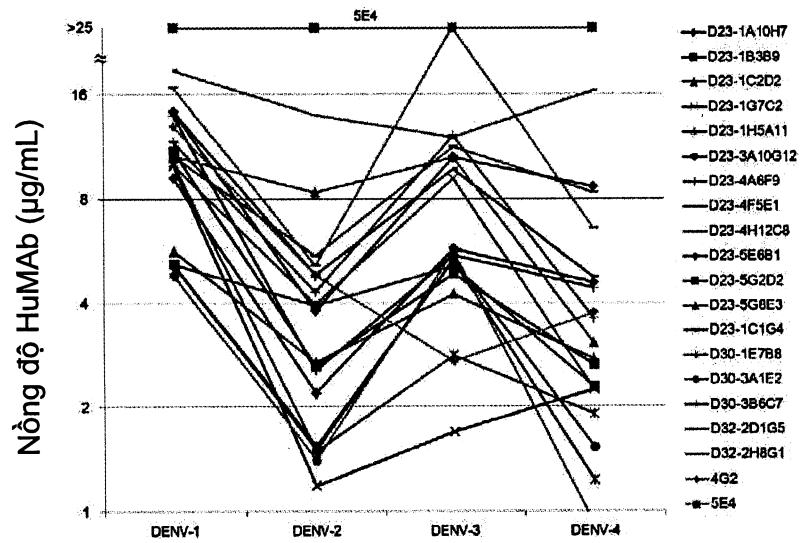


Fig. 7-1

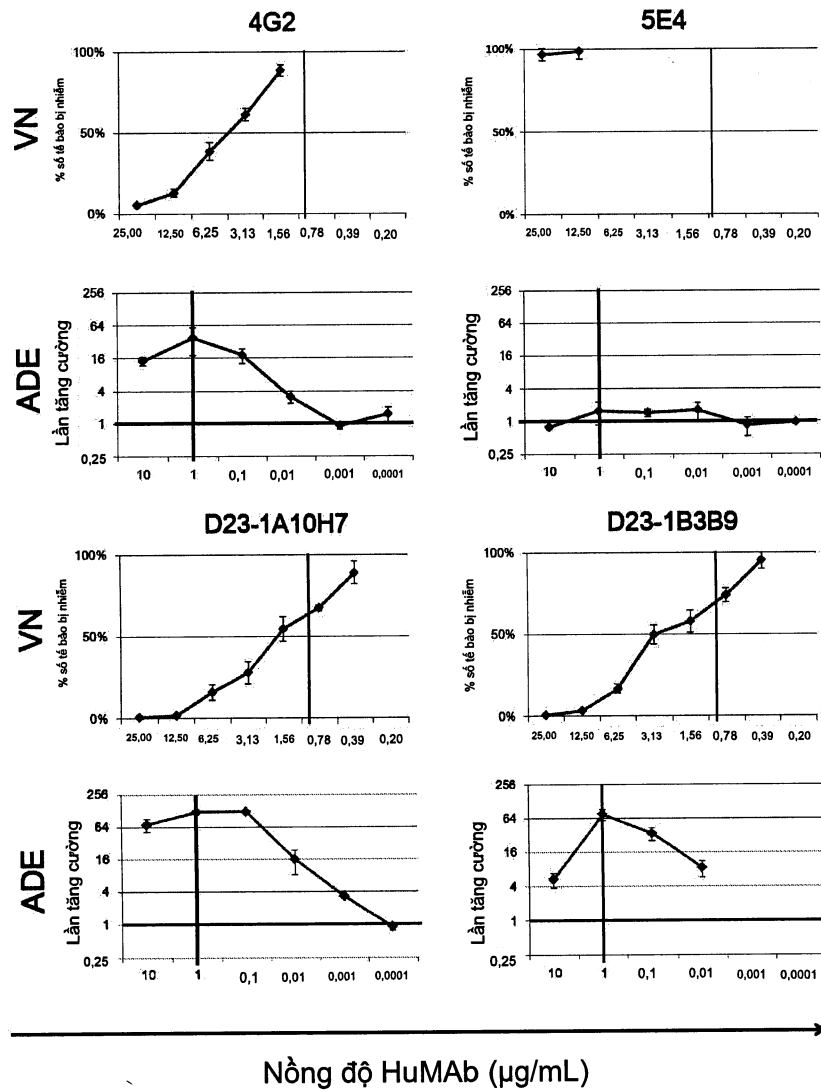


Fig. 7-2

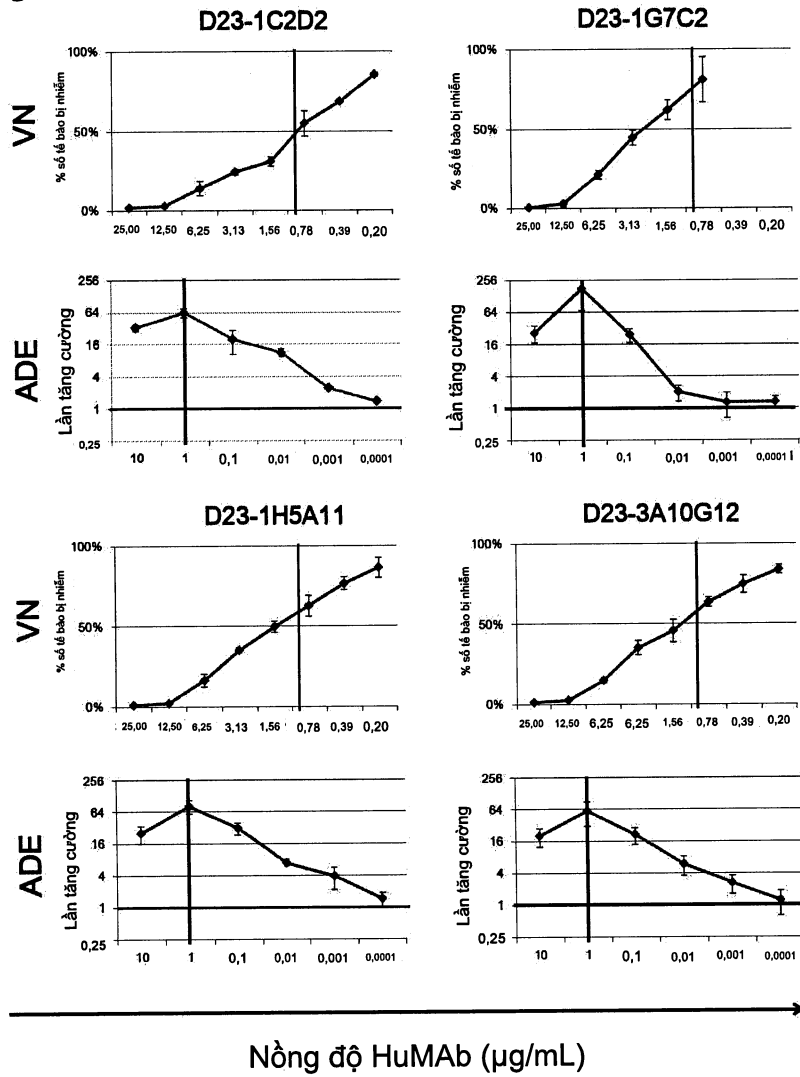


Fig. 7-3

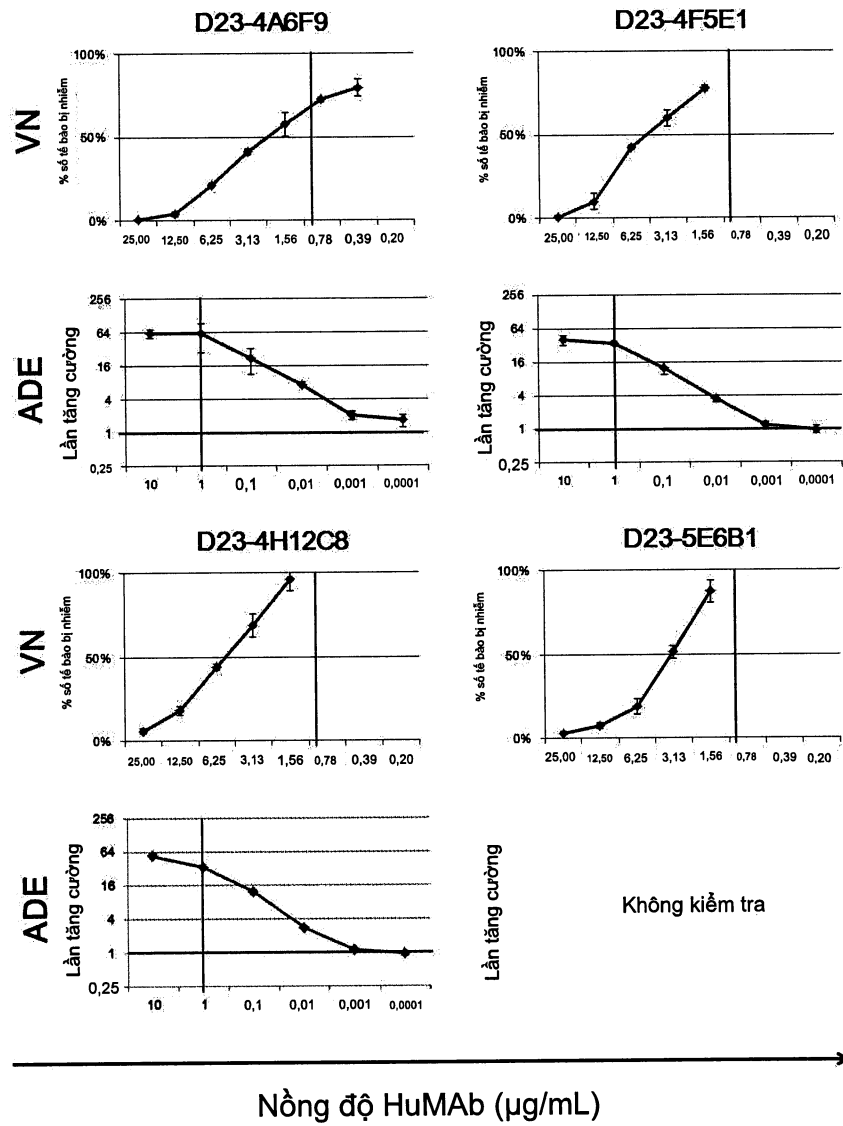


Fig. 7-4

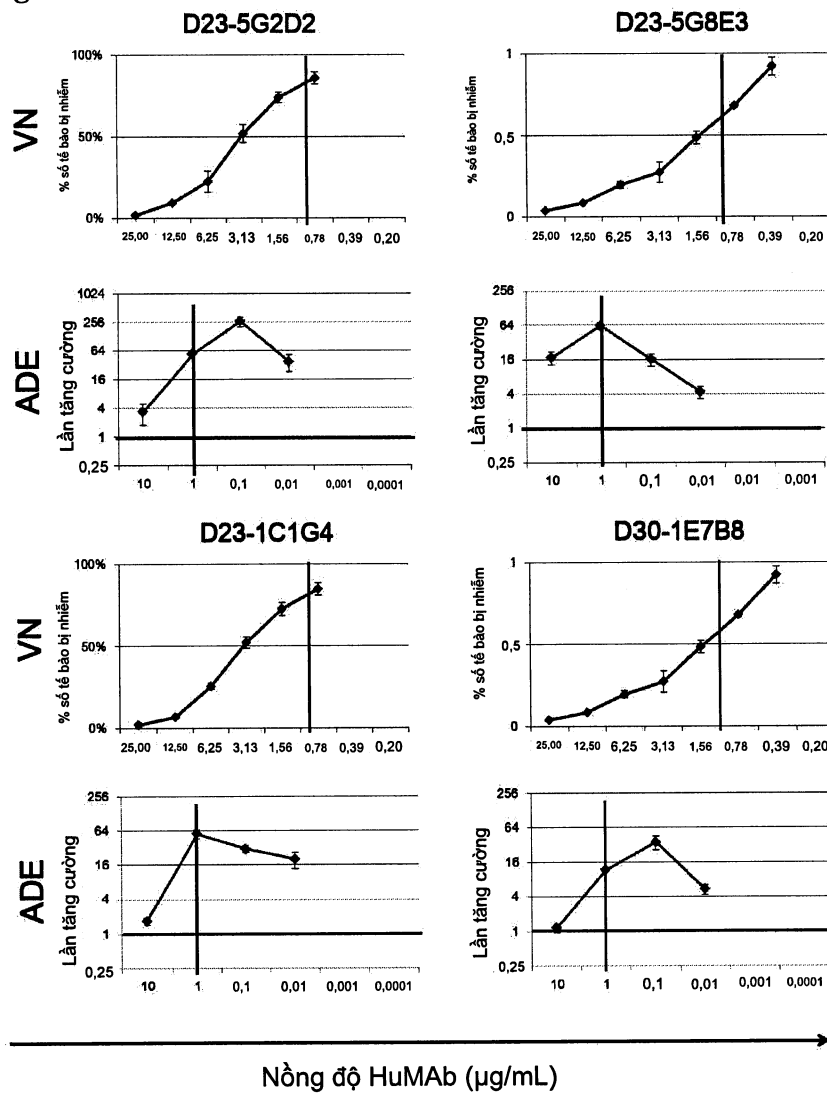


Fig. 7-5

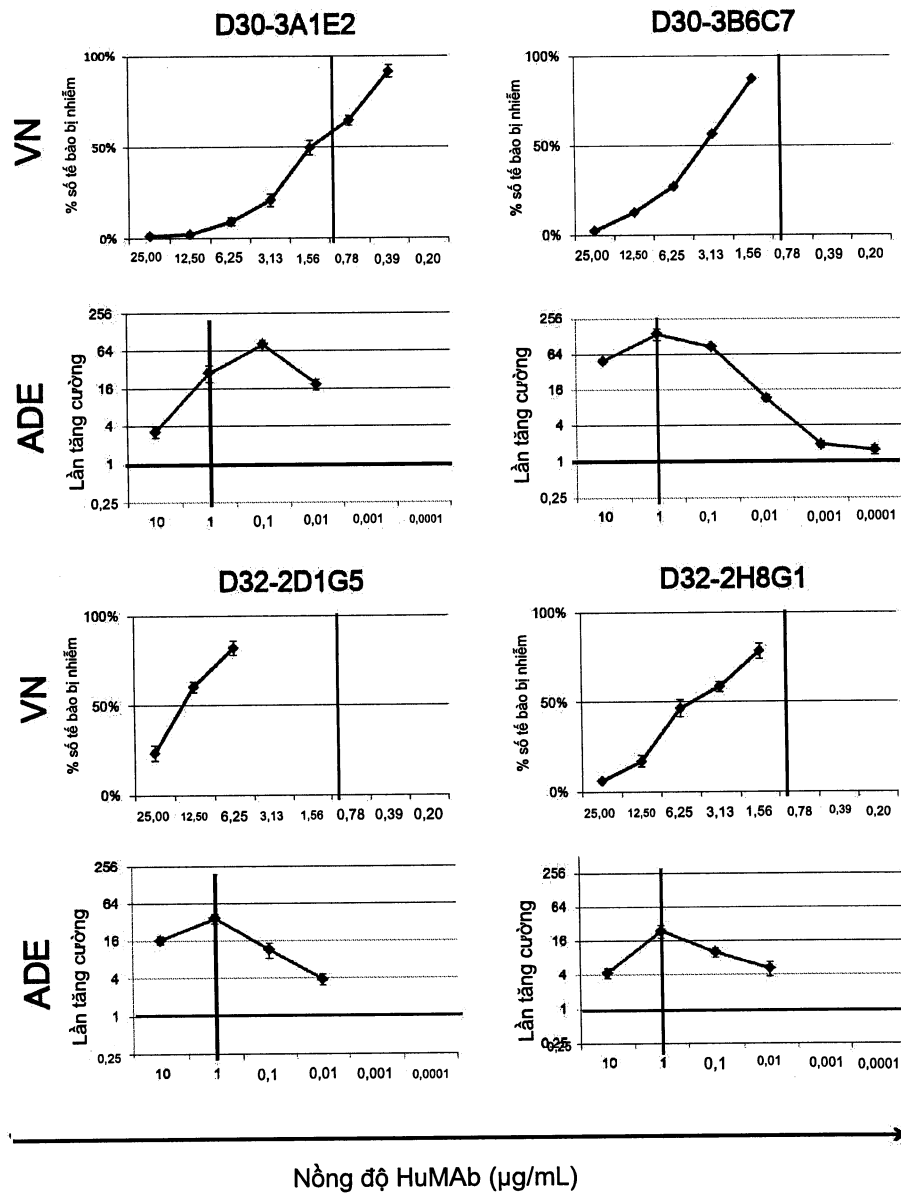


Fig. 8

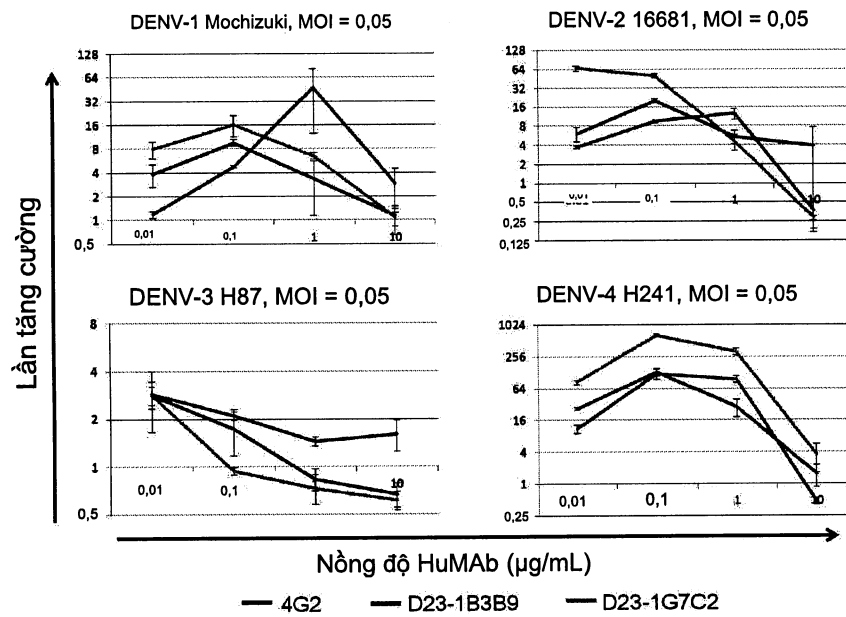


Fig. 9

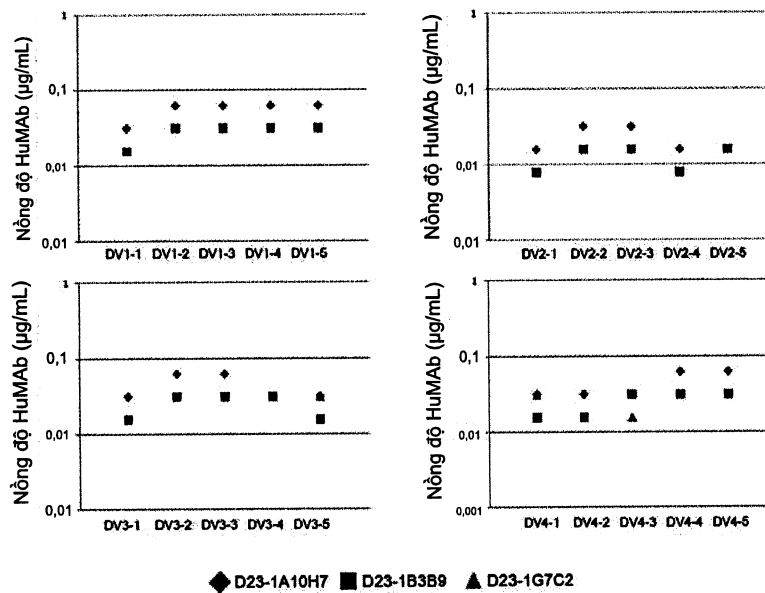


Fig. 10

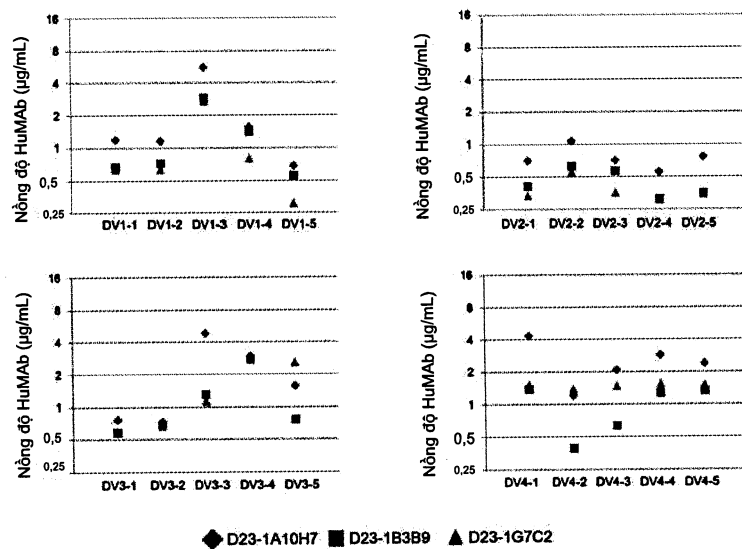


Fig. 11

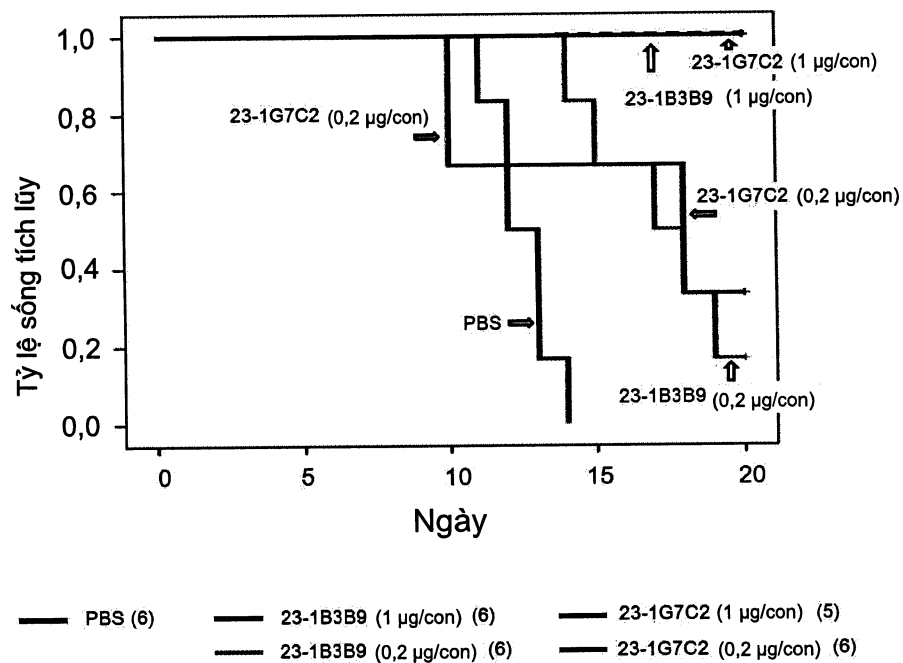


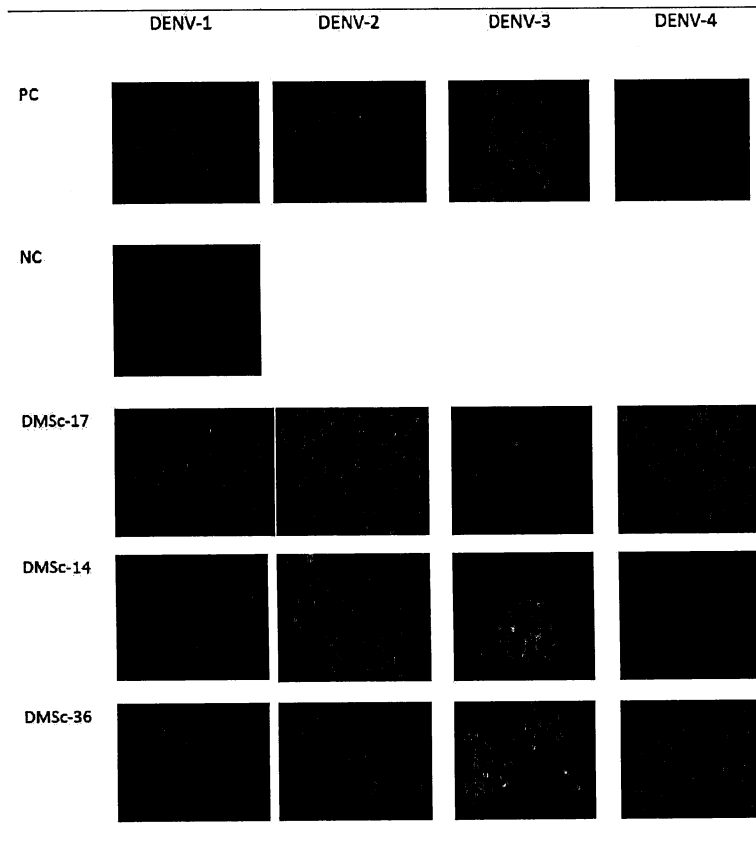
Fig. 12

Fig.12 - Các ví dụ về hình ảnh trong Thử nghiệm huỳnh quang miễn dịch của mẫu đối chứng dương tính, mẫu đối chứng âm tính, các dòng Hybridoma DMSc-17, DMSc-28 và DMSc-36.

Mỗi chất nổi bề mặt từ các dòng DMSc-17, DMSc-28, DMSc-36, mẫu đối chứng dương tính và âm tính (huyết tương pha loãng) được cho phản ứng với 4 kiểu huyết tương của dengue được phủ riêng biệt trong các đĩa vi thể 96 giếng, kháng thể được gắn kết được cho phản ứng với thể liên hợp FITC-IgG kháng người và được làm hiển thị dưới kính hiển vi huỳnh quang. Tất cả các dòng cho thấy tính phản ứng chéo với tất cả 4 kiểu huyết tương của DENV.

Fig. 13

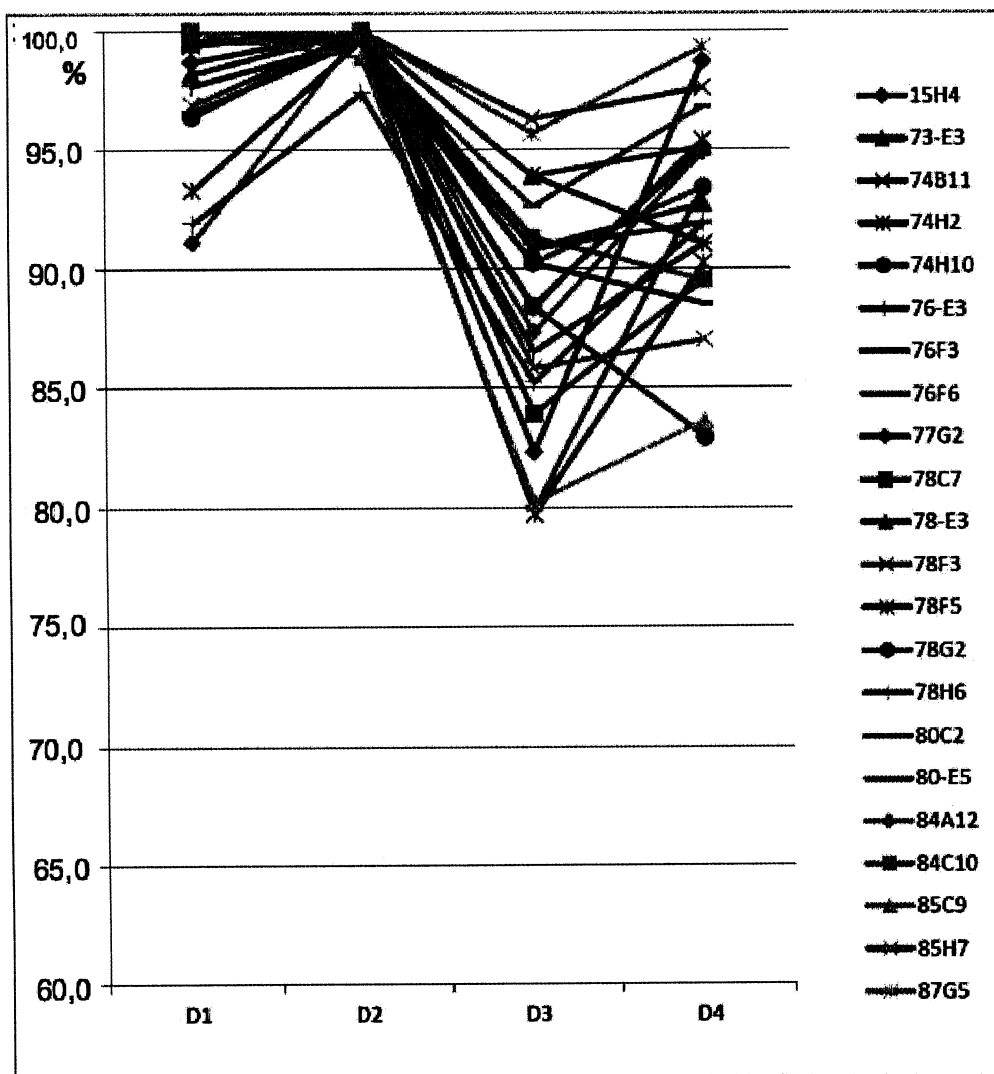


Fig. 13 – Minh họa 22 dòng cho thấy mức giảm VN đối với DENV1, DENV2, DENV3, DENV4 cao hơn 80%. Thử nghiệm VN được thực hiện bằng cách trung hòa DENV với HuMAb chứa trong chất nổi bề mặt và sau đó cho DENV gây nhiễm các tế bào. Chất nổi bề mặt từ mỗi dòng được trung hòa với 50-100 FFU mỗi chủng của 4 kiểu huyết thanh của DENV, (chủng 16007 đối với DENV-1, chủng NGC đối với DENV-2, chủng H87 đối với DENV-3, và chủng H241 đối với DENV-4) trong phản ứng riêng biệt. Một số đám khuẩn lạc được hiển thị bằng cách nhuộm màu DAB. Phần trăm VN được tính từ việc so sánh số lượng đám khuẩn lạc được thấy trong chất nổi bề mặt và trong mẫu đối chứng. Sau đó, 10 dòng (73E3, 74B11, 76F3, 78E3, 78F3, 78G2, 80C2, 84C10, 87G5) cho thấy VN đối với tất cả các kiểu huyết thanh của DENV cao hơn 90%, phần còn lại cho thấy VN đối với tất cả các kiểu huyết thanh của DENV cao hơn 80%.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> OSAKA UNIVERSITY

THE RESEARCH FOUNDATION FOR MICROBIAL DISEASES OF
OSAKA UNIVERSITY

MEDICAL AND BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD

Mahidol University

Department of Medical Sciences (DMSc)

<120> KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG KHÁNG VIRUT GÂY BỆNH SỐT XUẤT
HUYẾT (VIRUT DENGUE) VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT KHÁNG THỂ
NÀY

<130> GP11-1015PCT

<150> US61/532,605

<151> 2011-09-09

<150> US61/532,671

<151> 2011-09-09

<160> 258

<170> PatentIn phiên bản 3.1

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng
biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 1

Asn Tyr Ala Ile Ser

1

5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 2

Gly Val Ile Pro Thr Leu His Thr Thr Asn Tyr Val Glu Arg Phe Gln

1

5

10

15

Gly

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 3

Ser Arg Tyr Tyr Tyr Asp Ser Asp Ala Ser Asn Tyr Gly Met Asp Val

1

5

10

15

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 4

Arg Tyr Ile Met Asn

1 5

<210> 5

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 5

Trp Ile Asp Thr Lys Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln Ala Phe Thr

1 5 10 15

<210> 6

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 6

Thr Leu Ser Gly Tyr Ser Ala Asp Trp Pro Glu Asp Tyr

1 5 10

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 7

Ser Tyr Gly Val Ser

1 5

<210> 8

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 8

Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asp Thr Asn Phe Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 9

<211> 14

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 9

Gly Pro Asp Tyr Glu Ser Ser Asp Ser Pro Trp Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 10

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 10

Ser Tyr Tyr Trp Ser

1 5

<210> 11

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 11

Asn Phe His Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Asp Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 12

<211> 14

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 12

Val Ala Lys Leu Phe Gly Ser Ala Thr Tyr Gly Met Asp Val

1 5 10

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 13

Thr Tyr Ala Ile Ser

1 5

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 14

Gly Ile Ile Pro Leu Tyr Lys Gln Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe Arg

1 5 10 15

Gly

<210> 15

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng

biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 15

Leu Ile Ala Val Ala Gly Ser Glu Gly Ala Gly Ser Phe Asp Ile

1 5 10 15

<210> 16

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 16

Thr Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 17

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 17

Gly Ile Gly Asp Ser Gly His Ser Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 18

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 18

Gly Ser Gln Trp Pro Gly Asp Tyr

1 5

<210> 19

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 19

Asn Tyr Ala Met Thr

1 5

<210> 20

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 20

Ala Ile Gly Gly Ser Gly His Ser Ile Tyr Tyr Gly Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 21

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 21

Gly Ser Gln Trp Pro Gly Asp Tyr

1 5

<210> 22

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 22

Ser Asn Ala Met Ser

1 5

<210> 23

<211> 18

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 23

Gly Val Ser Asn Ser Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1

5

10

15

Gly Arg

<210> 24

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 24

Thr Leu Trp Thr Val Gly Ser Lys Gly Gly Phe Asp Tyr

1

5

10

<210> 25

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 25

Asn Ser Ala Met Ser

1

5

<210> 26

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 26

Ala Phe Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1

5

10

15

Gly

<210> 27

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 27

Val Thr Gly Gly Trp Ser Asp Tyr

1

5

<210> 28

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 28

Thr Tyr Pro Met Asn

1

5

<210> 29

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 29

Trp Ile Asp Thr Asn Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln Ala Phe Thr

1

5

10

15

Gly

<210> 30

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 30

Leu Ser Gly Tyr Ser Ala Asp Trp Pro Glu Asp Tyr

1

5

10

<210> 31

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 31

Arg Tyr Ile Met Asn

1 5

<210> 32

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 32

Trp Ile Asp Thr Lys Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln Ala Phe Thr

1 5 10 15

Gly

<210> 33

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 33

Leu Ser Gly Tyr Ser Ala Asp Trp Pro Glu Asp Tyr

1 5 10

<210> 34

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng

biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 34

Lys Tyr Ala Ile Asn

1 5

<210> 35

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 35

Gly Ile Ile Pro Ile Leu Thr Thr Thr Tyr Ala Gln Arg Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 36

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 36

Ser Thr Tyr Tyr Tyr Asp Gly Ser Asp Leu Thr Tyr Gly Met Asp Val

1 5 10 15

<210> 37

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 37

Asp Tyr Ala Met His

1 5

<210> 38

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 38

Val Ile Ser His Val Gly Thr Ser Thr Tyr Gln Ala Glu Ser Tyr Tyr

1 5 10 15

Ala

<210> 39

<211> 18

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 39

Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Gly Asp Tyr Ser Ser Ser Ala Glu Asn Phe

1 5 10 15

Gln His

<210> 40

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 40

Asn Tyr Ala Ile Ser

1 5

<210> 41

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 41

Ala Ile Ile Pro Met Ser Arg Thr Thr Asp Tyr Ala Gln Lys Phe Arg

1 5 10 15

Gly

<210> 42

<211> 19

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 42

His Arg Ala Val Ala Gly Gly Asp Ser Asp His Asp Glu Asn Asn Trp

1

5

10

15

Phe Gly Pro

<210> 43

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 43

Asp Tyr Tyr Met Ile

1

5

<210> 44

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 44

Tyr Ile Ser Asn Ser Gly Asp Met Thr Tyr His Ala Asp Ser Val Lys

1

5

10

15

Gly

<210> 45

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 45

Gly Met Thr Gly Phe Thr Thr Ser Asn Thr Glu Ser Phe Asp Leu

1

5

10

15

<210> 46

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 46

Gly Ser Ser Phe Tyr

1

5

<210> 47

<211> 18

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 47

Ile Gly Ser Ile Asp Tyr Arg Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu

1 5 10 15

Lys Ser

<210> 48

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 48

Pro Gly Gly Leu Ile Ser Asp Glu Ala Met Ala Gly Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10 15

<210> 49

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 49

Ser Tyr Ser Ile Ser

1 5

<210> 50

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng

biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 50

Gly Thr Ile Pro Phe Phe Gly Arg Ala Ser Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 51

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 51

Ala Gly Pro Ile Ala Ala Thr Gly Val Gln Tyr Glu Met Asp Val

1 5 10 15

<210> 52

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 52

Ser Ser Gly Met His

1 5

<210> 53

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 53

Val Val Ser Phe Asp Gly Ser Lys Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Ala Lys

1

5

10

15

Gly

<210> 54

<211> 18

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 54

Gly Gly Gly Arg Phe Ser Gly Ser Gly Asn Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met

1

5

10

15

Asp Val

<210> 55

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 55

Asp Tyr Gly Ile Gln

1 5

<210> 56

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 56

Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asp Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Leu Gln

1

5

10

15

Ala

<210> 57

<211> 20

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 57

Gly Leu Gly Tyr Cys Ser Asn Thr Asn Cys Asp Ser Tyr Tyr Tyr Tyr

1

5

10

15

Tyr Met Asp Val

20

<210> 58

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 58

Asp His Ala Met His

1 5

<210> 59

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 59

Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Gly Ile Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 60

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 60

Asp Leu Gly His Cys Thr Thr Thr Cys Ser Gly Ser Val Tyr

1 5 10 15

<210> 61

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 61

Thr Tyr Trp Met Asn

1 5

<210> 62

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 62

Asn Ile Lys Gln Asp Gly Thr Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

<210> 63

<211> 19

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 63

Gly Asn Pro Pro Phe Tyr Asp Ile Ser Thr Gly Tyr Gln Gly Ala Tyr

1 5 10 15

Phe Asp Tyr

<210> 64

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 64

Lys Tyr Ala Met Ala

1 5

<210> 65

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 65

Ala Ile Gly Ala Ser Gly Asp Ser Pro Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 66

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 66

Gly Glu Gln Trp Pro Gly Val Leu

1 5

<210> 67

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 67

Thr Tyr Trp Met Asn

1 5

<210> 68

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 68

Asn Ile Lys Gln Asp Gly Thr Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 69

<211> 19

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 69

Gly Asn Pro Pro Phe Tyr Asp Ile Ser Thr Gly Tyr Gln Gly Ala Tyr

1 5 10 15

Phe Asp Tyr

<210> 70

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 70

Asp Asp Ala Tyr Ser Trp Ser

1 5

<210> 71

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 71

Tyr Ile Tyr His Ser Gly Ala Ala Phe Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 72

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 72

Thr Gly Ser Arg Val Leu Asp Pro

1 5

<210> 73

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 73

Ser Phe Ala Met His

1 5

<210> 74

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 74

Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asp Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 75

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 75

Gly Tyr Asn Ser Pro Lys Ser Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 76

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 76

Ala Ser Ala Met Gln

1 5

<210> 77

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 77

Leu Ile Ser Gly Asp Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1

5

10

15

Gly

<210> 78

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 78

Tyr Thr Ala Asp Pro Trp Ala Leu Arg Asp Tyr

1

5

10

<210> 79

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 79

Ser Tyr Val Ile Ser

1 5

<210> 80

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 80

Ser Ile Met Pro Val Phe Gly Ser Thr Gln Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 81

<211> 14

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 81

Thr Ser Ala Ser Ala Gly Arg Pro Thr Tyr Tyr Phe Asp His

1 5 10

<210> 82

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 82

Ala Ser Ala Met Gln

1 5

<210> 83

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 83

Leu Ile Ser Gly Asp Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 84

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 84

Gly Tyr Asn Ser Gly His Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 85

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 85

Thr Tyr Trp Met Asn

1 5

<210> 86

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 86

Asn Ile Lys Gln Asp Gly Thr Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

<210> 87

<211> 19

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 87

Gly Asn Pro Pro Phe Tyr Asp Ile Ser Thr Gly Tyr Gln Gly Ala Tyr

1 5 10 15

Phe Asp Tyr

<210> 88

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 88

Asn Tyr Ala Met His

1 5

<210> 89

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 89

Val Ile Ser Tyr Val Val Thr Thr Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 90

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng

biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 90

Glu Leu Val Ser Ser Glu Trp Asp Ser Asp Ala Glu Tyr Phe Gln Tyr

1 5 10 15

<210> 91

<211> 7

<212> PRT

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 91

Thr Gly Asp Met Cys Leu Ser

1 5

<210> 92

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 92

Leu Ile His Arg Asp Asp Asp Thr Tyr Tyr Ser Thr Ser Leu Lys Thr

1 5 10 15

<210> 93

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 92

Ser Leu Asp Tyr Gly Asp Tyr Val Val Gly Tyr Ala Phe Asp Val

1

5

10

15

<210> 94

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 94

Thr Glu Thr Ile Ser

1

5

<210> 95

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 95

Glu Ile Ile Pro Val Phe Arg Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1

5

10

15

Gly

<210> 96

<211> 14

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 96

Lys Asn Cys Thr Val Asn Ser Cys Tyr Ala Trp Phe Asp Pro

1 5 10

<210> 97

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 97

Ser Tyr Ser Met Asn

1 5

<210> 98

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 98

Ser Ile Ser Thr Thr Ser Ser Phe Ile Ala Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 99

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 99

Val Tyr Cys Ser Thr Thr Ser Cys Ser Pro Asn Tyr Phe Asp Ser

1 5 10 15

<210> 100

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 100

Arg Ala Ser Gln Gly Asn Ser Asn Ala Val Ala

1 5 10

<210> 101

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 101

Gly Ala Ser Arg Leu Glu Arg

1 5

<210> 102

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 102

Gln Gln Tyr Ser Ser Ile Pro Tyr Thr

1 5

<210> 103

<211> 14

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 103

Ala Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Ser Gly His Tyr Ala Asn

1 5 10

<210> 104

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 104

Arg Thr Asp Lys Lys His Ser

1

5

<210> 105

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 105

Leu Leu Tyr Arg Asp Gly Gly Val Val

1

5

<210> 106

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 106

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly AsnAsn Tyr Val Tyr

1

5

10

<210> 107

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 107

Ser Asn Asn GlnArg Pro Ser

1 5

<210> 108

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 108

Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu Ser Arg Pro Val

1 5 10

<210> 109

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 109

Gln Ala Ser Gln Asp Ile Lys Asn His Leu Asn

1 5 10

<210> 110

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 110

Asp Ala Ser Asn Leu Gly Thr

1 5

<210> 111

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 111

His Gln Tyr Glu Asn Leu Pro Ile Thr

1 5

<210> 112

<211> 14

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 112

Thr Gly Thr Ser Gly Asp Val Gly Gly Asp Ser Leu ValSer

1 5 10

<210> 113

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 113

Glu Asp His Lys Arg Pro Ser

1 5

<210> 114

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 114

Cys Ser Tyr Ala Ile Ser Ser Val Arg Val Leu

1 5 10

<210> 115

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 115

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Phe ValTyr

1 5 10

<210> 116

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 116

Ser Asp Asn GlnArg Pro Ser

1 5

<210> 117

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 117

Ala Thr Trp AspAsp Ser Leu Ser Gly Pro Val

1 5 10

<210> 118

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 118

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Ala Asn Asn Tyr Val Tyr

1

5

10

<210> 119

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 119

Ser Thr Asn Gln Arg Pro Ser

1

5

<210> 120

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 120

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Ala Pro Leu

1 5 10

<210> 121

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 121

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala

1 5 10

<210> 122

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 122

Ala Thr Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 123

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng

biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 123

Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Trp Thr

1 5

<210> 124

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 124

Arg Ser Ser Gln Thr Ile Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Asn Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 125

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 125

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 126

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 126

Gln Gln Tyr Tyr Ser Ser Pro Pro Thr

1 5

<210> 127

<211> 14

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 127

Ala Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Ser Gly Tyr Tyr Pro Asn

1 5 10

<210> 128

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 128

Ser Thr Ser Ser Lys His Ser

1 5

<210> 129

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 129

Leu Leu Tyr Tyr Arg Gly Gly Val Val

1 5

<210> 130

<211> 14

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 130

Ala Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Ser Gly Asn Tyr Ala Asn

1 5 10

<210> 131

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 131

Arg Thr Asp Lys Lys His Ser

1 5

<210> 132

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 132

Leu Leu Tyr Arg Asp Gly Gly Val Val

1 5

<210> 133

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 133

Arg Ala Ser Gln Gly Asn Ser Asn Ser Leu Ala

1 5 10

<210> 134

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 134

Ala Ala Ser Arg Leu His Ser

1 5

<210> 135

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 135

Gln Gln Tyr Tyr Ser Ile Pro Tyr Thr

1 5

<210> 135

<211> 14

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 136

Thr Gly Asn Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His

1 5 10

<210> 137

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 137

Ser Asn Thr Asn Arg Pro Ser

1 5

<210> 138

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 138

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Phe Ala Cys Val

1 5 10

<210> 139

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 139

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Gly

1 5 10

<210> 140

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 140

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Gly

1 **5** **10**

<210> 141

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 141

Gln Gln Arg Asp Asn Trp Pro Tyr Thr

1 5

<210> 142

<211> 14

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virut Dengue (DENV)

<400> 142

Thr Gly Arg Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly His Asp Val His

1 5 10

<210> 143

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 143

Gly Asn Asn Ile Arg Pro Ser

1 5

<210> 144

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 144

Gln Ser Tyr Asp Gly Ser Leu Ser Gly Leu Val

1 5 10

<210> 145

<211> 14

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 145

Ala Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Ser Asp Tyr Phe Pro Asn

1 5 10

<210> 146

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 146

His Thr Gly Lys Lys His Ser

1 5

<210> 147

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 147

Leu Leu Tyr His Val Asp Ala His Leu Val

1 5 10

<210> 148

<211> 14

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 148

Thr Gly Ser Ser Arg Asp Phe Gly Asp Tyr Asp His Val Ser

1 5 10

<210> 149

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 149

Asp Val Thr Lys Arg Pro Ser

1 5

<210> 150

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 150

Cys Ser Tyr Ala Gly Ser Tyr Ile Trp Val

1 5 10

<210> 151

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 151

Arg Ala Ser Gln Asn Ile Ala Lys Tyr Leu Asn

1

5

10

<210> 152

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 152

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1

5

<210> 153

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 153

Leu Gln Thr Tyr Thr Ala Pro Leu Thr

1

5

<210> 154

<211> 14

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 154

Thr Gly Thr Asn Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Phe Val Ser

1

5

10

<210> 155

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 155

Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser

1

5

<210> 156

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 156

Ser Ser Tyr Thr Thr Ser Ser Thr Leu Val

1

5

10

<210> 157

<211> 14

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 157

Thr Gly Ala Asp Ser Asp Val Gly Val Tyr Ser Leu Val Ser

1 5 10

<210> 158

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 158

Glu Gly Thr Lys Arg Pro Ser

1 5

<210> 159

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 159

Cys Ser Tyr Ala Gly Val Thr Thr Pro Gly Ile Val

1 5 10

<210> 160

<211> 14

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 160

Thr Gly Ala Asp Ser Asp Val Gly Val Tyr Ser Leu Val Ser

1 5 10

<210> 161

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 161

Glu Gly Thr Lys Arg Pro Ser

1 5

<210> 162

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 162

Cys Ser Tyr Ala Gly Val Thr Thr Pro Gly Ile Val

1

5

10

<210> 163

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 163

Ser Gly Ser Thr Ser Asn Ile Gly Asn Asn Tyr Val Tyr

1

5

10

<210> 164

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 164

Asn Asn Asn Gln Arg Pro Ser

1

5

<210> 165

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 165

Thr Ala Trp Asp Asp Tyr Leu Ser Gly Pro Leu

1 5 10

<210> 166

<211> 14

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 166

Thr Gly Ala Asp Ser Asp Val Gly Val Tyr Ser Leu Val Ser

1 5 10

<210> 167

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 167

Glu Gly Thr Lys Arg Pro Ser

1 5

<210> 168

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 168

Cys Ser Tyr Ala Gly Val Thr Thr Pro Gly Ile Val

1

5

10

<210> 169

<211> 14

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 169

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Phe Val Ser

1

5

10

<210> 170

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 170

Glu Val Ile Lys Arg Pro Ser

1

5

<210> 171

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 171

Ser Ser Tyr Gly Gly Asn Asn Asn Val Val

1

5

10

<210> 172

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 172

Ser Gly Ser Ile Ser Asn Ile Gly Asn Asn Tyr Val Ser

1

5

10

<210> 173

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 173

Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser

1 5

<210> 174

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 174

Gly Thr Trp Asp Gly Ser Leu Ser Ala Leu

1 5 10

<210> 175

<211> 14

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 175

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Ser ValSer

1 5 10

<210> 176

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 176

Glu Val Asn Lys Arg Pro Ser

1 5

<210> 177

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 177

Asn Ser Tyr Ala Gly Ser Lys Ile Val

1 5

<210> 178

<211> 14

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 178

Thr Gly Thr Gly Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser

1 5 10

<210> 179

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 179

Asp Val Ser Lys Arg Pro Ser

1 5

<210> 180

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 180

Cys Ser Tyr Val Gly Ser Tyr Thr Trp Val

1 5 10

<210> 181

<211> 14

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 181

Thr Gly Pro Ser Ser Asp Val Gly Asp Tyr Asn Tyr ValSer

1 5 10

<210> 182

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 182

Asp Val Thr Glu Arg Pro Ser

1 5

<210> 183

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 183

Ser Ser Tyr Arg Ile Asn Asn Thr Pro Ile

1 5 10

<210> 184

<211> 14

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 184

Thr Gly Ala Asp Ser Asp Val Gly Val Tyr Ser Leu Val Ser

1 5 10

<210> 185

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 185

Glu Gly Thr Lys Arg Pro Ser 1 5

<210> 186

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 186

Cys Ser Tyr Ala Gly Val Thr Thr Pro Gly Ile Val

1

5

10

<210> 187

<211> 14

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 187

Thr Gly Thr Ile Ser Asp Ile Gly Gly His Asn Asp Val Ser

1

5

10

<210> 188

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 188

Asp Val Asn Lys Arg Pro Ser

1 5

<210> 189

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 189

Cys Ser Tyr Ala Gly Arg Trp Val

1 5

<210> 190

<211> 14

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 190

Ala Gly Thr Ser Ser Asp Ile Asn Asp Tyr Asn Tyr Val Ser

1 5 10

<210> 191

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 191

Glu Val Ser Lys Arg Pro Ser

1 5

<210> 192

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 192

Asn Ser Phe Thr Ser Ser Ser Pro Ser Val Leu

1 5 10

<210> 193

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng

biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 193

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 194

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 194

Ser Ala Phe Asn Arg Ala Thr

1 5

<210> 195

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 195

Gln Gln Leu Arg Thr

1 5

<210> 196

<211> 14

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 196

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser

1 5 10

<210> 197

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 197

Asp Val Ser Lys Arg Pro Ser

1 5

<210> 198

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ khuyết (CDR) thuộc vùng biến đổi của kháng thể kháng virus Dengue (DENV)

<400> 198

Cys Ser Tyr Ala Gly Thr Tyr Thr

1 5

<210> 199

<211> 23

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> PCR mẫu cho DENV

<400> 199

tggtgtgtgc acagacaatg gtt

23

<210> 200

<211> 23

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> PCR mẫu cho DENV

<400> 200

gctgtgtcac ccagaatggc cat

23

<210> 201

<211> 21

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> PCR mẫu cho DENV

<400> 201

gggggttcaa catcccaaga g

21

<210> 202

<211> 23

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>	
<223> PCR môi cho DENV	
<400> 202	
gcttagtttc aaagctttt cac	23
<210> 203	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> PCR môi cho DENV	
<400> 203	
atccagatgt catcaggaaa c	21
<210> 204	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> PCR môi cho DENV	
<400> 204	
ccggctctac tcctatgatg	20
<210> 205	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> PCR môi cho DENV	
<400> 205	
caatgtgctt gaataccttt gt	22

<210> 206

<211> 20

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> PCR môi cho DENV

<400> 206

ggacaggctc ctccttcttg

20

<210> 207

<211> 21

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> PCR môi cho DENV

<400> 207

ggacaacagt ggtgaaagtc a

21

<210> 208

<211> 22

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> PCR môi cho DENV

<400> 208

ggttacactg ttggtattct ca

22

<210> 209

<211> 24

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> PCR môi cho DENV

<400> 209

caatatgctg aaacgcgaga gaaa

24

<210> 210

<211> 24

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> PCR môi cho DENV

<400> 210

ccccatctat tcagaatccc tgct

24

<210> 211

<211> 20

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> PCR môi cho DENV

<400> 211

accacagtcc atgcatcac

20

<210> 212

<211> 20

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> PCR môi cho DENV

<400> 212

tccaccaccc tgggtgctga

20

<210> 213

<211> 47

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> DNA đoạn ngắn

<400> 213

ggccgcaggc gatattctacc cctacgacgt gcccgactac gcctgag

47

<210> 214

<211> 47

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> DNA đoạn ngắn

<400> 214

gatactcagg cgtagtcggg cacgtcgtag gggtagatat cgcctgc

47

<210> 215

<211> 37

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> DNA đoạn ngắn

<400> 215

ggcgcggccg ccatgcgttg cataggaata tcaaata

37

<210> 216

<211> 35

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> DNA đoạn ngắn

<400> 216

gcggatatct caggcctgca ccataactcc caaat

35

<210> 217

<211> 35

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> DNA đoạn ngắn

<400> 217

ggagcggccg cgttcattt aaccacacgt aacgg

35

<210> 218

<211> 34

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> DNA đoạn ngắn

<400> 218

ggcgatatcg gcctgcacca tgactcccaa atac

34

<210> 219

<211> 29

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> DNA đoạn ngắn

<400> 219

atcgactaca aagacgatga cgacaagct

29

<210> 220

<211> 40

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> DNA đoạn ngắn

<400> 220

tcgatcaaag cttgtcgtca tcgtctttgt agtcgatatc 40

<210> 221

<211> 38

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> DNA đoạn ngắn

<400> 221

cgagatctgc caccatgttc catttaacca cacgtaac 38

<210> 222

<211> 36

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> DNA đoạn ngắn

<400> 222

cgccccgggg atatctgtca ttgaaggagt gacagc 36

<210> 223

<211> 36

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> DNA đoạn ngắn

<400> 223

ggatctccag ccatgaatga ccaacggaaa aaggcg 36

<210> 224

<211> 37

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> DNA đoạn ngắn

<400> 224

gtcgatgggg atatctctgc gtctcctatt caagatg

37

<210> 225

<211> 39

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> DNA đoạn ngắn

<400> 225

ggcggatccg ccatggccga tagtggttgc gttgtgagc

39

<210> 226

<211> 34

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> DNA đoạn ngắn

<400> 226

gcgctcgagt caggctgtga ccaaggagtt gacc

34

<210> 227

<211> 26

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> DNA đoạn ngắn

<400> 227

atgaaacacc tgtggttctt cctcct

26

<210> 228

<211> 24

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> DNA đoạn ngắn

<400> 228

ccttggtgtt gctgggcttg tgat

24

<210> 229

<211> 24

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> DNA đoạn ngắn

<400> 229

atggcctggw yycctctcyt ycts

24

<210> 230

<211> 25

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> DNA đoạn ngắn

<400> 230

tggcagctgt agcttctgtg ggact

25

<210> 231

<211> 23

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> DNA đoạn ngắn

<400> 231	
tggtgtgtgc acagacaatg gtt	23
<210> 232	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> DNA đoạn ngắn	
<400> 232	
gctgtgtcac ccagaatggc cat	23
<210> 233	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> DNA đoạn ngắn	
<400> 233	
ggggcttcaa catccaaga g	21
<210> 234	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> DNA đoạn ngắn	
<400> 234	
gcttagtttc aaagctttt cac	23
<210> 235	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Trình tự nhân tạo	

<220>	
<223> DNA đoạn ngắn	
<400> 235	
atccagatgt catcaggaaa c	21
<210> 236	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> DNA đoạn ngắn	
<400> 236	
ccggctctac tcctatgatg	20
<210> 237	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> DNA đoạn ngắn	
<400> 237	
caatgtgctt gaataccttt gt	22
<210> 238	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> DNA đoạn ngắn	
<400> 238	
ggacaggctc ctccttcttg	20
<210> 239	
<211> 21	

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> DNA đoạn ngắn

<400> 239

ggacaacagt ggtgaaagtc a

21

<210> 240

<211> 22

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> DNA đoạn ngắn

<400> 240

ggttacactg ttgtattct ca

22

<210> 241

<211> 24

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> DNA đoạn ngắn

<400> 241

atggactgga cctggaggat cctc

24

<210> 242

<211> 26

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> DNA đoạn ngắn

<400> 242

atggacatac ttgttcac gctcct

26

<210> 243

<211> 26

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> DNA đoạn ngắn

<400> 243

atgaaacacc tgtggttctt cctcct

26

<210> 244

<211> 26

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> DNA đoạn ngắn

<400> 244

atgtctgtct ccttcctcat cttcct

26

<210> 245

<211> 24

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> DNA đoạn ngắn

<400> 245

atggagtttg ggctgagctg ggtt

24

<210> 246

<211> 23

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> DNA đoạn ngắn

<400> 246	
atgggggtcaa ccgccatcct cgc	23
<210> 247	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> DNA đoạn ngắn	
<400> 247	
ccttggtgtt gctgggcttg tgat	24
<210> 248	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> DNA đoạn ngắn	
<400> 248	
atggacatga gggccccgc tcag	24
<210> 249	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> DNA đoạn ngắn	
<400> 249	
atgaggctcc ctgctcagct cctg	24
<210> 250	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Trình tự nhân tạo	

<220>

<223> DNA đoạn ngắn

<400> 250

atggaarccc cagcgcagct tctc

24

<210> 251

<211> 26

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> DNA đoạn ngắn

<400> 251

atggtgttgc agacccaggt cttcat

26

<210> 252

<211> 24

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> DNA đoạn ngắn

<400> 252

atggggtccc aggttcacct cctc

24

<210> 253

<211> 25

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> DNA đoạn ngắn

<400> 253

gagttaccgc attggagggc gttat

25

<210> 254

<211> 24

<212> DNA	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> DNA đoạn ngắn	
<400> 254	
atggcctggw yycctctcyt ycts	24
<210> 255	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> DNA đoạn ngắn	
<400> 255	
atggcctgga tgatgcttct cctcg	25
<210> 256	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> DNA đoạn ngắn	
<400> 256	
atgscctggg ctcykctset ccts	24
<210> 257	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> DNA đoạn ngắn	
<400> 257	
atggcctggr ycycmytcyw cctm	24

<210> 258

<211> 25

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> DNA đoạn ngắn

<400> 258

tggcagctgt agcttctgtg ggact

25