



(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)



1-0031934

(51)<sup>7</sup> A61K 38/00; C07K 14/00

(13) B

(21) 1-2016-03701

(22) 26/02/2015

(86) PCT/CU2015/000002 26/02/2015

(87) WO2015/131858 11/09/2015

(30) CU 2014-0026 03/03/2014 CU

(45) 25/05/2022 410

(43) 25/01/2017 346A

(73) CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA (CU)

Ave. 31 entre 158 y 190, Cubanacán, Playa, La Habana 11600, Cuba

(72) CHINEA SANTIAGO, Glay (CU); HUERTA GALINDO, Vivian (CU); MARTÍN DUNN, Alejandro, Miguel (CU); GARAY PÉREZ, Hilda, Elisa (CU); REYES ACOSTA, Osvaldo (CU); FALCÓN CAMA, Viviana (CU); PUPO GÓMEZ, Dianne (CU); YERO DÍAZ, Alexis (CU); MÁRQUEZ PERERA, Gabriel, Jesús (CU); SARRÍA NÚÑEZ, Mónica (CU); GUIROLA CRUZ, Osmany (CU); GARATEIX SUÁREZ, Rocío (CU); ALVAREZ PÉREZ, Karen (CU); GONZÁLEZ BLANCO, Sonia (CU); VÁZQUEZ CASTILLO, Mariela (CU); GONZÁLEZ LÓPEZ, Luis, Javier (CU).

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

(54) PEPTIT CÓ CẤU TRÚC KẸP TÓC BETA CÓ HOẠT TÍNH KHÁNG VIRUT DENGUE VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA PEPTIT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến các peptit tổng hợp đã được quy định về mặt cấu trúc mà đã được tối ưu hóa để tạo ra cấu trúc kẹp tóc beta. Các peptit này có thể ức chế hoặc làm thuyên giảm bệnh nhiễm do virus Dengue (Dengue virus - DENV). Sáng chế còn đề cập đến dược phẩm và thuốc chứa các peptit tổng hợp này, có tác dụng để phòng và/hoặc điều trị bệnh nhiễm DENV.

### Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực thuốc và ngành công nghiệp dược phẩm, và đặc biệt đề cập đến việc thiết kế và thu các peptit tổng hợp biểu hiện hoạt tính kháng virus chống virus Dengue (Dengue virus - DENV). Cấu trúc bậc một của các peptit này được thiết kế để tạo thuận lợi cho việc tạo ra cấu trúc kẹp tóc beta có hiệu quả và để bắt chước mảnh chức năng của miền III của protein vỏ (DIIE) của DENV. Sáng chế còn đề cập đến dược phẩm chứa các peptit tổng hợp này, được dùng để phòng và/hoặc điều trị bệnh nhiễm DENV.

### Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

DENV là thành viên thuộc họ *Flaviviridae*, bao gồm các virus có vỏ mà hệ gen của chúng chứa phân tử axit ribonucleic (ARN) sợi đơn có nghĩa dương. Có ba chi khác nhau trong họ *Flaviviridae*: *Flavivirus*, *Hepacivirus* và *Pestivirus*. *Flavivirus* bao gồm trên 70 virus đã biết, trong số đó nhiều virus gây ra các bệnh quan trọng về mặt lâm sàng, như virus gây bệnh sốt vàng da (Yellow Fever Virus - YFV) và virus Dengue (DENV). Các virus thuộc chi *Flavivirus* mà gây bệnh ở người thường được mang bởi động vật chân đốt (bét và muỗi), và do đó, việc tiêu diệt các bệnh này là nhiệm vụ cực kỳ khó (Monath, T. P., F. X. Heinz. 1996. *Flaviviruses*, p. 961–1034. In: B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley (ed.), *Fields virology*, 3rd ed., vol. 1. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Pa.).

Bệnh nhiễm DENV đã đạt tới tỷ lệ dịch lớn ở các vùng nhiệt đới trên thế giới, và sự tái xuất hiện gần đây của chúng tạo ra thách thức ngày càng khó khăn đối với hệ thống y tế công cộng của các quốc gia bị ảnh hưởng. Khoảng 100 triệu trường hợp nhiễm DENV được ước tính xảy ra hàng năm, và 2,5 tỷ người sống trong các khu vực mà DENV là dịch địa phương (Gubler, D.J. (1998). *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 480-496; Monath, T.P. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 91, 2395-2400). Trong giai đoạn 1990-1998, trung bình 514.139 ca và 15.000 ca tử vong do sốt xuất huyết DENV (DENV hemorrhagic fever - DHF) gây ra được thông báo mỗi năm cho Tổ chức Y tế thế giới (World Health Organization - WHO), mặc dù tỷ lệ mắc DHF thực tế được ước tính là cao hơn gấp vài lần. Không có vắc xin chống DENV có bán trên thị trường, và không có biện pháp đặc hiệu chống virus này.

Thuật ngữ DENV thực ra được dùng để chỉ phức hợp bao gồm bốn virus hoặc kiểu huyết thanh có liên quan về mặt kháng nguyên và di truyền, được gọi tên là DENV1 đến DENV4. DENV được truyền sang người thông qua sự đốt của một số ít loài muỗi, chủ yếu là *Aedes aegypti*. Các biểu hiện lâm sàng của bệnh nhiễm trùng thu được có thể thay đổi từ bệnh không triệu chứng hoặc tình trạng sốt nhẹ đến DHF nặng hơn và hội chứng sốc Dengue (Dengue shock syndrome - DSS) có thể nguy hiểm đến tính mạng. Các biểu hiện lâm sàng nghiêm trọng nhất có liên quan đến các bệnh nhiễm trùng thứ phát mà ở đó virus thuộc kiểu huyết thanh khác với kiểu huyết thanh của bệnh nhiễm trùng nguyên phát (*Kourí GP et al. (1987) Trans Roy Soc Trop Med Hyg; 72: 821-823; Halstead, S.B (2003). Adv. Virus Res. 60:421-67*). Quan sát này đã được giải thích thông qua giả thuyết về sự tăng cường phụ thuộc kháng thể, giả thuyết này cho rằng khả năng gây nhiễm của virus thực tế có thể được tăng cường thông qua việc tạo ra phức hợp virus-kháng thể không trung hòa, mà sẽ tạo ra cho virus gây nhiễm một cổng xâm nhập bổ sung đến tế bào đích thông qua các thụ thể Fc (*Halstead SB. (1988). Science; 239: 476-481*).

Bước thứ nhất của chu trình sao chép của virus là gắn kết các virion vào bề mặt của tế bào chủ của chúng. Đã thấy rằng virion DENV gắn vào glycosaminoglycan bề mặt tế bào, và đây được coi là phân tử làm trung gian sự tương tác ban đầu của virus gây nhiễm với tế bào đích. Một phân tử DENV khác cũng thấy gắn kết vào là DC-SIGN (dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin - phân tử bám dính gian bào-3-bắt giữ không phải integrin đặc hiệu tế bào đuôi gai), lectin typ C đặc hiệu tế bào đuôi gai. Tuy nhiên, cho rằng cả hai phân tử đóng vai trò thụ động, tích lũy virus trên bề mặt tế bào hoặc làm thuận lợi cho sự phân tán *in vivo* của chúng đến các vị trí nhiễm thứ phát. Sự xâm nhập có hiệu quả của virus cần sự nhập bào qua trung gian thụ thể thông qua các tương tác liên tiếp với các thụ thể hoặc đồng thụ thể có ái lực cao bổ sung, dẫn đến sự nội hóa virion gây nhiễm. Ngay khi virion này đi đến gian nội bào, hậu quả giảm độ pH kích hoạt quá trình dung hợp vỏ virus và màng thể nội bào, mà có nguyên nhân từ sự thay đổi cấu trúc trong protein dung hợp của virus. Kết quả cuối cùng của việc dung hợp này là sự giải phóng vỏ capsit của virus vào trong tế bào chất, tiếp theo là sự giải phóng ARN hệ gen của chúng. Sau đó, ARN trần của virus trong tế bào chất tương tác thông qua vùng không được dịch mã 5' của nó (5'UTR) với ribosom, và một khung đọc mở (open reading frame - ORF) mà nó chứa được dịch mã vào trong polyprotein tiền chất của virus. Ở chi *Flavivirus*, tiền chất polyprotein này chứa ba protein cấu trúc (vỏ capsit (C) màng

(prM) và vỏ (E)) và năm protein không cấu trúc (NS1-5) mà thu được bằng cách biến đổi đồng dịch mã và sau dịch mã bởi các proteaza của virus và tế bào chủ. Polymeraza ARN phụ thuộc ARN virus tạo ra bản sao ARN sợi đơn đối nghĩa, mà sau đó nó có chức năng như các khuôn mẫu để tổng hợp ARN hệ gen sợi đơn có nghĩa dương. Đã thấy rằng các protein của virus tham gia trong quá trình sao chép ARN của nó về mặt vật lý có liên quan đến cấu trúc màng, có thể liên quan đến mạng lưới nội chất (endoplasmic reticulum - ER).

Sau khi sao chép, ARN hệ gen của DENV kết hợp với protein vỏ capsit và, thông qua màng của ER nhám hoặc trong cấu trúc màng tạo ra bởi virus, vỏ capsit thu được nảy chồi vào trong khoang ER, đã được bao bằng vỏ màng lipid chứa protein của virus. Sau đó, các virion chưa trưởng thành này đi vào quá trình tiết, và cuối cùng được giải phóng vào khoảng trống ngoại bào dưới dạng virion trưởng thành.

Như đã nêu trên, hệ gen DENV là phân tử ARN có nghĩa dương sợi đơn dài khoảng 11 kb (*Henchal, E.A. & Putnak, J.R. (1990). Clin. Microbiol. Rev. 3, 376-396*) chứa ORF mà chiều dài chính xác của nó thay đổi giữa các kiểu huyết thanh virus khác nhau và thậm chí giữa các chủng có cùng kiểu huyết thanh (*Yabar V.C. (2003). Rev. Perú. Med. Exp. Salud Publica 20, 51-57*). Một phần tư gần đầu 5' của ORF này mã hóa các protein cấu trúc, và phần còn lại mã hóa các polypeptit không cấu trúc (*Lindenbach, B.D. & Rice, C.M. (1999). J. Virol. 73, 4611-4621*).

Protein E của DENV và mọi flavivirus khác đóng vai trò cơ bản trong việc gắn kết của virion trưởng thành với thụ thể tế bào, dung hợp màng trong khi virus xâm nhập và lắp ráp virion. Vì vậy, nó ảnh hưởng đến một số đặc điểm cơ bản của virus, như phạm vi vật chủ, độc lực và sự gây miễn dịch bảo vệ (*Modis, Y., et al. (2005). J. Virol. 79, 1223-1231*).

Protein E có khối lượng phân tử nằm trong khoảng từ 53 đến 54 kDa. Nó được bảo toàn nhất trong số tất cả các polypeptit cấu trúc của DENV, biểu hiện mức độ tương đồng giữa các kiểu huyết thanh là 60-70%. Đã thể hiện thông qua nghiên cứu tinh thể học tia X (*Modis, Y., (2003). Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 100, 6986-6991*) cũng như nghiên cứu soi kính hiển vi điện tử nghiệm lạnh (*Kuhn, R.J., et al. (2002). Cell 108, 717-725*) rằng trong DENV, như trong các flavivirus khác, protein E tạo ra các dime trên bề mặt của các virion trưởng thành.

Việc các virion DENV tiếp xúc với môi trường độ pH axit yếu (*tức là thấp hơn 6,5*) gây ra sự thay đổi cấu hình không thuận nghịch trong protein E làm phân ly các dime này và dẫn đến tái liên kết các monome thu được thành trime. Sự thay đổi cấu

hình này là cần thiết để dung hợp màng virus và màng nội bào diễn ra sau khi nội hóa các virion DENV bằng cách nhập bào qua trung gian thụ thể trong các tế bào của động vật có vú (*Modis, Y., et al. (2004). Nature 427, 313-319*).

Trong số khoảng 500 gốc axit amin của mỗi monome của protein E, 80% tạo ra phần miền ngoài tế bào đầu tận cùng N của nó và phần còn lại tạo ra miền xuyên màng giữ protein E với vỏ lipid (*Chambers, T.J., et al. (1990). Annu. Rev. Microbiol. 44, 649-688*). Miền xuyên màng này được liên kết với miền ngoài tế bào thông qua thân dài khoảng 53 gốc (*Modis, Y., et al. (2004). Nature 427, 313-319*). Miền ngoài tế bào E gấp cuộn thành ba miền cấu trúc riêng rẽ: miền tấm beta trung tâm (miền I), miền nhị trùng hóa kéo dài (miền II) và miền thứ ba gấp cuộn giống globulin miễn dịch, miền III (DIII) (*Modis, Y., et al. (2003). Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 100, 6986-6991*).

DIII là miền protein E duy nhất được tạo ra bởi đoạn liên tục, không bị ngắt quãng của chuỗi polypeptit của nó. DIII được tìm thấy ở đầu tận cùng C của miền ngoài tế bào của protein E, giữa các gốc 294 và 392. Cấu trúc của nó rất giống cấu trúc của miền hình cầu của vùng ổn định của globulin miễn dịch (*Modis, Y., et al. (2005). J. Virol. 79, 1223-1231*). Cấu trúc bậc ba của DIII bao gồm liên kết disulphua giữa hai gốc Cys ở các vị trí 302 và 333 được bảo toàn một cách nghiêm ngặt ở tất cả các flavivirus.

DIII nối với miền I thông qua cầu nối kéo dài, linh hoạt gồm 10 gốc (*Modis, Y., et al. (2004). Nature 427, 313-319*) cho phép DIII tuân theo các định hướng khác nhau so với các miền còn lại (*Rey, F.A., et al. (1995). Nature 375, 291-298*). Trong quá trình chuyển tiếp dime-sang-trime, DIII là miền biểu hiện sự thay đổi cấu trúc mạnh mẽ nhất, khi nó quay xấp xỉ  $70^\circ$  và tâm khối lượng của nó di chuyển 36 Å về phía miền II. Trong DENV và các flavivirus khác, một phần lớn các gốc quyết định độc lực, khả năng hướng tế bào và phạm vi vật chủ của virus nằm trên DIII (*Rey, F.A., et al. (1995). Nature 375, 291-298*). Tương tự, nhiều đột biến tránh sự trung hòa được thiết lập trên miền này (*Modis, Y., et al. (2005). J. Virol. 79, 1223-1231*).

Có nhiều bằng chứng, thu được từ cả phân tích cấu trúc của protein E và virion DENV và từ công việc thử nghiệm, hỗ trợ quan điểm rằng DIII là phần vùng của protein E tương tác với thụ thể tế bào DENV giả định. Một số đặc điểm cấu trúc của miền này phù hợp với vai trò là thực tế DIII là miền nhô ra nhiều nhất trên bề mặt virion, và do đó, việc tương tác với các vị trí thụ thể dễ tiếp cận nhất

(Mukhopadhyay, S., et al. (2005). *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 13-22). Ngoài ra, chính thực tế là nó tuân theo gấp cuộn giống globulin miễn dịch gợi ý rằng nó có thể gắn với thụ thể tế bào DENV giả định, như các miền tương tự đã biết từ lâu đã được phát hiện trong nhiều protein bám dính tế bào. Một đặc tính cấu trúc khác nữa của miền này phù hợp với sự liên quan có thể trong việc gắn kết thụ thể là sự có mặt của các mảnh bề mặt ưa nước tích điện dương, được tạo ra bởi các gốc 284-310 và 386-411, mà có thể tham gia trong việc gắn kết miền này với các phân tử heparin sulfat tích điện âm (Modis, Y., et al. (2005). *J. Virol.* 79, 1223-1231).

Các nghiên cứu với DIIIIE, thu được thông qua công nghệ axit deoxyribonucleic (ADN) tái tổ hợp, cho thấy rằng chúng gắn kết trực tiếp với bề mặt tế bào của các dòng C6/36 và BHK21, tại đó chúng có thể phong bế sự nhiễm virus (Hung, J.J., et al. (2004). *J. Virol.* 78, 378-388).

Các nghiên cứu trước đây đã chứng minh rằng DIIIIE thể hiện sự gắn kết đặc hiệu với các tế bào chủ với hằng số phân ly biểu kiến ( $K_D$ ) là 30  $\mu$ M hoặc nhỏ hơn, tùy thuộc vào loài flavivirus mà từ đó DIIIIE được lấy (Halstead, S.B., et al. (2005). *Vaccine* 23, 849-856). Mặt khác, đã biết rằng các kháng thể đơn dòng (monoclonal antibody - mAb) phong bế hiệu quả nhất gắn kết của DENV với tế bào đích của nó là các kháng thể mà epitop của chúng nằm trên DIIIIE, đưa ra bằng chứng gián tiếp về sự liên quan của miền này trong việc tương tác protein E với thụ thể tế bào virus (Thullier, P., et al. (2001). *J. Gen. Virol.* 82, 1885-1892.).

Sự xâm nhập của DENV vào trong tế bào chủ của nó phụ thuộc vào tương tác trước đó của nó với phân tử thụ thể đặc hiệu trên bề mặt tế bào. Tuy nhiên, theo bằng chứng thu thập được trong nghiên cứu về tương tác DENV-tế bào chủ, thụ thể chính xác mà đã quen với sự xâm nhập của virus có thể thay đổi, tùy thuộc vào loại tế bào và thậm chí là kiểu huyết thanh của virus. Dữ liệu có sẵn gợi ý rằng sự xâm nhập của DENV liên quan đến sự tương tác với phức hợp nhiều phân tử, trong đó một số phân tử thực hiện vai trò là thụ thể chính, gắn kết và tập trung virion trên bề mặt tế bào cho tương tác sau với thụ thể nội bào giả định.

Việc phong bế sự xâm nhập của virus vào trong tế bào là chiến lược hấp dẫn để phát triển biện pháp kháng virus, do nó sẽ hướng đích giai đoạn đầu tiên của vòng đời của virus và sẽ, nếu thành công, phong bế tất cả các quá trình tiếp theo khác của sự nhiễm virus. Phân tích bằng tinh thể học tia X và phổ cộng hưởng từ hạt nhân đã đưa ra thông tin cấu trúc ở mức độ nguyên tử trên ba protein cấu trúc của chi *Flavivirus* (protein C, protein prM và protein E). Các nghiên cứu này đã gợi ý phương pháp thay

thể để ức chế chu kỳ sao chép của virus giống như việc ức chế sự chuyển tiếp cấu trúc của protein vỏ. Tương tự, một số nghiên cứu cấu trúc đã đưa ra dữ liệu liên quan đến các vùng đặc hiệu của protein vỏ tham gia vào tương tác với phân tử thụ thể và kháng thể trung hòa, mà cấu thành các vị trí gắn kết tiềm năng làm đích để thiết kế hợp lý các thuốc kháng virus chống DENV.

Trước đây đã đề xuất rằng protein màng của người được gọi tên là protein liên quan đến thụ thể lipoprotein tỷ trọng thấp (Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein - LRP1) là thụ thể nội bào thực tế được sử dụng trong quá trình xâm nhập của DENV (Huerta V. *et al*, WO 2007/124698). Do đó, LRP1 sẽ cấu thành đích hấp dẫn để thiết kế các thuốc kháng virus, do phân tử này điều phối một cách có hiệu quả sự nhập bào của trên 30 phối tử tự nhiên, và trước đây đã được thể hiện là tác động như thụ thể đối với loài virus không liên quan, nhóm phụ của Rhinovirus của người. LRP1 đã được thể hiện là gắn kết với DIIIIE cả trực tiếp và thông qua các phân tử cầu nối mà tương tác đồng thời với LRP1 và virus. Một ví dụ về trường hợp gắn kết thông qua phân tử cầu nối là alfa-2-macroglobulin ( $\alpha 2M$ ) của người, mà gắn kết với DIIIIE và cả với phối tử LRP1.

Trước đây đã biết rằng các peptit có cấu trúc kẹp tóc beta trên cơ sở cấu trúc của DIIIIE có thể được sử dụng để ức chế sự nhiễm DENV cả *in vitro* và *in vivo* (Huerta V. *et al*, WO 2007/124698). Các peptit này, mà trình tự chính xác của chúng phụ thuộc vào kiểu huyết thanh của virus mà từ đó chúng được tạo ra, bao gồm phần kẹp tóc beta FG của DIIIIE, và được cài thông qua cầu nối disulphua giữa các gốc xystein được nối ở các đầu tận cùng N và C của mảnh kẹp tóc được chọn. Trong số các chuỗi peptit này, thành viên biểu hiện hoạt tính kháng virus cao nhất là peptit HDIII3CL, mặc dù có nguồn gốc từ DENV3 DIIIIE, nhưng thể hiện hoạt tính ức chế chống tất cả bốn kiểu huyết thanh DENV.

Tuy nhiên, các peptit có cấu trúc kẹp tóc beta đã được cài này có các nhược điểm quan trọng như hiệu lực tương đối thấp. Ví dụ, nồng độ ức chế 50% ( $IC_{50}$ ) của HDIII3CL, được xác định thông qua thử nghiệm ức chế nhiễm ở các tế bào Vero, là 15  $\mu M$  đối với DENV1, 20  $\mu M$  đối với DENV2 và DENV3, và 40  $\mu M$  đối với DENV4. Hiệu lực tương đối kém này loại trừ việc sử dụng trực tiếp các phân tử này để nghiên cứu lâm sàng, do chỉ dẫn được chất tốt là phải có hiệu lực ít nhất nằm trong phạm vi dưới micromol, và tốt hơn là trong phạm vi nanomol, hoặc tốt hơn nữa.

Một nhược điểm khác của chuỗi peptit này là phần liên sợi của vòng chứa epitop tế bào B có tính trội miễn dịch, có tác dụng trung hòa (Matsui K, *et al*. (2009)

*Virology* 384(1):16-20). Tài liệu Huerta V. et al, WO 2007/124698, chẳng hạn, cho rằng mAb 3H5 trung hòa gắn kết với các peptit chứa vòng liên sợi này. Do một phần của đáp ứng kháng thể kháng DIIIIE là phản ứng chéo giữa các kiểu huyết thanh khác nhau, nên tồn tại khả năng rằng đáp ứng kháng thể kháng DIIIIE có tính phản ứng chéo đang tồn tại, gây ra bởi bệnh nhiễm trùng trước đó, có thể gắn kết với peptit này và làm giảm nồng độ hữu hiệu của nó, do đó cần liều lượng peptit điều trị thậm chí cao hơn so với liều lượng peptit cần thiết mà có hiệu lực thấp.

Thực tế nêu trên cho thấy rằng vẫn chưa có được chất kháng virus có hiệu lực cao chống DENV, tốt hơn là có IC<sub>50</sub> nằm trong phạm vi nanomol. Sáng chế nhằm đúng vào nhu cầu chưa được đáp ứng này.

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

Sáng chế giải quyết vấn đề nêu trên bằng cách đề xuất các peptit có cấu trúc kẹp tóc beta mới ức chế DENV thu được bằng cách tối ưu hóa hiệu lực của các peptit đã biết từ trước. Các peptit có cấu trúc kẹp tóc beta theo sáng chế được đặc trưng bởi có một trong số các trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID No. 1 đến SEQ ID No. 9, hoặc trình tự tương tự với các trình tự này.

### **Mô tả vắn tắt các hình vẽ**

Fig. 1. Thể hiện thiết kế của các peptit có cấu trúc kẹp tóc beta để ức chế virus Dengue (DENV) A) Các thông số ưu tiên đối với mỗi trong số 20 axit amin tự nhiên, được tính đối với mỗi vị trí của kẹp tóc có 8 gốc với vòng ngoặt beta trung tâm typ IP. Trị số của thông số ưu tiên càng cao thì màu xám càng tối. Nếu không có trường hợp là axit amin cụ thể xuất hiện ở vị trí cụ thể trên kẹp tóc bất kỳ trong số các kẹp tóc beta của cơ sở dữ liệu WHATIF, thì axit amin này được ấn định trị số quan sát là 0,5 ở vị trí đó, và sau đó, thông số ưu tiên tương ứng được tính. B) Các thông số ưu tiên đối với mỗi trong số 20 axit amin tự nhiên, được tính đối với mỗi vị trí của kẹp tóc có 8 gốc với vòng ngoặt beta trung tâm typ IIP. Việc tạo màu sơ đồ và việc tính toán các thông số ưu tiên là giống như trong mục (A). C-D) Sự biểu diễn kiểu biểu tượng của các trình tự liên ứng thu được từ việc bắt cặp các kẹp tóc beta với vòng ngoặt beta trung tâm typ IP (C) hoặc IIP (D). Cỡ chữ cái tỷ lệ thuận với tỷ lệ của tần suất quan sát được của axit amin đó ở vị trí đó và tần suất kỳ vọng dựa trên thành phần axit amin của cơ sở dữ liệu. E) Sự bắt cặp trình tự của đoạn DIIIIE tương ứng với kẹp tóc FG trong mỗi một trong số bốn kiểu huyết thanh DENV và peptit PHB4. MP: các vị trí dễ

biến đổi (a-e) được xác định theo sáng chế, \* vị trí tương ứng với vị trí của gốc Lys385, mà có liên quan về mặt chức năng; SS: cấu trúc bậc hai ‘được thiết kế’ đối với peptit PHB4; RN: số lượng gốc trong trình tự PHB4; SSDEN: cấu trúc bậc hai trong DIIIIE; RNDEN: số lượng gốc trong trình tự của protein E từ DENV2; strand: sợi beta tương ứng với các sợi F và G trong DIIIIE.

Fig. 2. Thể hiện mô hình cấu trúc ba chiều của các peptit có cấu trúc kẹp tóc beta ức chế DENV. A) Peptit có cấu trúc kẹp tóc beta HDIII3CL. Đoạn được thể hiện tương ứng với kẹp tóc mà không có phần kéo dài đầu tận cùng C cation, nêu bật một số gốc liên quan. Tung độ của các gốc tương đương của chúng trong DIIIIE được đưa ra trong ngoặc đơn. B) Peptit PHB4. Dấu móc định giới hạn phần của sợi beta đã được kéo dài so với HDIII3CL. C) Sự đặt chồng cấu trúc của cả hai peptit.

Fig. 3. Thể hiện sự ức chế gắn kết của DIIIIE được biotin hóa từ DENV1 (DIIIIE1Jbiot) với protein  $\alpha 2M^*$ . Trục tung thể hiện tỷ lệ phần trăm ức chế của các peptit có cấu trúc kẹp tóc beta theo sáng chế ở nồng độ peptit nằm trong khoảng 0,05-3  $\mu M$ . Hoạt tính ức chế của peptit HDIII3CL và DIIIIE1J tái tổ hợp cũng được thể hiện.

Fig. 4. Thể hiện đường cong đáp ứng liều đối với sự ức chế gắn kết của DIIIIE DENV1 được biotin hóa (DIIIIE1Jbiot) với  $\alpha 2M^*$ . Đồ thị thể hiện tỷ lệ phần trăm ức chế tương ứng với các peptit PHB5, peptit HDIII3CL và DIIIIE1J tái tổ hợp có vòng ngoặt beta.

Fig. 5. Thể hiện sự ức chế gắn kết của DIIIIE DENV1 được biotin hóa (DIIIIE1Jbiot) với protein  $\alpha 2M^*$  bằng các peptit có cấu trúc kẹp tóc beta được chỉ định, và mối quan hệ với hoạt tính kháng virus. Trục tung thể hiện tỷ lệ phần trăm ức chế gắn kết so với tỷ lệ ức chế gắn kết được xác định đối với DIIIIE1J. Dữ liệu đã thể hiện này tương ứng với khoảng nồng độ peptit dưới micromol (50-200 nM).

Fig. 6. Là sơ đồ của plasmid pET-DIII DENV1.

Fig. 7. Thể hiện việc lập bản đồ của các gốc DIIIIE thiết yếu đối với tương tác của nó với protein  $\alpha 2M$ . Trục tung thể hiện tỷ lệ giữa trị số IC<sub>50</sub> đối với mỗi đột biến thay thế alanin (tương ứng với mỗi gốc trên trục hoành) và trị số IC<sub>50</sub> đối với DIIIIE tái tổ hợp (DIIIIE1PRS). Hình có dạng elip được tô đậm đánh dấu các gốc của vị trí tương tác chính. Hình có dạng elip được tô nhạt xác định vị trí tương tác phụ.

Fig. 8. Thể hiện sự định vị trong cấu trúc ba chiều của DIIIIE về các vị trí được gắn trong tương tác của nó với protein  $\alpha 2M^*$ . Hai hình vẽ cấu trúc của DENV1 DIII được thể hiện, bao gồm sự biểu diễn dạng que chi tiết và sự biểu diễn cấu trúc bậc hai

trong đó các hình mũi tên và các hình trụ lần lượt là các tấm beta và các vòng. Các gốc liên quan được đánh dấu. Chúng nhóm thành hai vị trí, được thể hiện bởi hình có dạng elip được tô màu: vị trí chính (A) và vị trí phụ (B). Cấu trúc ba chiều được dựng bằng cách sử dụng PyMOL (*The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.2r3pre, Schrödinger, LLC.*)

Fig. 9. Thể hiện động học sự kết tụ đối với peptit PHB4 trong dung dịch đệm phosphat (phosphate-buffered saline - PBS). A-B): Thể hiện động học sự kết tụ đối với peptit PHB4 ở 10  $\mu$ M, trong PBS. Trục tung tương ứng với cường độ của ánh sáng được phân tán, so với cường độ của ánh sáng được phân tán tại thời điểm 0 (mômen trong đó peptit được hòa tan trong PBS). A: Kiểu kết tụ trong thời gian 0 đến 300 phút. B: 30 phút đầu của quá trình kết tụ. C-D): Thể hiện động học sự kết tụ của peptit PHB4 ở 5  $\mu$ M, trong PBS. C: Kết tụ sớm, thời gian 0-40 phút. D: Kết tụ muộn, thời gian 30-230 phút.

Fig. 10. Thể hiện nghiên cứu hình thái học của kết tụ của peptit PHB4 bằng kính hiển vi điện tử truyền qua (Transmission Electron Microscopy - TEM) ở nồng độ peptit 2 mg/ml, trong nước và PBS. Các điều kiện thử nghiệm là: Peptit được nghiên cứu ngay sau khi hòa tan trong nước (A) hoặc PBS (B); peptit được nghiên cứu sau khi hòa tan và gia nhiệt trong 1 giờ ở nhiệt độ 50°C trong nước (C) hoặc PBS (D); và peptit được nghiên cứu sau khi hòa tan trong nước (E) hoặc PBS (F), tiếp theo gia nhiệt trong 1 giờ ở nhiệt độ 50°C và sau đó, ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Các thanh trong ảnh A, B, E và F có chiều dài 100 nm, và các thanh trong ảnh C-D có chiều dài 200 nm.

Fig. 11. Thể hiện các protein được dùng trong các thử nghiệm để tương tác trực tiếp DIIIIE với thụ thể LRP1. A) Sự biểu diễn bằng lược đồ kiến trúc miền của LRP1. CM: màng tế bào chất. Các vùng tương ứng với các nhóm gắn kết phối tử được chỉ ra. B) Sự biểu diễn bằng lược đồ protein sLRP1-CIV ghép. Fc: vùng ổn định của globulin miễn dịch. C) Sự biểu diễn bằng lược đồ protein DIIIIE1-4 tái tổ hợp. D) Phân tích bằng cách điện di (SDS-PAGE) biến tính sản phẩm DIIIIE cuối: 1. DIIIIE1 (cụ thể là DIIIIE1J), 2. DIIIIE2, 3. DIIIIE3 và 4. DIIIIE4. Vị trí tương ứng với chất đánh dấu 14 kDa trong thang khối lượng phân tử được dùng trong thử nghiệm này được chỉ ra.

Fig. 12. Thể hiện sự tương tác của DIIIIE DENV với nhóm gắn kết phối tử của LRP1 trong thử nghiệm ELISA. Protein được dùng để phủ các lỗ của đĩa được chỉ ra ở bên trên của mỗi đồ thị. Việc gắn kết của các protein sLPR1-CII-IV được phát hiện

bằng cách sử dụng kháng Fc đa dòng của IgG của người được tiếp hợp với peroxidaza củ cải ngựa.

Fig. 13. Thể hiện sự mô tả đặc điểm của bề mặt gắn kết sLRP1-CIV đối với thử nghiệm Biacore. A) Đồ thị cảm biến thu được từ việc dùng  $\alpha 2M^*$  và protein liên kết thụ thể (Receptor-Associated Protein - RAP), cả hai ở 100 nM. Các tín hiệu từ cả hai kênh được thể hiện: Fc1, với sLRP1-CIV được giữ cố định và Fc2, với HSA tái tổ hợp được giữ cố định. B) Xác định ái lực của tương tác giữa RAP với sLRP1 từ đơn vị cộng hưởng (Resonance Unit - RU) lớn nhất đối với dữ liệu nồng độ. Đường nét liền thể hiện sự khớp với mô hình có hai vị trí tương tác, được thực hiện bằng cách sử dụng GraphPad Prism v5.03. Các phép đo được thực hiện trên đơn vị Biacore X.

Fig. 14. Thử nghiệm Biacore đối với tương tác của các peptit có cấu trúc kẹp tóc beta với sLRP1-CIV. A và B) Đồ thị cảm biến thu được từ việc dùng các peptit ở 20  $\mu M$ ; C) RU quan sát được ở 160 giây, và (D) RU ở 270 giây.

Fig. 15. Mối quan hệ giữa việc gắn kết với protein LRP1 (mảnh sLRP1-CIV) và hoạt tính kháng virus *in vitro* của các peptit có cấu trúc kẹp tóc beta. Hồi quy tuyến tính được sử dụng để khớp dữ liệu về hiệu lực *in vitro* [ $\log(IC_{50}, \mu M)$ ] đối với hoạt tính kháng virus của DENV2 trong tế bào Vero và độ lớn của các tín hiệu Biacore ở  $t=400$  giây ( $RU_{rem}$ ) đối với các peptit của chuỗi PHB có cấu trúc liên kết giống như peptit HDIII3CL (cấu trúc liên kết nguyên thể). Dải độ tin cậy 95% được thể hiện bằng đường nét đứt. Đồ thị lồng thể hiện phân tích tương tự nhưng ngoại trừ peptit PHB4.

Fig. 16. Thể hiện mối quan hệ giữa việc gắn kết với protein  $\alpha 2M^*$  và hoạt tính kháng virus *in vitro* của các peptit có cấu trúc kẹp tóc beta. Hồi quy tuyến tính được sử dụng để khớp dữ liệu đối với sự ức chế gắn kết của DIIIIE với protein  $\alpha 2M^*$  và các trị số  $IC_{50}$  đối với sự ức chế nhiễm bệnh của các tế bào Vero bởi DENV2. Tỷ lệ phần trăm ức chế của gắn kết với  $\alpha 2M^*$  được tính so với tỷ lệ phần trăm ức chế xác định được đối với DIIIIE1J tái tổ hợp ở các nồng độ đẳng mol với các nồng độ được sử dụng đối với các peptit này. Các trị số được thể hiện tương ứng với trị số trung bình và độ lệch chuẩn, được xác định ở các nồng độ peptit dưới micromol và nanomol (50, 100, 200 và 400 nM).

Fig. 17. Thể hiện sự ảnh hưởng của nhiệt độ ủ đến hoạt tính kháng virus của peptit PHB4. Hoạt tính kháng virus được đánh giá bằng cách chuẩn độ dịch nổi sau khi nhiễm (post-infection - *p.i.*) 24 giờ từ các tế bào Vero bị nhiễm chủng DENV2 16803, bằng cách sử dụng thử nghiệm tạo mảng trên tế bào Vero.  $IC_{50}$  được ước tính

bằng cách sử dụng GraphPad Prism v5.03. Đường nét liền thể hiện sự khớp không tuyến tính với  $\log_{10}(\text{nồng độ})$  so với đường cong đáp ứng.

Fig. 18. Là sơ đồ minh họa thiết kế thử nghiệm được dùng để đánh giá ảnh hưởng của thời gian kết tụ đến hoạt tính kháng virus của peptit PHB4.

Fig. 19. Thể hiện sự ảnh hưởng của thời gian và nhiệt độ ủ đến hoạt tính kháng virus của peptit PHB4. Hoạt tính kháng virus được đánh giá bằng cách chuẩn độ dịch nổi sau khi nhiễm 24 giờ từ các tế bào Vero bị nhiễm chủng DENV2 16803, bằng cách sử dụng thử nghiệm tạo mảng trên tế bào Vero. Độ chuẩn của virus trong dịch đối chứng không được xử lý (không xử lý bằng peptit) là  $4 \log_{10}$ . A. Ủ ở nhiệt độ  $10^{\circ}\text{C}$ ; B. Ủ ở nhiệt độ  $37^{\circ}\text{C}$ .

Fig. 20. Thể hiện thiết kế thử nghiệm được dùng để đánh giá ảnh hưởng của nồng độ peptit PHB4 ban đầu trong quá trình kết tụ đến hiệu lực của hoạt tính kháng virus của nó.

Fig. 21. Thể hiện ảnh hưởng của nồng độ peptit ban đầu trong nước đến hoạt tính kháng virus của nó. Hoạt tính kháng virus được đánh giá bằng cách chuẩn độ dịch nổi sau khi nhiễm 24 giờ từ các tế bào Vero bị nhiễm chủng DENV2 16803, bằng cách sử dụng thử nghiệm tạo mảng trên tế bào Vero.

Fig. 22. Thể hiện tiết kế thể dung hợp của PHB với nhãn histidin đầu tận cùng C (bên trên) hoặc đầu tận cùng N (bên dưới).

Fig. 23. Là sơ đồ thể hiện kết tụ peptit/hạt nano được gắn nhãn histidin được làm ổn định bằng liên kết chéo với ion kim loại và chất đệm EGTA(Me2).

Fig. 24. Thể hiện hoạt tính kháng virus của các peptit H5PHB4 và PHB4H5, riêng rẽ hoặc ở dạng phức hợp với Zn và EGTA(Zn2).

### Mô tả chi tiết sáng chế

Mục đích chính của sáng chế là thiết kế các peptit ức chế nhiễm DENV có hiệu lực tương đối cao, ít nhất là trong phạm vi dưới micromol, và tốt hơn là ở phạm vi nanomol hoặc tốt hơn nữa. Hiệu lực cao là cần thiết để giảm liều điều trị càng nhiều càng tốt. Các peptit tổng hợp trị liệu hiện đang sử dụng trên lâm sàng chống các bệnh khác thường là các hợp chất rất có hiệu lực, mà hiệu quả của chúng ( $\text{IC}_{50}$ , 50% nồng độ hữu hiệu ( $\text{EC}_{50}$ ), v.v.) nằm ở phạm vi nanomol/dưới nanomol và tính đặc hiệu của chúng rất cao, do đó, có độc tính rất thấp. Peptit hiệu lực thấp sẽ cần phải có liều điều trị cao, mà điều này kéo theo một số nhược điểm quan trọng. Một trong số chúng là thực tế liều cao làm tăng khả năng được chất sẽ thể hiện các tác dụng phụ do tương tác

không đặc hiệu. Một nhược điểm khác là xác suất xảy ra vấn đề kết tụ, trong quá trình sản xuất và bào chế hoặc trong quá trình phân phối *in vivo* của nó (do, ví dụ, tương tác không đặc hiệu với các protein huyết thanh) tăng một cách đáng kể. Một nhược điểm khác nữa là thực tế liều cao làm tăng xác suất xảy ra vấn đề về khả năng sinh miễn dịch/khả năng kháng nguyên, trong đó việc gây ra đáp ứng kháng thể kháng peptit làm trung hòa hoạt tính trị liệu của nó, đặc biệt là nếu việc điều trị được lặp lại hoặc kéo dài theo thời gian, do đó cần phải có liều cao hơn để bù lại sự mất này.

Ngược lại, việc sử dụng các peptit có hiệu lực cao với liều hữu hiệu thấp thể hiện một số ưu điểm về kinh tế, xuất phát từ cả chi phí sản xuất thấp hơn và giá thành mà bệnh nhân phải trả thấp hơn. Kỹ thuật tổng hợp peptit thường đắt hơn nhiều so với việc tổng hợp các dược chất dựa trên các hợp chất có khối lượng phân tử nhỏ, và sự cân nhắc về chi phí cuối cùng có thể giới hạn số lượng bệnh nhân hoặc người tiếp cận với dược chất kháng virus Dengue trên cơ sở peptit, đặc biệt nếu liều điều trị là lớn.

Một trong số các yếu tố cơ bản xác định hiệu lực của peptit trị liệu là ái lực của tương tác của nó với đích của nó. Tuy nhiên, nhiệm vụ của việc thiết kế các peptit hoạt tính mà bắt chước các mảnh bề mặt chức năng tham gia trong tương tác protein-protein ái lực cao là không hề tầm thường. Vấn đề cơ bản ở đây là các mảnh bề mặt chức năng trong các protein hình cầu thường liên quan đến đồ thị cấu trúc liên kết (topographic) (*tức là* liên quan đến nhiều hơn một đoạn liên tục của chuỗi polypeptit) và cấu hình (*tức là* cần sự sắp xếp không gian được quy định rõ của các góc tham gia để tương tác diễn ra). Ngược lại, các peptit có nguồn gốc từ các đoạn protein ngắn, thường dài 10-20 gốc, là linh hoạt trong cách giải quyết và thường không tuân theo một cấu hình đã quy định rõ duy nhất. Ví dụ, các peptit có cấu trúc kẹp tóc beta, mặc dù có nguồn gốc từ môtip cấu trúc đã quy định rõ trong protein gấp cuộn, là không ổn định về mặt cấu trúc trong cách giải quyết, thay vào đó tồn tại dưới dạng quần thể các cấu hình khác nhau ở trạng thái cân bằng.

Tình trạng cấu hình của peptit đang giải quyết được dự định bắt chước cấu hình cụ thể thường được phân tích dưới dạng cân bằng giữa hai trạng thái: trạng thái gấp cuộn (mà cấu trúc ba chiều của nó khớp với cấu trúc protein nguyên thể mà nó được giả định bắt chước) và trạng thái không gấp cuộn hoặc biến tính (quần thể gồm tất cả các cấu hình không nguyên thể được tuân theo bởi peptit đang giải quyết này). Trong trường hợp peptit có cấu trúc kẹp tóc beta bắt chước tương tác giữa kẹp tóc beta trong protein nguyên thể và đích protein riêng rẽ, kẹp tóc này càng ổn định, cấu trúc của nó sẽ càng giống cấu trúc của đoạn tương ứng trong protein nguyên thể, và ái lực của

tương tác thu được càng cao hơn do mức độ thiệt hại entropy cấu hình nhỏ hơn khi tạo ra phức hợp peptit-thụ thể.

Nói cách khác: giả sử rằng peptit đang giải quyết trong dung dịch tuân theo cấu trúc lộn xộn, và giả sử rằng quá trình gắn kết với đích của nó tiến hành thông qua cơ chế chọn lọc cấu hình, thì sự biến đổi năng lượng tự do của quá trình gắn kết có thể được tính theo tổng mức độ biến đổi năng lượng tự do liên quan đến việc gấp cuộn peptit thành cấu hình thích hợp và sự biến đổi năng lượng tự do liên quan đến việc gắn kết peptit đã được gấp cuộn vào vị trí tiếp giáp của nó trên thụ thể. Trong trường hợp đó, lượng năng lượng tự do được giải phóng bởi quá trình gắn kết, hoặc nói cách khác, độ ổn định tương tác, có thể được làm tăng lên bằng cách thay đổi trình tự của peptit, thay thế một số gốc của trình tự ban đầu bằng các gốc khác mà a) tăng cường độ ổn định cấu hình của peptit đang giải quyết (đặc biệt là có lợi khi các gốc được chọn không tương tác trực tiếp với bề mặt tiếp xúc ở vị trí thụ thể) hoặc b) tối ưu hóa tương tác liên phân tử giữa peptit và thụ thể của nó, làm tăng mức giảm năng lượng tự do mà diễn ra ở bước tiếp giáp.

Phân tích trình tự của peptit HDIII3CL (SEQ ID No. 10, Bảng 1) phát hiện thấy một số đặc điểm mà có thể có ưu điểm để cải thiện độ ổn định của gấp cuộn kẹp tóc beta của nó. Các đặc điểm này là: a) sự có mặt của các gốc asparagin –như Asn3 và Asn16 trên sợi beta F và G. Asparagin là khuôn mẫu beta nghèo, có khuynh hướng tấm beta nội tại rất thấp và xu hướng xuất hiện trong các vòng và cấu trúc khung được đặc trưng bởi góc xoắn dương (*Swindells MB, et al. (1995). Nat Struct Biol.; 2(7):596-603*); b) sự có mặt của vòng khá lớn –sáu gốc từ sợi này sang sợi khác, lớn hơn nhiều (hơn bốn gốc) so với kích thước tối ưu là hai (*Branden C. & Tooze J. Introduction to protein structure. New York: Garland Publishing, 1991*). Vấn đề ở đây là việc cài xen các gốc mới vào trong vòng protein có hao phí entropi liên quan đến sự đóng vòng, mà tăng lên theo kích thước vòng; và c) sự có mặt của hai gốc glyxin -Gly7 và Gly9– trong vòng liên sợi. Glyxin là gốc chịu sự hao hụt entropi cấu hình lớn nhất trong quá trình gấp cuộn, do nó không lệ thuộc vào sự giới hạn góc xoắn khung liên quan đến các axit amin tự nhiên khác.

Cơ sở của các thay đổi trình tự được thể hiện trong sáng chế này, mà làm tăng độ ổn định cấu hình của peptit có cấu trúc kẹp tóc beta theo sáng chế, là thay thế các gốc đang có ở các vị trí dễ biến đổi bằng các gốc có khuynh hướng cấu trúc cao hơn để tạo ra các cấu trúc kiểu kẹp tóc beta. Khuynh hướng cấu trúc của axit amin cụ thể để chiếm vị trí đặc hiệu trên kẹp tóc beta có thể được ước tính từ tần suất xuất hiện

của axit amin này ở vị trí đó trong số các cấu trúc kẹp tóc beta được xác định theo thử nghiệm từ cơ sở dữ liệu cấu trúc protein. Về mặt toán học, nó được tính dưới dạng logarit của thương số giữa các tần suất xuất hiện quan sát được và kỳ vọng của nó, tần suất xuất hiện kỳ vọng thu được từ dữ liệu tương đối của gốc liên quan trong cơ sở dữ liệu.

Các vị trí được xác định là dễ biến đổi theo sáng chế này là:

a) Các vị trí trên sợi beta thứ nhất của peptit có cấu trúc kẹp tóc beta mà tương ứng với các gốc của mặt bên trong của sợi F trong cấu trúc của DIIIIE, tức là các gốc không được tiếp xúc với dung môi trong cấu trúc nguyên thể. Các gốc này chiếm giữ các vị trí (vị trí HB) mà tại đó liên kết hydro giữa nguyên tử cho và nhận trong khung của sợi beta thứ nhất và thứ hai (tương ứng với sợi G trong cấu trúc của DIIIIE) của peptit được thiết lập;

b) Các vị trí tương ứng với vòng liên sợi;

c) Các vị trí HB trên sợi beta thứ hai của peptit (tương ứng với sợi G của DIIIIE), ngoại trừ gốc Trp391 của DIIIIE (tung độ DENV2), sẽ duy trì không đổi. Ở phần còn lại của các vị trí “c” này, các gốc có đặc tính kỵ nước là được phép và được ưu tiên.

d) Các vị trí không phải HB (NHB) của sợi F gần nhất với vòng;

e) Các biến đổi có thể đối với vị trí HB thứ nhất của sợi thứ hai của peptit này (tương ứng với sợi G trong DIIIIE) bao gồm, ngoài các gốc có khuynh hướng cấu trúc cao, sự thay thế của nó bằng gốc Lys mà sẽ bắt chước vai trò của lysin (Lys385, tung độ DENV2) tức là bảo toàn về mặt đồ thị cấu trúc liên kết trong DIIIIE của tất cả bốn kiểu huyết thanh và có thể có khả năng được gài vào trong quá trình gắn kết với phức hợp LRP1/ $\alpha 2M^*$  ( $\alpha 2M$  hoạt hóa).

Các gốc dễ biến đổi theo sáng chế được xác định ở điểm a) là không tiếp cận với dung môi trong cấu trúc của DIIIIE, và do đó, không phải là phân bề mặt tiếp xúc chung giữa miền này và thụ thể của nó hoặc các thụ thể có liên quan bất kỳ khác trong vòng đời của virus này. Do đó, chúng có thể được thay thế bằng các gốc làm tăng độ ổn định gấp cuộn của peptit.

Các gốc của vòng liên sợi được xác định ở điểm (b) được coi là dễ biến đổi do trình tự của vùng này thay đổi giữa các kiểu huyết thanh của DENV, chứng tỏ rằng sự bảo toàn nghiêm ngặt của các gốc này là không cần thiết để duy trì tương tác của DIIIIE với thụ thể DENV giả định. Dòng suy luận này được hỗ trợ bởi thực tế là peptit HDIII3CL ức chế sự nhiễm tất cả bốn kiểu huyết thanh của DENV, và nói chung,

phong bế thụ thể  $\alpha 2M^*/LPR1$  có tác dụng kháng virus không phụ thuộc kiểu huyết thanh. Biến thể vòng liên sợi được ưu tiên bởi sáng chế này bao gồm hai gốc trung tâm của vòng ngoặt beta tại đó các vị trí 1 và 4 của vòng ngoặt này sẽ tương ứng với gốc nối thứ nhất của sợi beta liên kề, như vậy biến thể sẽ làm tăng độ ổn định cấu hình của peptit. Nói chung, các kẹp tóc beta tự nhiên có xu hướng có các vòng nối ngắn (Branden C. & Tooze J. New York: Garland Publishing, 1991), và sự giảm kích thước vòng đồng thời làm giảm entropi cấu hình của trạng thái biến tính, mà tăng cùng với kích thước của chuỗi polypeptit.

Một trong số hai gốc trung tâm của vòng hai gốc này (kích thước ưu tiên đối với vòng liên sợi theo sáng chế) có thể đảm nhiệm vai trò chức năng bằng cách bắt chước Lys385 của DIIE từ DENV3. Trong một số peptit theo sáng chế, vai trò chức năng này được thực hiện bởi gốc lysin ở vị trí 2 của vòng này trong trường hợp vòng ngoặt beta typ IIP (do đó, gốc Lys này sẽ chiếm giữ vị trí trung tâm của vòng ngoặt) mà cấu trúc liên kết của nó giống với cấu trúc liên kết của kẹp tóc FG của DIIE. Trong một peptit khác theo sáng chế, vai trò chức năng này được thỏa mãn bởi gốc D-Lys (chất đồng phân lập thể D của L-lysin) được đặt ở vị trí 1 của vòng (vị trí 2 trong vòng ngoặt beta typ IIP), mặc dù trong trường hợp này, cấu trúc liên kết của peptit được đảo ngược so với cấu trúc liên kết của kẹp tóc beta FG trong DIIE.

Các gốc dễ biến đổi được xác định ở điểm (c) được định hướng theo cùng mặt của các gốc của kẹp tóc như ở điểm a), mà chúng liên kề, và chúng kết hợp tạo ra các liên kết hydro tham gia trong các nguyên tử khung. Các gốc tương ứng trong cấu trúc của DIIE được tiếp xúc một phần với dung môi, khi sợi G tạo ra rìa của tấm beta. Vị trí trên peptit có cấu trúc kẹp tóc beta tương ứng với vị trí của Trp391 (tung độ DENV2) trên DIIE được xác định là không dễ biến đổi trong sáng chế, do gốc này được bảo toàn nghiêm ngặt qua tất cả các kiểu huyết thanh DENV và rất có khả năng là có chức năng. Thực vậy, ví dụ 2 (Bảng 2) thể hiện rằng gốc này là cần thiết đối với hoạt tính kháng virus của peptit HDIII3CL (và cả hoạt tính kháng virus của peptit HDIII3CL2, xem Bảng 1), và bị mất hoạt tính khi thay thế nó bằng gốc alanin. Sự thay thế lysin còn được phép ở vị trí thứ nhất của sợi thứ hai (gốc dễ biến đổi được đề cập ở điểm e)), như vậy sự thay thế này sẽ tạo ra sự bắt chước cấu trúc/chức năng của gốc Lys385 của DIIE của DENV3. Lys385 là gốc cation tham gia trong sự tương tác của DIIE với  $\alpha 2M^*$ , một trong số các protein thành phần của phức hợp thụ thể nội bào  $\alpha 2M^*/LRP1$  giả định.

Mặc dù các vị trí dễ biến đổi được đề cập ở điểm d) tương ứng với các góc trên bề mặt tiếp xúc dung môi của DIIIE, các vị trí này vẫn được xác định là dễ biến đổi do chúng không bảo toàn nghiêm ngặt qua các kiểu huyết thanh DENV (Fig. 1E).

Ngay khi tập hợp các vị trí dễ biến đổi trên peptit HDIII3CL được xác định, trình tự của nó được tối ưu hóa bằng cách lựa chọn, đối với mỗi vị trí dễ biến đổi, góc có chỉ số khuynh hướng cấu trúc cao nhất. Thông số này, như nêu trên, bắt nguồn từ tần suất xuất hiện quan sát được của mỗi góc trong mảnh gồm 8 góc tuân theo cấu trúc kẹp tóc beta có vòng gồm 2 góc trung tâm (tức là các góc 4 và 5 của mảnh này sẽ tương ứng với các góc trung tâm của vòng ngoặt beta), được lấy từ cơ sở dữ liệu của các cấu trúc protein được xác định bằng thử nghiệm. Cơ sở dữ liệu dùng trong trường hợp này là tập hợp các cấu trúc protein ba chiều đầy đủ có độ phân giải cao hơn 2,5 Å (WHAT IF database; *Vriend, G. (1990), J.Mol.Graph. 8, 52-6*). Chỉ số khuynh hướng cấu trúc được xác định dưới dạng logarit của thương số giữa số lần xuất hiện của axit amin cụ thể ở vị trí cụ thể trên kẹp tóc và số lần xuất hiện kỳ vọng dựa trên lượng tương đối của góc này trong cơ sở dữ liệu, và được tính một cách riêng rẽ đối với các kẹp tóc beta chứa vòng ngoặt beta typ IP và IIP. Sự lựa chọn cuối cùng cần mô hình xây dựng của cấu trúc ba chiều của các peptit có cấu trúc kẹp tóc beta được đề xuất, có tính đến chất đồng phân hình học chuỗi bên phổ biến nhất và sự tiếp xúc liên sợi.

Sáng chế còn bộc lộ việc đưa các axit amin không có trong tự nhiên vào các vị trí của kẹp tóc beta mà tương hợp về mặt cấu trúc với cấu trúc hóa học và hóa học lập thể của chúng. Đó là trường hợp các chất đồng phân lập thể D của các axit amin tự nhiên, được đưa vào các vị trí tuân theo góc xoắn khung dương. D-Pro, chẳng hạn, là có triển vọng làm góc thứ hai của vòng ngoặt beta typ IIP (tương đương với góc thứ nhất của vòng liên sợi gồm 2 góc theo sáng chế). Một ví dụ khác là D-Lys, cũng được đưa vào vị trí tương ứng với góc thứ hai của vòng ngoặt beta typ IIP, nhưng trong các peptit có cấu trúc liên kết đảo ngược. Trong các trường hợp này, L-Lys không được ưu tiên về mặt cấu trúc đối với vị trí này (chỉ số khuynh hướng cấu trúc của nó không cao, phản ánh thực tế là Lys không tốt trong việc tuân theo góc xoắn nằm ở góc phần tư đáy bên phải của đồ thị Ramachandran), mà không may khi xem xét thực tế rằng góc Lys ở vị trí này sẽ có khả năng bắt chước Lys285 của DIIIE từ DENV3. Việc đưa góc D-Lys thay thế giải quyết vấn đề hóc búa này, do nó có thể tuân theo dễ dàng góc xoắn cần thiết đối với vị trí 2 của vòng ngoặt beta typ IIP.

Việc định nghĩa các góc dễ biến đổi, như được mô tả trong các đoạn trên, tương ứng với các vòng ngoặt kẹp tóc beta mà cấu trúc liên kết của chúng là giống (cấu trúc

liên kết nguyên thể) với cấu trúc liên kết của kẹp tóc beta FG trong cấu trúc của DIII<sub>E</sub>. Tuy nhiên, sáng chế còn bộc lộ các peptit có cấu trúc liên kết đảo ngược. Trong các peptit này, sợi beta thứ nhất và thứ hai của trình tự này lần lượt tương ứng, về mặt chức năng và cấu trúc, với các sợi G và F của DIII<sub>E</sub>, và các gốc này chiếm giữ các vị trí NHB tương ứng với các vị trí HB trong peptit có cấu trúc liên kết nguyên thể (và ngược lại).

Các peptit thiết kế được ở đây duy trì cấu trúc liên kết nguyên thể của kẹp tóc beta FG của DIII<sub>E</sub> bao gồm cầu disulphua ở vị trí NHB, mà làm tăng độ ổn định cấu hình của cấu trúc kẹp tóc beta. Các vị trí bị chiếm giữ bởi các gốc Cys này là: a) gốc thứ nhất của sợi F và b) gốc cuối của sợi G (Fig. 1E).

Một số peptit theo sáng chế có sợi beta dài hơn so với sợi beta của peptit HDIII3CL. Các sợi dài hơn này làm tăng độ ổn định cấu hình của peptit này, do chúng đưa hai liên kết hydro bổ sung vào (một gốc HB trên mỗi sợi).

Ngoài việc làm ổn định cấu hình của chúng, ái lực của tương tác của các peptit theo sáng chế với đích của chúng (và do đó, hoạt tính kháng virus của chúng) cũng có thể được tăng lên bằng cách tối ưu hóa trực tiếp tương tác này. Điều này có thể được thực hiện bằng cách biến đổi các gốc bề mặt chung mà sự đóng góp của chúng vào năng lượng học của tương tác này là không đáng kể hoặc âm thực sự.

Nói chung, đã phát hiện ra rằng năng lượng học của gắn kết protein-protein được chi phối bởi các tương tác của tập hợp các gốc khá nhỏ. Vì vậy, hầu hết các gốc bề mặt chung đóng vai trò tương đối hạn chế trong quá trình gắn kết, nếu có. Mặc dù không có dữ liệu cấu trúc về sự tương tác giữa các peptit theo sáng chế này và đích của chúng, hoặc về sự tương tác giữa DIII<sub>E</sub> và thụ thể giả định của nó, có thể giả định, như là ước chừng thứ nhất, rằng mọi gốc tiếp xúc với dung môi của kẹp tóc FG của DIII<sub>E</sub> được gài và/hoặc đóng vai trò chức năng trên bề mặt chung peptit-thụ thể.

Các ví dụ 2 (Bảng 2) và 6 của sáng chế thể hiện rằng việc thay thế Lys14 (tương ứng với Lys388 trong DENV3 DIII<sub>E</sub>) hoặc Trp17 (tương ứng với Trp391 trong DIII<sub>E</sub>) của peptit HDIII3CL2 bằng gốc alanin làm mất trong mỗi trường hợp hoạt tính kháng virus của peptit này trong các tế bào Vero và ảnh hưởng đến gắn kết của nó với thụ thể LRP1. Vì vậy, cả hai gốc là cần thiết đối với hoạt tính sinh học của HDIII3CL2 và rất có khả năng được bố trí trên bề mặt chung, tạo ra sự đóng góp thiết yếu vào sự tương tác. Do đó, không một gốc nào trong số các gốc này được thay thế trong sáng chế. Sự thay thế kép các gốc Cys1 và Cys18 bằng alanin cũng làm mất hoạt tính kháng virus và sự gắn kết với LRP1 của HDIII<sub>E</sub>CL2, nhưng tác động trong trường

hợp này được cho là do sự mất độ ổn định cấu hình trong cách giải quyết của kẹp tóc beta gây ra chứ không phải sự mất tương tác liên phân tử có lợi.

Sáng chế còn bộc lộ rằng việc kéo dài bề mặt chức năng tiềm năng của các peptit có cấu trúc kẹp tóc beta là một cách khác để làm tăng hiệu lực của chúng. Trong trường hợp cụ thể này, bốn gốc được bổ sung vào cấu trúc của kẹp tóc, trong số đó hai gốc tương ứng với bề mặt tiếp xúc của kẹp tóc FG trong DIIIIE và trước đây không được bao gồm trong chuỗi HDIII3CL của các peptit tương tự. Đặc biệt, hai gốc được bổ sung vào mỗi sợi beta, tại đó các vị trí NHB bị chiếm bởi các axit amin tương ứng với các gốc 375 (sợi F) và 392 (sợi G) của DENV3 DIIIIE. Mặc dù trong DIIIIE, độ đồng nhất của vị trí 375 không được bảo toàn nghiêm ngặt qua tất cả bốn kiểu huyết thanh, vì Asp hoặc Glu được quan sát thấy trong các thể phân lập khác nhau, đây là sự thay thế bảo toàn. Do đó, cả hai axit amin có thể được chọn đối với vị trí tương đương của peptit có cấu trúc kẹp tóc beta theo sáng chế, mặc dù Glu là giải pháp ưu tiên do khuynh hướng của Asp là một phần của cấu hình kéo dài như tấm beta là thấp hơn. Trong trường hợp vị trí peptit tương đương với gốc 392 của DIIIIE, các axit amin ưu tiên là Phe hoặc Tyr, là các gốc quan sát thấy thường xuyên nhất ở vị trí này trong bốn kiểu huyết thanh DENV. Các gốc dễ biến đổi của phần được kéo dài này của kẹp tóc khi đó tương ứng với các vị trí HB, mà sẽ được sử dụng để tối ưu hóa độ ổn định cấu hình bằng cách bao gồm các axit amin kỵ nước ưu tiên có khuynh hướng tạo ra tấm beta cao.

Ngoại trừ các gốc thiết yếu được bộc lộ trong ví dụ 2 (các gốc đó tương ứng với Lys388, Trp391 và Glu/Asp392 trong DIIIIE), tất cả các gốc còn lại của bề mặt bên ngoài (các vị trí NHB) được coi là dễ biến đổi theo sáng chế, do các axit amin tương ứng của chúng trong DIIIIE thể hiện khả năng dễ biến đổi hơn qua các kiểu huyết thanh DENV.

Liên quan đến loại gốc có thể được chọn đối với các vị trí dễ biến đổi của các peptit có cấu trúc kẹp tóc beta theo sáng chế, giải pháp ưu tiên là các loại gốc mà xuất hiện ở các vị trí tương ứng của các trình tự tương đồng của bốn kiểu huyết thanh của DENV. Đó là trường hợp gốc tương ứng với vị trí 377 trong DIIIIE, tại đó giải pháp ưu tiên là Tyr (xuất hiện trong DIIIIE từ DENV1 và DENV4) chứ không phải là Asn (xuất hiện trong DIIIIE từ DENV3). Mặc dù cả Tyr và Asn đều phân cực và là chất cho/nhận liên kết hydro, Tyr tiếp xúc với bề mặt không phân cực lớn hơn và xuất hiện thường xuyên hơn ở bề mặt chung của tương tác protein-protein, có khuynh hướng cao hơn đối với việc tuân theo cấu trúc kéo dài và tạo ra một phần của sợi beta, và có thể đóng

góp tương tác có triển vọng hơn (pi-cation) với gốc tương ứng với Lys388 từ DIIIE, do đó, góp phần vào độ ổn định cấu hình của kẹp tóc beta.

Các vị trí không thiết yếu nhưng có chức năng tiềm năng có thể thường được nhận diện thông qua các phương pháp tổ hợp, như việc sử dụng thư viện peptit thể thực khuẩn trong đó các vị trí thiết yếu/cấu trúc đã được cố định và các vị trí còn lại đã được ngẫu nhiên hóa. Trong trường hợp này, thư viện được sàng lọc đối với các trình tự tối ưu thông qua việc sử dụng các thử nghiệm gắn kết chọn lọc thể thực khuẩn của chúng biểu hiện các peptit gắn kết cao với phối tử đặc hiệu, như LRP1 và/hoặc  $\alpha 2M^*$ . Các trình tự tối ưu cũng có thể thu được thông qua việc sử dụng phương pháp thiết kế hợp lý.

Nhằm các mục đích của sáng chế, các peptit có cấu trúc kẹp tóc beta theo sáng chế có thể được tổng hợp hóa học hoặc, nếu trình tự của chúng chỉ chứa các axit amin tự nhiên, thông qua công nghệ ADN tái tổ hợp, riêng rẽ hoặc dưới dạng protein dung hợp. Việc sử dụng protein dung hợp, mà công nghệ ADN tái tổ hợp có thể được áp dụng, có thể làm tăng mức độ biểu hiện và độ ổn định của peptit tái tổ hợp đối với proteaza của vật chủ. Peptit có thể được gắn kết với đối tác dung hợp của nó thông qua vị trí nhận diện proteaza, mà sau đó có thể được sử dụng để giải phóng peptit bằng cách xử lý bằng proteaza cùng họ.

Ví dụ 1 của sáng chế bộc lộ thiết kế của chín peptit có cấu trúc kẹp tóc beta (SEQ ID No. 1 - SEQ ID No. 9). Về cơ bản, cấu trúc của chúng được cấu thành từ bốn đoạn: hai đoạn sợi beta (tương tự về mặt cấu trúc với kẹp tóc FG của DIIIE), được tách ra bởi vòng ngoặt beta và tiếp theo là phần kéo dài cation đầu tận cùng C chứa ba gốc lysin. Các peptit này được thiết kế theo tiêu chuẩn cấu trúc/chức năng đã nêu trên để tối ưu hóa hiệu lực kháng virus của chúng và việc gắn kết của chúng với các thụ thể tế bào.

Nhằm các mục đích của sáng chế, trình tự peptit được coi là tương tự với trình tự của các peptit có cấu trúc kẹp tóc beta được bộc lộ trong bản mô tả này (các peptit PHB1-9 trong bảng 1, SEQ ID1-9) nếu độ đồng nhất trình tự của peptit này với ít nhất một trong số các trình tự của các peptit có cấu trúc kẹp tóc beta PHB1-9 là lớn hơn hoặc bằng 70%, và tốt hơn là lớn hơn hoặc bằng 80%. Các trình tự của các peptit tương tự này khác nhau ở một hoặc một số vị trí, được chọn từ: 1) các vị trí dễ biến đổi a)-e) được mô tả trên đây, tại đó gốc hoặc các gốc cụ thể trong PHB1-9 được thay thế bởi các gốc mà cũng thể hiện khuynh hướng cấu trúc cao trong việc chiếm giữ vị trí đó trong các kẹp tóc beta; 2) các vị trí chức năng tiềm năng được mô tả trên đây,

nhờ đó (các) vị trí liên quan trong PHB1-9 bị chiếm giữ thay cho gốc hoặc các gốc của kẹp tóc FG của DIII<sub>E</sub> từ kiểu huyết thanh DENV cụ thể, trong đó (các) gốc này chiếm giữ vị trí tương tự trong kẹp tóc beta của các peptit PHB1-9; 3) các vị trí tương ứng với các gốc của nhân lysin đầu tận cùng C; trong trường hợp này, nhân này có thể bao gồm hai hoặc ba gốc lysin, tốt hơn là ba; và 4) các vị trí tương ứng với các cystein tạo ra liên kết disulfua của các peptit PHB1-4 và PHB7-9, trong đó một gốc Cys có thể được thay thế bằng Asp/Glu miễn là gốc Cys đối diện được thay thế bằng Lys, sao cho peptit này được cài thông qua việc hình thành liên kết amit giữa các chuỗi bên của các gốc này, tức là Asp/Glu ở một bên và Lys ở bên kia.

Hoạt tính của các peptit PHB1-9 được đánh giá trong thử nghiệm ức chế mảng trên các tế bào Vero, mà kết quả của chúng được thể hiện trong ví dụ 2. Tất cả chúng đều thể hiện hoạt tính kháng virus trong mô hình thử nghiệm này, sáu trong số chúng ở mức cao hơn so với peptit HDIII3CL. Peptit PHB4 đặc biệt thể hiện tác dụng kháng virus rất hiệu nghiệm ở phạm vi nanomol đối với tất cả bốn kiểu huyết thanh DENV, với chỉ số chọn lọc rất tốt (1290 đến 6450, tùy thuộc vào kiểu huyết thanh cụ thể). Vì vậy, peptit này cấu thành phân tử chỉ huy xuất sắc đối với sự phát triển của các dược chất kháng virus chống DENV, với hiệu lực tốt hơn so với các dược chất dự tuyển kháng virus đã được báo cáo trước đây.

Do đó, sáng chế còn bộc lộ dược phẩm chứa một hoặc nhiều peptit có cấu trúc kẹp tóc beta có trình tự axit amin được chọn từ các trình tự được nêu trong SEQ ID No. 1 đến SEQ ID No. 9, hoặc trình tự tương tự của chúng, và ít nhất một tá dược được dụng.

Theo một phương án theo sáng chế, các peptit bao gồm trong dược phẩm này tạo ra kết tụ siêu phân tử. Do peptit PHB4 (và, nói chung, peptit có cấu trúc kẹp tóc beta theo sáng chế) là phân tử mà được thiết kế tuân theo cấu trúc của sợi beta lưỡng tính, nó có thể tạo ra kết tụ siêu phân tử tùy thuộc vào nồng độ peptit và thành phần dung môi chính xác.

Ví dụ 5 thể hiện cách mà peptit tự lắp ráp thành cấu trúc nano, mà kích thước và hình dạng của nó phụ thuộc vào các điều kiện thử nghiệm như nồng độ peptit, nhiệt độ, dung môi, tuổi của dung dịch, sự có mặt của các chất phụ gia khác nhau, v.v.. Hoạt tính kháng virus của peptit này có thể thay đổi, tùy thuộc vào các điều kiện này.

Trong phạm vi của sáng chế này, thuật ngữ 'kết tụ siêu phân tử' được dự định để chỉ kết tụ được tạo ra bởi một số phân tử peptit, tốt hơn là nhiều hơn 10 phân tử peptit.

Ví dụ 8 thể hiện cách bổ sung albumin huyết thanh người (human serum albumin - HSA) ở thời điểm cụ thể sau khi peptit PHB4 được hòa tan vào nước muối tạo ra chế phẩm có hiệu lực ở phạm vi nanomol/dưới nanomol thấp. Kết quả này chỉ ra rằng có thể tạo ra peptit với sự có mặt của HSA, và sự có mặt của protein này dẫn đến tạo ra phức hợp peptit:HSA biểu hiện hoạt tính kháng virus rất cao. Đây là phát hiện quan trọng theo quan điểm dược động học nếu peptit này cần được phát triển thành hợp chất kháng virus, do không chỉ là thời gian bán thải trong huyết thanh của HSA rất dài, mà HSA còn có thể bảo vệ peptit này chống các proteaza huyết thanh và các tương tác không mong muốn với các cấu tử huyết thanh khác. Do đó, theo một phương án của sáng chế, được phẩm chứa peptit có cấu trúc kẹp tóc beta theo sáng chế còn chứa HSA.

Không phụ thuộc vào sự có mặt của HSA, thực tế là peptit PHB4 tự lắp ráp thành hạt nano là đặc điểm mong muốn theo quan điểm dược động học và dược lực học. Do kích thước của chúng, các hạt nano có xu hướng thể hiện thời gian bán thải trong huyết thanh dài hơn so với các peptit monome, mà thường được thanh thải và được chuyển hóa trong khoảng thời gian rất ngắn. Ngoài ra, các peptit monome rất dễ bị phân giải protein bởi các proteaza của vật chủ, mà sự lắp ráp chúng thành các hạt nano có xu hướng tạo ra sự bảo vệ một phần khỏi tình trạng này. Ngoài ra, hạt nano tạo ra thuộc tính cấu trúc mà trên đó có nhiều vị trí gắn kết trong một thực thể, mà có thể dẫn đến ảnh hưởng khả lực do việc gắn kết đa hóa trị và do đó, ái lực biểu kiến cao hơn đối với tương tác peptit-thụ thể hoặc, nói cách khác, hiệu lực kháng virus tốt hơn.

Các ví dụ 3 và 6 thể hiện rằng các peptit có cấu trúc kẹp tóc beta theo sáng chế có thể gắn kết với các protein  $\alpha 2M^*$  và LRP1, mà là thành phần của thụ thể nội bào giả định đối với DENV và do đó, sẽ cấu thành đích để phát triển các hợp chất kháng virus, như được báo cáo bởi *Huerta H. và các đồng tác giả, WO 2007/124698*.

Một phân thiết yếu của sáng chế là phân tích hoạt tính sinh học của các peptit có cấu trúc kẹp tóc beta theo sáng chế ở phạm vi nanomol. Như được thể hiện trong ví dụ 3, các peptit PHB2, PHB4, PHB5, PHB8 và PHB9 ức chế gắn kết của biến thể được biotin hóa của DIII<sub>E</sub> DENV1 tái tổ hợp (chủng Jamaica; DIII<sub>E</sub>1Jbiot) với protein  $\alpha 2M^*$  ở phạm vi nanomol/dưới micromol, và khả năng ức chế này cao hơn rõ rệt so với khả năng ức chế được thể hiện bởi DIII<sub>E</sub> không được biotin hóa (DIII<sub>E</sub>1J), do tỷ lệ phần trăm ức chế của chúng cao hơn gấp 1,5 đến 3 lần so với tỷ lệ phần trăm ức chế của DIII<sub>E</sub>1J. Ngược lại, khả năng ức chế được thể hiện bởi HDIII<sub>3</sub>CL ở khoảng nồng độ này là rất thấp so với DIII<sub>E</sub>1J. Ví dụ 6 chỉ ra rằng các peptit có cấu

trúc kẹp tóc beta theo sáng chế gắn kết với thụ thể LRP1 với khả lực cao, và peptit PHB4 thể hiện khả lực cao nhất về vấn đề này. Kết quả này là nhất quán với thực tế là PHB4 cũng là peptit có hiệu lực nhất trong các thử nghiệm đánh giá hoạt tính kháng virus.

Ví dụ 8 chứng tỏ rằng tác dụng kháng virus của các peptit có cấu trúc kẹp tóc beta liên quan đến khả năng gắn kết của chúng với thụ thể LRP1 và protein  $\alpha 2M^*$ , hỗ trợ chắc chắn cho quan điểm rằng các peptit này gây ra tác dụng kháng virus của chúng bằng cách ức chế sự xâm nhập của DENV vào tế bào đích của nó. Kết quả này còn nhấn mạnh sự hợp lý của chiến lược được bộc lộ trong sáng chế này để tối ưu hóa hiệu lực kháng virus của các peptit có cấu trúc kẹp tóc beta.

Khả năng của các peptit có cấu trúc kẹp tóc beta theo sáng chế trong việc gắn kết protein  $\alpha 2M^*$  và thụ thể LRP1 có thể được khai thác để phát triển các chất trị liệu để phòng các bệnh hoặc tình trạng bệnh có nguyên nhân từ các protein này. Sự ức chế nhiễm DENV có hiệu lực của chúng, như được bộc lộ trong sáng chế, là một ví dụ về khả năng đó.

Việc phong bế gắn kết của DENV (nói cách khác, ức chế gắn kết của protein E) với thụ thể nội bào giả định  $\alpha 2M^*/LRP1$  là lựa chọn tốt hơn để phát triển các dược chất kháng virus này so với các thụ thể khác đã biết trong tình trạng kỹ thuật. Các thụ thể được mô tả bởi các tác giả khác là các thụ thể bám dính, tức là chúng làm trung gian sự gắn kết của virus với màng tế bào chất, nhưng không nội hóa virus bằng cách nhập bào. Do giai đoạn bị ngăn chặn bởi các peptit theo sáng chế nằm phía sau giai đoạn bám dính ban đầu, nên các peptit sẽ có hiệu quả một cách độc lập với loại thụ thể hoặc các thụ thể đặc hiệu mà virus sử dụng để kết dính với tế bào đích.

Có tính đến các phát hiện này, sáng chế còn mô tả việc sử dụng các peptit có cấu trúc kẹp tóc beta được mô tả trong bản mô tả này để bào chế thuốc. Theo một phương án, thuốc này được sử dụng để ức chế hoặc làm thuyên giảm bệnh nhiễm trùng do DENV gây ra. Theo một phương án khác, thuốc được sản xuất bởi các peptit có cấu trúc kẹp tóc beta theo sáng chế được dùng để điều trị các tình trạng bệnh lý có nguyên nhân từ các protein  $\alpha 2M^*$  hoặc LRP1.

Sáng chế còn mô tả phương pháp ức chế hoặc làm thuyên giảm bệnh nhiễm trùng do DENV gây ra ở bệnh nhân bị ảnh hưởng, được đặc trưng bởi việc cho bệnh nhân này dùng một hoặc nhiều peptit có cấu trúc kẹp tóc beta theo sáng chế, hoặc dược phẩm chứa ít nhất một trong số các peptit này.

### Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Thiết kế và tổng hợp các peptit có cấu trúc kẹp tóc beta ức chế sự nhiễm virus Dengue

#### Mô tả trình tự của các peptit có cấu trúc kẹp tóc beta theo sáng chế

Tổng số chín peptit có cấu trúc kẹp tóc beta, được gọi tên là PHB1-9 trong Bảng 1, mà trình tự của chúng được nêu trong SEQ ID No. 1-9, được thiết kế bắt đầu từ peptit HDIII3CL (SEQ ID No. 10), theo các tiêu chuẩn cấu trúc/chức năng nhằm mục đích làm tăng hiệu lực hoạt tính kháng virus của chúng và độ bền của gắn kết của chúng với các thụ thể tế bào khi so sánh với HDIII3CL. Cấu trúc của các peptit này về cơ bản được cấu thành từ bốn đoạn: hai đoạn sợi beta (tương tự về mặt cấu trúc với các đoạn của kẹp tóc beta FG của DIIIIE), được tách ra bởi vòng ngoặt beta và tiếp theo là phần kéo dài cation đầu tận cùng C chứa ba gốc lysin. Hai cấu trúc liên kết khác nhau được sử dụng: cấu trúc liên kết nguyên thể, được dùng trong các peptit PHB1-4 và PHB7-9, trong đó khung polypeptit chạy theo cùng hướng như trong kẹp tóc beta FG của DIIIIE, và cấu trúc liên kết đảo ngược, được sử dụng trong các peptit PHB5 và PHB6. Trong các peptit có cấu trúc liên kết nguyên thể, đoạn sợi beta thứ nhất (Beta1 trong Bảng 1) tương ứng về mặt cấu trúc với sợi beta F, và đoạn sợi beta thứ hai (Beta2) tương ứng với sợi beta G (Fig. 1E). Chiều dài sợi trong các peptit PHB1, PHB2 và PHB7 là giống với chiều dài sợi của peptit HDIII3CL (sợi sáu gốc), nhưng đã được kéo dài đến bảy gốc trong các peptit PHB5-6 và đến tám gốc trong các peptit PHB3-4 và PHB8-9. Các sợi dài hơn làm tăng độ ổn định cấu hình của các peptit (Stanger, H. E., et al. (2001). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 12015–12020).

Các gốc Cys1, Asn/Tyr3 và Thr5 từ các peptit PHB1, PHB2 và PHB7 tương ứng với các vị trí NHB được tiếp xúc trong kẹp tóc beta FG của DIIIIE. Gốc Asn, tương đương với gốc Asn377 trong DIIIIE DENV3, được chọn đối với vị trí 3 (Asn3) của các peptit PHB1 và PHB7, và gốc Tyr, tương đương với Tyr377 của DIIIIE từ DENV1, DENV2 và DENV4, được chọn đối với vị trí 3 (Tyr3) của peptit PHB2. Tyr3 là được ưu tiên so với Asn3, do nó được bảo toàn hơn qua các kiểu huyết thanh DENV, có khuynh hướng cao hơn đối với việc tạo ra tấm beta, và được bố trí chéo với Lys10, tạo thuận lợi cho tương tác pi-cation có lợi giữa các chuỗi bên tương ứng của chúng (Fig. 2B). Gốc Thr được chọn đối với vị trí 5 (Thr5) thay cho Val/Ile379 được thấy trong các trình tự DIIIIE DENV (Fig. 1E). Cơ sở hợp lý đằng sau lựa chọn này không chỉ ở chỗ Thr là thay thế bảo toàn so với Val/Ile với khuynh hướng tạo ra tấm beta tốt, mà còn ở chỗ nó ưa nước hơn so với hai gốc thay thế kia (do đó, góp phần

tích cực vào độ tan của peptit trong nước) và có trị số thông số ưu tiên về cấu trúc cao hơn (vị trí 2 của kẹp tóc beta có 8 gốc trên Fig. 1E). Các gốc Cys14, Asn12 và Lys10 trong các peptit này chiếm giữ các vị trí lần lượt liền kề Cys1, Tyr/Asn3 và Thr 5 trên cùng bề mặt của kẹp tóc beta, nhưng không có liên kết hydro khung giữa các gốc này. Các gốc Lys10 và Asn12 tương ứng, về mặt cấu trúc và về mặt chức năng, với các gốc Lys388 (được bảo toàn trong DENV1-3) và Asn390 (được bảo toàn trong DENV2-3). Gốc Trp được chọn đối với vị trí 13, do gốc tương đương trong DIIIIE (Trp391) được bảo toàn nghiêm ngặt qua tất cả các kiểu huyết thanh DENV. Các xystein Cys1 và Cys14 tạo ra liên kết disulfua đáp ứng vai trò cấu trúc thiết yếu. Chúng chiếm giữ các vị trí NHB, và liên kết disulfua ở vị trí này góp phần có lợi vào độ ổn định của các kẹp tóc beta (Santiveri C.M., et al. (2008). *Chem. Eur. J.*, 14, 488 – 499). Dưới đây trong sáng chế này, sẽ chứng minh được bằng thử nghiệm rằng các gốc Lys10, Trp13, Cys1 và Cys14 là thiết yếu đối với hoạt tính kháng virus của các peptit này. Các peptit tương tự như HDIII3CL, trong đó sự thay thế xảy ra ở một vị trí (Lys14 → Ala hoặc Trp17 → Ala, Lys14 trong HDIII3CL tương ứng về mặt cấu trúc với gốc Lys10 của PHB1, PHB2 và PHB7; và Trp17 của HDIII3CL tương ứng về mặt cấu trúc với gốc Trp13 của PHB1, PHB2 và PHB7) hoặc ở hai vị trí (Cys1 → Ser và Cys18 → Ser, Cys18 của HDIII3CL tương ứng về mặt cấu trúc với gốc Cys14 của PHB1, PHB2 và PHB7), không thể hiện tác dụng kháng virus có thể phát hiện được ở khoảng nồng độ được thử nghiệm. Ngoài ra, dưới đây trong bản mô tả này, sẽ chứng minh được bằng thử nghiệm rằng Tyr3 là lựa chọn tốt hơn so với Asn3, do peptit PHB9 thể hiện hiệu lực kháng virus cao hơn so với peptit PHB8, mà sự khác biệt duy nhất của chúng là bản chất của sự thay thế ở vị trí tương ứng với Tyr375 của DIIIIE từ DENV1-2 và DENV4.

Bảng 1. Thiết kế các peptit có cấu trúc kẹp tóc beta

| <i>eq</i><br><i>o.</i> | Tên  | [Beta1]      | [Vòng<br>ngoặt] | [Beta2]      | Ph<br>ần kéo dài | Cá<br>u trúc liên<br>kết | yp vòng<br>ngoặt beta |   |
|------------------------|------|--------------|-----------------|--------------|------------------|--------------------------|-----------------------|---|
|                        | PHB1 | CVNWTE       | pD              | KKVN<br>WC   | K<br>KK          | ng<br>uyên thể           | IP                    | 1 |
|                        | PHB2 | CVYWTR       | pK              | WKV<br>NWC   | K<br>KK          | ng<br>uyên thể           | IP                    | 1 |
|                        | PHB3 | CIEVNW<br>TE | pD              | KKVN<br>WFIC | K<br>KK          | ng<br>uyên thể           | IP                    | 1 |
|                        | PHB4 | CIEVYW<br>TR | pK              | WKV<br>NWFIC | K<br>KK          | ng<br>uyên thể           | IP                    | 1 |

| <i>eq</i><br><i>o.</i> | <i>Tên</i>     | <i>[Beta1]</i> | <i>[Vòng<br/>ngoặt]</i> | <i>[Beta2]</i> | <i>Ph<br/>ân kéo dài</i> | <i>Cá<br/>u trúc liên<br/>kết</i> | <i>yp vòng<br/>ngoặt beta</i> |
|------------------------|----------------|----------------|-------------------------|----------------|--------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
|                        | PHB5           | FWNWK<br>WE    | kN                      | KWT<br>WNVE    | G<br>GKKK                | đa<br>o ngược                     | 1<br>IP                       |
|                        | PHB6           | FWNWK<br>WE    | pN                      | KWT<br>WNVE    | G<br>GKKK                | đa<br>o ngược                     | 1<br>IP                       |
|                        | PHB7           | CVNVTI         | NG                      | KKYN<br>WC     | K<br>KK                  | ng<br>uyên thể                    | 1<br>P                        |
|                        | PHB8           | CIEVNVT<br>I   | NG                      | KKYN<br>WFIC   | K<br>KK                  | ng<br>uyên thể                    | 1<br>P                        |
|                        | PHB9           | CIEVYVT<br>I   | NG                      | KKYN<br>WFIC   | K<br>KK                  | ng<br>uyên thể                    | 1<br>P                        |
| 0                      | HDIII3C<br>L   | CSNIVI         | GIGD<br>KA              | LKIN<br>WC     | K<br>K                   | ng<br>uyên thể                    | (<br>aa                       |
| 1                      | HDIII3C<br>L2  | CSNIVI         | GIGD<br>KA              | LKIN<br>WC     | K<br>KK                  | ng<br>uyên thể                    | (<br>aa                       |
| 2                      | HDIII3C<br>LW- | CSNIVI         | GIGD<br>KA              | LKIN<br>AC     | K<br>KK                  | ng<br>uyên thể                    | (<br>aa                       |
| 3                      | HDIII3C<br>LK- | CSNIVI         | GIGD<br>KA              | LAIN<br>WC     | K<br>KK                  | ng<br>uyên thể                    | (<br>aa                       |
| 4                      | HDIII3C<br>LC- | SSNIVI         | GIGD<br>KA              | LKIN<br>WS     | K<br>KK                  | ng<br>uyên thể                    | (<br>aa                       |

*p*, prolin chất đồng phân lập thể D; *k*, lysin chất đồng phân lập thể D; *cấu trúc liên kết nguyên thể*: giống với cấu trúc liên kết của kẹp tóc beta FG của DIIE; *cấu trúc liên kết đảo ngược*, ngược với cấu trúc liên kết của kẹp tóc beta FG của DIIE.

Các gốc Val2, Trp/Val4, Glu/Arg/Ile6, Lys/Trp9, Val/Tyr11 và Trp13 tạo ra một phần của bề mặt đối diện của kẹp tóc, chiếm giữ các vị trí HB. Các vị trí 2, 4 và 6 lần lượt liên kết các vị trí 13, 11 và 9, và tạo ra liên kết hydro khung. Vị trí 13 chỉ bị chiếm bởi Trp, như được nêu trên đây, và các vị trí còn lại được chọn theo trị số của thông số ưu tiên đối với mỗi gốc (Fig. 1A và B). Các cặp Glu6-Lys9 (PHB1) và Arg6-Trp9 (PHB2) được chọn đối với các vị trí 6 và 9, do thực tế là chúng lần lượt có thể thiết lập cầu muối và tương tác pi-cation có lợi. Lys9 (PHB1 và PHB7) có thể bắt chước về mặt chức năng vai trò của gốc Lys385 của DIIE, là thiết yếu đối với tương tác với  $\alpha 2M^*$ , như được minh họa dưới đây trong bản mô tả này.

Các peptit PHB1 và PHB2 đã được thiết kế sao cho vòng ngoặt beta typ IIP tạo ra giữa các gốc 6 và 9. Vị trí 7 trong các peptit này bị chiếm bởi gốc d-Pro (chất đồng phân lập thể D của prolin), là axit amin ưu tiên đối với vị trí thứ hai của vòng ngoặt beta typ IIP (Pantoja-Uceda D, et al. (2006) *Methods Mol Biol.*; 340:27-51). Asp được chọn đối với vị trí 8 trong peptit PHB1 do điểm của thông số ưu tiên cao đối với

axit amin này ở vị trí này. Ngược lại, gốc Lys được chọn thay cho vị trí 8 trong peptit PHB2, với ý định bắt chước Lys386 từ DIIIE. Đối với peptit PHB7, vòng ngoặt beta typ IP được đưa vào giữa các vị trí 6 và 9. Việc lựa chọn gốc đối với các vị trí 7 và 8 (Asn7 và Gly8) được chi phối bởi trị số của thông số ưu tiên (Fig. 1A và B). Các dipeptit Asn-Gly là rất phổ biến trong vòng ngoặt beta typ IP.

Trình tự của kẹp tóc beta của các peptit PHB3 và PHB4 lần lượt bao gồm trình tự của kẹp tóc tương ứng trong các peptit PHB1 và PHB2 (Bảng 1). Trong trường hợp này, các vị trí 4-15 trên trình tự của kẹp tóc beta của các peptit PHB3 và PHB4 là tương đương với các vị trí 2-13 trên trình tự của kẹp tóc của các peptit PHB1 và PHB2, và vì vậy, các gốc được chọn đối với các vị trí 4-15 của PHB3 và PHB4 áp dụng cùng tiêu chuẩn được mô tả trên đây đối với các peptit PHB1 và PHB2.

Tương tự, các peptit PHB8 và PHB9 chứa trình tự của peptit PHB7, và các gốc ở các vị trí 4-15 được chọn theo cùng tiêu chuẩn như đối với các vị trí 2-13 trong PHB7. Các gốc Glu3 và Phe16 trong PHB3, PHB4, PHB8 và PHB9 được chọn với mục đích bắt chước Glu375 (được bảo toàn trong DENV1 và DENV3, Asp trong DENV2 và DENV4) và Phe392 (được bảo toàn trong DENV1, DENV2 y DENV4, Tyr trong DENV3) từ DIIIE (Fig. 1E). Các gốc Ile2 và Ile17 trong PHB3-4 và PHB8-9 được chọn do khuynh hướng tạo ra cấu trúc sợi beta của chúng. Cys1 và Cys18 chiếm giữ các vị trí NHB, và được đưa vào để tạo ra liên kết disulfua kẹp giữ peptit, do đó, làm ổn định cấu trúc kẹp tóc beta (Fig. 1E và Fig. 2).

Cấu trúc liên kết của các peptit PHB5 và PHB6 được đảo ngược so với cấu trúc liên kết của vòng kẹp tóc FG nguyên thể trong DIIIE. Trong trường hợp của chúng, các gốc Phe1, Asn3, Lys5, Thr12, Asn14 và Glu16 tương đương về mặt cấu trúc với Phe16, Asn14, Lys12, Thr7, Asn5 và Glu3 trong peptit PHB3, nhưng chúng chiếm giữ các vị trí HB tương tác với nhau thông qua liên kết hydro. Các gốc Trp4 và Trp6, mà liền kề các gốc Trp11 và Trp13 trong kẹp tóc được gấp cuộn, chiếm giữ các vị trí NHB, và được chọn sao cho tạo ra khóa kéo Trp làm tăng độ ổn định cấu hình của kẹp tóc beta. Gốc Trp2 tương ứng về mặt cấu trúc với gốc Trp391 của DIIIE, và được chọn do các nguyên nhân được nêu trên đây. Các gốc Glu7 và Lys10 được chọn trên cơ sở điểm thông số ưu tiên cao và trên thực tế là chúng có thể tạo ra cầu muối mà sẽ tạo ra độ ổn định hơn cho kẹp tóc này. Việc lựa chọn Asn9 cũng dựa trên điểm thông số ưu tiên cao. Gốc d-Pro8 trong PHB6 được chọn do đây là axit amin ưu tiên đối với vị trí 2 trong vòng ngoặt beta typ IIP. Gốc d-Lys được đưa vào PHB5 (ở vị trí 8) là nhằm mục đích bắt chước gốc Lys385 của DIIIE; ngoài ra, d-Lys là ưu tiên hơn đối

với vị trí 2 của vòng ngoặt beta typ IIP so với chất đồng phân lập thể L của nó. Theo cách khác, Lys10 trong PHB5 và PHB6 cũng có thể bắt chước Lys385 từ DIIE.

Phần kéo dài đầu tận cùng C được đưa vào các peptit PHB1-9 bao gồm tripeptit Lys. Mục đích của chúng là nhằm làm tăng độ tan của các peptit có cấu trúc kẹp tóc beta theo sáng chế và đem lại cho chúng tính cation, do đó, làm thuận lợi cho tương tác của chúng thông qua lực tĩnh điện với thụ thể LRP1, mà là protein anion. Trong trường hợp các peptit PHB5 và PHB6, tripeptit cation được gắn vào kẹp tóc beta thông qua chất đệm di-glyxin dipeptit, được dự định để tạo ra độ linh động nhất định giữa cả hai đoạn và để ngăn cản sự kéo dài cấu trúc beta đã được kéo dài của sợi Beta2.

Các fig. 1C và 1D thể hiện sự biểu diễn kiểu biểu tượng (*J. Gorodkin, et al. (1997). Comput. Appl. Biosci., Vol. 13, no. 6: 583-586; T. D. Schneider & R. M. Stephens. (1990). Nucleic Acids Research, Vol. 18, No 20, p. 6097-6100*) của trình tự liên ứng lần lượt được tạo ra bằng cách bắt cặp với các kẹp tóc beta typ IP và IIP dài 8 gốc. Chúng thu được bằng cách sử dụng máy chủ web “Protein Sequence Logos using Relative Entropy” ở <http://www.cbs.dtu.dk/~gorodkin/appl/plogo.html>. Sự biểu diễn này là cách biểu diễn thay thế cho ma trận thông số ưu tiên được thể hiện trên các fig. 1A và 1B. Cỡ của chữ cái biểu thị mỗi axit amin là tỷ lệ thuận với “tầm quan trọng” của axit amin đó ở mỗi vị trí; tức là chữ cái lớn hơn ngụ ý rằng gốc này là ưu tiên về mặt cấu trúc hơn.

Ngoài các peptit PHB1-9, Bảng 1 thể hiện trình tự của peptit HDIII3CL (SEQ ID No.10) và một số biến thể của nó, mang các thay thế các gốc được chọn cho gốc alanin, mà được sử dụng để khảo sát tầm quan trọng của các gốc được thế đối với hoạt tính kháng virus của peptit này. Do đó, các peptit thiết kế được là HDIII3CL2, trong đó peptit HDIII3CL được kéo dài đầu tận cùng C bởi 3 gốc lysin (SEQ ID No. 11); HDIII3CLW-, thể đột biến Trp17→Ala của HDIII3CL2 (SEQ ID No. 12); HDIII3CLK-, thể đột biến Lys14→Ala của HDIII3CL2 (SEQ ID No. 13); và HDIII3CLC-, thể đột biến kép Cys1→Ala và Cys18→Ala của peptit HDIII3CL2 (SEQ ID No. 14).

Fig. 2 thể hiện mô hình cấu trúc ba chiều của các peptit có cấu trúc kẹp tóc beta HDIII3CL (A) và PHB4 (B). Trong trường hợp peptit HDIII3CL (Fig. 2A), hình vẽ này thể hiện đoạn tương ứng với kẹp tóc (mà không có phần kéo dài đầu tận cùng C cation) và nêu bật một số gốc quan trọng. Các số trong dấu ngoặc đơn tương ứng với

tung độ của các gốc tương ứng trong DIIIE. Trong trường hợp peptit PHB4 (Fig. 2B), đầu móc được sử dụng để chỉ ra phần mà sợi này được kéo dài so với HDIII3CL, và các chuỗi bên sau, mà quan trọng đối với hoạt tính sinh học của các peptit theo sáng chế, được nêu bật: 1) Lys nằm ở vòng ngoặt/vòng, tương ứng với Lys385 của DIIIE, 2) Lys nằm ở sợi beta thứ hai, tương ứng với Lys388 của DIIIE, 3) Trp nằm ở sợi beta thứ hai, tương ứng với Trp391 của DIIIE, 4) Tyr nằm ở sợi beta thứ nhất, tương ứng với Tyr377 của DIIIE. Fig. 2C thể hiện sự đặt chồng cấu trúc của cả hai peptit.

Các peptit PHB1-9, được bộc lộ trong bản mô tả này, là các ví dụ cụ thể của các peptit có cấu trúc kẹp tóc beta có hoạt tính kháng virus có hiệu lực cao chống DENV mà có thể được thiết kế theo các nguyên tắc chung sau được nêu trong phần mô tả và trong phần ví dụ của sáng chế. Do đó, sáng chế bao trùm peptit có cấu trúc kẹp tóc beta bất kỳ mà trình tự của nó tương tự với ít nhất một trong số các peptit thuộc bộ PHB1-9, sao cho độ đồng nhất trình tự của nó là cao hơn hoặc bằng 70%, và tốt hơn là cao hơn hoặc bằng 80%. Các peptit tương tự này sẽ mang các khác biệt ở một hoặc một vài vị trí được chọn trong số: 1) các vị trí dễ biến đổi a-e), được mô tả trong phần mô tả của sáng chế; trong trường hợp này, (các) gốc trong PHB1-9 sẽ được thay thế bằng các gốc còn biểu hiện khuynh hướng cấu trúc cao để chiếm giữ vị trí đó trong các kẹp tóc beta; 2) các vị trí chức năng tiềm năng, được mô tả trong phần mô tả của sáng chế; trong trường hợp này, (các) gốc trong PHB1-9 sẽ được thay thế bằng gốc từ vị trí tương đương của kẹp tóc beta FG của DIIIE từ kiểu huyết thanh DENV cụ thể; 3) các vị trí tương ứng với phần kéo dài Lys đầu tận cùng C; trong trường hợp này, phần kéo dài bao gồm hai hoặc ba gốc lysin, tốt hơn là ba, và 4) các vị trí tương ứng với các xystein tạo ra liên kết disulfua của các peptit PHB1-4 và PHB7-9; trong các trường hợp này, một thành viên của cặp Cys có thể được thay thế bằng Asp/Glu hoặc Lys và thành viên kia được thay thế bằng Lys hoặc Asp/Glu, sao cho peptit này có thể được cài bằng cách tạo ra liên kết amit giữa các chuỗi bên của các gốc này, tức là Asp/Glu ở một bên và Lys ở bên kia.

Các trình tự của các peptit có cấu trúc kẹp tóc beta tương tự với các peptit thuộc bộ PHB1-9 có thể được mô tả theo các thuật ngữ chung như sau:

- i. **Các peptit tương tự với PHB1 và PHB2:** đây là các peptit có độ đồng nhất trình tự là 70% hoặc cao hơn (tốt hơn là 80% hoặc cao hơn) so với PHB1 hoặc PHB2, trong đó trình tự của chúng bao gồm,

**Vị trí 1** (cấu trúc, đóng vòng): Cys hoặc Lys hoặc Asp hoặc Glu, nếu Cys thì nó tạo thành liên kết disulfua với gốc Cys ở vị trí 14, nếu Glu/Asp (Lys) thì chuỗi bên của nó tạo ra liên kết amit với chuỗi bên Lys (Glu/Asp) ở vị trí 14

**Vị trí 2** (dễ biến đổi “a”): Val hoặc Ile hoặc Trp hoặc Phe hoặc Tyr hoặc Met

**Vị trí 3** (chức năng tiềm năng): Tyr hoặc Asn

**Vị trí 4** (dễ biến đổi “a”): Trp hoặc Val hoặc Phe hoặc Glu

**Vị trí 5** (dễ biến đổi “d”): Thr hoặc Val hoặc Ile (hai gốc sau là các gốc xuất hiện trong các trình tự DENV tự nhiên)

**Vị trí 6** (dễ biến đổi “a”): Arg hoặc Ile hoặc Val hoặc Glu hoặc Leu

**Vị trí 7** (dễ biến đổi “b”): d-Pro

**Vị trí 8** (dễ biến đổi “b”): Asp hoặc Lys hoặc Asn

**Vị trí 9** (dễ biến đổi “a” và “e”): Trp hoặc Lys hoặc Met hoặc Thr hoặc Gln

**Vị trí 10** (chức năng tiềm năng): Lys

**Vị trí 11** (dễ biến đổi “a”): Val hoặc Met hoặc His hoặc Leu

**Vị trí 12** (chức năng tiềm năng): Asn hoặc Asp hoặc Ser hoặc His

**Vị trí 13** (vị trí thiết yếu): Trp

**Vị trí 14** (cấu trúc, đóng vòng): Cys hoặc Lys hoặc Asp hoặc Glu, nếu là Cys thì nó tạo thành liên kết disulfua với gốc Cys ở vị trí 1, nếu là Glu/Asp (Lys) thì chuỗi bên của nó tạo ra liên kết amit với chuỗi bên Lys (Glu/Asp) ở vị trí 1

**Vị trí 15-17 hoặc 15-16** (phần kéo dài đầu tận cùng C): Tripeptit Lys-Lys-Lys hoặc dipeptit Lys-Lys.

- ii. **Các peptit tương tự với PHB3 và PHB4:** Đây là các peptit có độ đồng nhất trình tự là 70% hoặc cao hơn (tốt hơn là 80% hoặc cao hơn) so với các peptit PHB3 và PHB4, trong đó các peptit tương tự này có trình tự bao gồm:

**Vị trí 1** (cấu trúc, đóng vòng): Cys hoặc Lys hoặc Asp hoặc Glu, nếu Cys thì nó tạo thành liên kết disulfua với gốc Cys ở vị trí 18, nếu Glu/Asp (Lys) thì chuỗi bên của nó tạo ra liên kết amit với chuỗi bên Lys (Glu/Asp) ở vị trí 18

**Vị trí 2** (dễ biến đổi “a”): Ile hoặc Val hoặc Trp hoặc Phe hoặc Tyr hoặc Met

**Vị trí 3** (chức năng tiềm năng): Glu hoặc Asp

**Vị trí 4** (dễ biến đổi “a”): Val hoặc Ile hoặc Trp hoặc Phe hoặc Tyr hoặc Met

**Vị trí 5** (chức năng tiềm năng): Tyr hoặc Asn

**Vị trí 6** (dễ biến đổi “a”): Trp hoặc Val hoặc Phe hoặc Glu

**Vị trí 7** (dễ biến đổi “d”): Thr hoặc Val hoặc Ile (hai gốc sau là các gốc xuất hiện trong các trình tự DENV tự nhiên)

**Vị trí 8** (dễ biến đổi “a”): Arg hoặc Ile hoặc Val hoặc Glu hoặc Leu

**Vị trí 9** (dễ biến đổi “b”): d-Pro

**Vị trí 10** (dễ biến đổi “b”): Asp hoặc Lys hoặc Asn

**Vị trí 11** (dễ biến đổi “a” và “e”): Trp hoặc Lys hoặc Met hoặc Thr hoặc Gln

**Vị trí 12** (chức năng tiềm năng): Lys

**Vị trí 13** (dễ biến đổi “a”): Val hoặc Met hoặc His hoặc Leu

**Vị trí 14** (chức năng tiềm năng): Asn hoặc Asp hoặc Ser hoặc His

**Vị trí 15** (vị trí thiết yếu): Trp

**Vị trí 16** (chức năng tiềm năng): Phe hoặc Tyr

**Vị trí 17** (dễ biến đổi “a”): Ile hoặc Val hoặc Trp hoặc Phe hoặc Tyr hoặc Met

**Vị trí 18** (cấu trúc, đóng vòng): Cys hoặc Lys hoặc Asp hoặc Glu, nếu Cys thì nó tạo thành liên kết disulfua với gốc Cys ở vị trí 1, nếu Glu/Asp (Lys) thì chuỗi bên của nó tạo ra liên kết amit với chuỗi bên Lys (Glu/Asp) ở vị trí 1

**Vị trí 19-21 hoặc 19-20** (phần kéo dài đầu tận cùng C): Tripeptit Lys-Lys-Lys hoặc dipeptit Lys-Lys

- iii. **Các peptit tương tự với PHB7:** Đây là các peptit có độ đồng nhất trình tự là 70% hoặc cao hơn (tốt hơn là 80% hoặc cao hơn) so với peptit PHB7, trong đó các peptit tương tự này có trình tự bao gồm:

**Vị trí 1** (cấu trúc, đóng vòng): Cys hoặc Lys hoặc Asp hoặc Glu, nếu Cys thì nó tạo thành liên kết disulfua với gốc Cys ở vị trí 14, nếu Glu/Asp (Lys) thì chuỗi bên của nó tạo ra liên kết amit với chuỗi bên Lys (Glu/Asp) ở vị trí 14

**Vị trí 2** (dễ biến đổi “a”): Val hoặc Ile hoặc Trp hoặc Phe hoặc Tyr hoặc Met

**Vị trí 3** (chức năng tiềm năng): Tyr hoặc Asn

**Vị trí 4** (dễ biến đổi “a”): Val hoặc Ile hoặc Phe hoặc Tyr hoặc Leu

**Vị trí 5** (dễ biến đổi “d”): Thr hoặc Val hoặc Ile (hai gốc sau là các gốc xuất hiện trong các trình tự DENV tự nhiên)

**Vị trí 6** (dễ biến đổi “a”): Ile hoặc Val hoặc Tyr, His hoặc Lys

**Vị trí 7** (dễ biến đổi “b”): Asn hoặc Asp

**Vị trí 8** (dễ biến đổi “b”): Gly

**Vị trí 9** (dễ biến đổi “a” và “e”): Lys hoặc His hoặc Arg hoặc Val hoặc Tyr hoặc Glu hoặc Met

**Vị trí 10** (chức năng tiềm năng): Lys

**Vị trí 11** (dễ biến đổi “a”): Tyr hoặc Val hoặc Gln hoặc Trp, Phe

**Vị trí 12** (chức năng tiềm năng): Asn hoặc Asp hoặc Ser hoặc His

**Vị trí 13** (vị trí thiết yếu): Trp

**Vị trí 14** (cấu trúc, đóng vòng): Cys hoặc Lys hoặc Asp hoặc Glu, nếu Cys thì nó tạo thành liên kết disulfua với gốc Cys ở vị trí 1, nếu Glu/Asp (Lys) thì chuỗi bên của nó tạo ra liên kết amit với chuỗi bên Lys (Glu/Asp) ở vị trí 1

**Vị trí 15-17 hoặc 15-16** (phần kéo dài đầu tận cùng C): Tripeptit Lys-Lys-Lys hoặc dipeptit Lys-Lys

- iv. **Các peptit tương tự với PHB8 và PHB9:** Đây là các peptit có độ đồng nhất trình tự là 70% hoặc cao hơn (tốt hơn là 80% hoặc cao hơn) so với các peptit PHB8 và PHB9, trong đó các peptit tương tự này có trình tự bao gồm:

**Vị trí 1** (cấu trúc, đóng vòng): Cys hoặc Lys hoặc Asp hoặc Glu, nếu Cys thì nó tạo thành liên kết disulfua với gốc Cys ở vị trí 18, nếu Glu/Asp (Lys) thì chuỗi bên của nó tạo ra liên kết amit với chuỗi bên Lys (Glu/Asp) ở vị trí 18

**Vị trí 2** (dễ biến đổi “a”): Ile hoặc Val hoặc Trp hoặc Phe hoặc Tyr hoặc Met

**Vị trí 3** (chức năng tiềm năng): Glu hoặc Asp

**Vị trí 4** (dễ biến đổi “a”): Val hoặc Ile hoặc Trp hoặc Phe hoặc Tyr hoặc Met

**Vị trí 5** (chức năng tiềm năng): Tyr hoặc Asn

**Vị trí 6** (dễ biến đổi “a”): Val hoặc Ile hoặc Phe hoặc Tyr hoặc Leu

**Vị trí 7** (dễ biến đổi “d”): Thr hoặc Val hoặc Ile (hai gốc sau là các gốc xuất hiện trong các trình tự DENV tự nhiên)

**Vị trí 8** (dễ biến đổi “a”): Ile hoặc Val hoặc Tyr hoặc His hoặc Lys

**Vị trí 9** (dễ biến đổi “b”): Asn hoặc Asp

**Vị trí 10** (dễ biến đổi “b”): Gly

**Vị trí 11** (dễ biến đổi “a” và “e”): Lys hoặc His hoặc Arg hoặc Val hoặc Tyr hoặc Glu hoặc Met

**Vị trí 12** (chức năng tiềm năng): Lys

**Vị trí 13** (dễ biến đổi “a”): Tyr hoặc Val hoặc Gln hoặc Trp, Phe

**Vị trí 14** (chức năng tiềm năng): Asn hoặc Asp hoặc Ser hoặc His

**Vị trí 15** (vị trí thiết yếu): Trp

**Vị trí 16** (chức năng tiềm năng): Phe hoặc Tyr

**Vị trí 17** (dễ biến đổi “a”): Ile hoặc Val hoặc Trp hoặc Phe hoặc Tyr hoặc Met

**Vị trí 18** (cấu trúc, đóng vòng): Cys hoặc Lys hoặc Asp hoặc Glu, nếu Cys thì nó tạo thành liên kết disulfua với gốc Cys ở vị trí 1, nếu Glu/Asp (Lys) thì chuỗi bên của nó tạo ra liên kết amit với chuỗi bên Lys (Glu/Asp) ở vị trí 1

**Vị trí 19-21 hoặc 19-20** (phần kéo dài đầu tận cùng C): Tripeptit Lys-Lys-Lys hoặc dipeptit Lys-Lys

- v. **Các peptit tương tự với PHB5 và PHB6:** Đây là các peptit có độ đồng nhất trình tự là 70% hoặc cao hơn (tốt hơn là 80% hoặc cao hơn) so với các peptit PHB5 và PHB6, trong đó các peptit tương tự này có trình tự bao gồm:

**Vị trí 1** (chức năng tiềm năng): Phe hoặc Tyr

**Vị trí 2** (vị trí thiết yếu): Trp

**Vị trí 3** (chức năng tiềm năng): Asn hoặc Asp hoặc Ser hoặc His

**Vị trí 4** (dễ biến đổi “a”): Trp

**Vị trí 5** (chức năng tiềm năng): Lys

**Vị trí 6** (dễ biến đổi “a”): Trp

**Vị trí 7** (chức năng tiềm năng, dễ biến đổi “b”): Glu hoặc Val hoặc Arg hoặc Ile hoặc Asp

**Vị trí 8** (dễ biến đổi “b”): d-Pro hoặc d-Lys

**Vị trí 9** (dễ biến đổi “b”): Asn hoặc Asp hoặc Lys

**Vị trí 10** (chức năng tiềm năng, dễ biến đổi “b”): Lys hoặc Met hoặc Trp hoặc Gln hoặc Thr

**Vị trí 11** (dễ biến đổi “a”): Trp

**Vị trí 12** (dễ biến đổi “d”): Thr hoặc Val hoặc Ile (hai gốc sau là các gốc xuất hiện trong các trình tự DENV tự nhiên)

**Vị trí 13** (dễ biến đổi “a”): Trp

**Vị trí 14** (chức năng tiềm năng): Tyr hoặc Asn

**Vị trí 15** (dễ biến đổi “a”): Ile hoặc Val hoặc Trp hoặc Phe hoặc Tyr hoặc Met

**Vị trí 16** (chức năng tiềm năng): Glu hoặc Asp

**Vị trí 17-21 hoặc 17-20** (phần kéo dài đầu tận cùng C): Pentapeptit Gly-Gly-Lys-Lys-Lys hoặc tetrapeptit Gly-Gly-Lys-Lys

### Tổng hợp peptit

Các peptit được liệt kê trong Bảng 1 thu được bằng cách tổng hợp pha rắn trên nhựa Fmoc-AM-MBHA, theo phương pháp Fmoc/tBu (Barany, G. & Merrifield, R. B. (1977) *J Am Chem Soc.* 99 7363-7365). Quy trình này được thực hiện thủ công, trên bơm tiêm dung tích 10 ml được lắp miếng thủy tinh frít xóp, sao cho tất cả chất phản ứng và dung môi có thể được loại bỏ một cách thuận tiện bằng cách lọc trong chân không. Các axit amin được ghép cặp bằng cách sử dụng phương pháp hoạt hóa DIC/HOBt, và sự hoàn thành phản ứng ghép cặp được kiểm tra bằng thử nghiệm ninhydrin (Kaiser, E., et al. (1970) *Anal Biochem.* 34 595-598). Các peptit tổng hợp được giải phóng ra bằng cách xử lý nhựa bằng dung dịch axit trifloaxetic/EDT/H<sub>2</sub>O/TIS (94%/2,5%/2,5%/1%), kết tủa bằng ete và được đông khô trong 72 giờ, sau đó, chúng được cài bằng cách tạo ra liên kết disulfua thông qua sự oxy hóa bằng dimetyl sulfoxit (DMSO) (Andreu, D., et al. (Eds), *Peptide Synthesis Protocols, Methods in Molecular Biology, Totowa, NJ, 1994, pp. 91-169*). Các peptit thu được được làm sạch bằng RP-HPLC điều chế trong cột RP-C18, các phần gom được phân tích một cách độc lập bằng RP-HPLC phân tích, và sản phẩm peptit cuối thu được bằng cách gộp các phần có độ tinh khiết cao hơn 99%. Khối phổ (ESI-MS) được sử dụng để kiểm tra khối lượng phân tử của sản phẩm cuối.

Khối phổ được ghi lại bằng máy đo khối phổ QTOF-2TM hình tám cạnh lai (Micromass, UK) được lắp nguồn ion hóa bằng phun điện tử phun Z. Gói phần mềm MassLynx, phiên bản 3.5 (Waters, USA) được sử dụng để thu nhận và xử lý phổ.

## Ví dụ 2. Ước chế bệnh nhiễm DENV ở các tế bào Vero

Để chứng tỏ rằng các peptit có cấu trúc kẹp tóc beta theo sáng chế có thể ức chế bệnh nhiễm DENV *in vitro*, các peptit này được đánh giá trong thử nghiệm làm giảm mảng bằng cách sử dụng tế bào Vero.

Các tế bào được phát triển trên đĩa có 24 lỗ cho đến khi lớp đơn đã đạt đến mức độ nhập dòng khoảng 90%, sau đó, chúng được rửa hai lần bằng môi trường MEM mà không chứa huyết thanh thai bò (Fetal Bovine Serum - FBS). Sau đó, các dịch peptit loãng được bổ sung vào và các hỗn hợp tế bào-peptit được ủ thông thường trong 1 giờ ở nhiệt độ 37°C, tiếp theo bổ sung chế phẩm DENV kiểu huyết thanh 2 (NIBSC mã S16803) ở hệ số nhiễm (multiplicity of infection - m.o.i.) là 0,001. Sau đó, các tế bào được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ 37°C, và ngay khi khoảng thời gian ủ bằng virus gây nhiễm kết thúc, được rửa lại để loại bỏ các virion không gắn kết và được ủ trong 5 ngày ở nhiệt độ 37°C trong môi trường có mật độ cao (MEM được bổ sung các axit amin không thiết yếu, 1% FBS, 1% carboxymethylxenluloza) để cho các mảng virus tạo ra. Sau đó, các tế bào được nhuộm bằng Naphtol Blue Black 0,1% trong dung dịch natri axetat 0,15 M. Hai bản sao trên mỗi điểm thử nghiệm được sử dụng trong mỗi thử nghiệm, và ba lần xác định độc lập được thực hiện đối với mỗi mẫu.

Độc tính của các peptit có cấu trúc kẹp tóc beta được đánh giá bằng thử nghiệm MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoli bromua, Invitrogen, USA) (Mosmann, T. (1983). *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.), và bằng cách đếm tế bào thủ công bằng cách sử dụng buồng Neubauer. Đĩa có chín mươi sáu lỗ (Costar, USA) được cấy 200 µl/giếng huyền phù chứa tế bào Vero ở  $1 \times 10^5$  tế bào/ml và ủ cho đến khi các lớp đơn đạt đến mức độ nhập dòng xấp xỉ 90%, thường là trong 18-24 giờ. Sau khi rửa các tế bào hai lần bằng môi trường DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium - môi trường Eagle cải tiến của Dulbecco), bổ sung 50 µl/lỗ dịch pha loãng peptit hoặc chất phụ gia cần đánh giá (Triton X-100™ được hòa tan trong PBS được sử dụng làm đối chứng độc tính dương) và các đĩa được ủ ở nhiệt độ 37°C dưới môi trường 5% CO<sub>2</sub> trong 2 hoặc 24 giờ. Sau đó, hai quy trình khác nhau được dùng để đo độc tính:

a) Dung dịch 2 mg/ml chứa MTT trong PBS được bổ sung vào (50 µL/lỗ) và các đĩa được ủ trong 4 giờ nữa ở nhiệt độ 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Sau đó, môi trường này được loại bỏ, và 100 µL/lỗ DMSO được bổ sung vào để làm hòa tan kết tủa formazan.

Cuối cùng, mật độ quang (optical density - OD) của dịch nổi ở bước sóng 540 nm được đo bằng cách sử dụng máy đọc đĩa (Sensident Scan™, Merck, Đức).

b) Các đĩa được rửa bằng 200  $\mu$ l/lỗ môi trường DMEM và sau đó, dung dịch trypsin (Sigma, USA) được bổ sung vào ở mức 50  $\mu$ l/lỗ. Sau khi làm bất hoạt trypsin bằng cách bổ sung 150  $\mu$ l/lỗ DMEM đã được bổ sung FBS 10%, các tế bào được đếm bằng cách nhuộm màu sống Trypan Blue (Gibco, USA). Dữ liệu được xử lý bằng gói phần mềm thống kê Prism v5.3 (GraphPad, USA), bằng cách sử dụng hồi quy không tuyến tính để khớp chúng với  $\log_{10}$ (nồng độ) so với đường cong đáp ứng.

Bảng 2 thể hiện các trị số IC<sub>50</sub> tính được tương ứng với hoạt tính kháng virus của các peptit có cấu trúc kẹp tóc beta chống DENV2 trong tế bào Vero, cũng như độc tính và chỉ số chọn lọc của chúng. Tất cả các peptit được phân tích thể hiện hoạt tính kháng virus có thể phát hiện được trong hệ này. Các peptit PHB2, PHB3, PHB4, PHB5, PHB8 và PHB9 thể hiện hiệu lực kháng virus cao hơn so với peptit HDIII3CL, mặc dù trong trường hợp các peptit PHB3, PHB5 và PHB8, sự chênh lệch là nhỏ. Trong hệ *in vitro* này, các peptit PHB1, PHB6 và PHB7 thực sự có hiệu lực nhỏ hơn so với peptit HDIII3CL. Peptit PHB4 thể hiện hoạt tính kháng virus trong phạm vi nanomol và chỉ số chọn lọc xuất sắc là 4333. Do đó, peptit này cấu thành phân tử chỉ huy có đặc tính xuất sắc làm hoạt chất kháng virus dự tuyển chống DENV.

Các kết quả này còn chứng tỏ rằng vòng liên sợi có sáu gốc của peptit HDIII3CL là hoàn toàn không cần thiết, do nó đã được loại bỏ khỏi trình tự của các peptit có cấu trúc kẹp tóc beta theo sáng chế và được thay thế bằng vòng ngoặt beta có hai gốc trung tâm, mà không có sự tương đồng, hoàn toàn hoặc một phần, với trình tự ban đầu của vòng DIIIE, mà không ảnh hưởng có hại đến hoạt tính kháng virus *in vitro*. Đây là đặc điểm mong muốn nếu các peptit này được sử dụng để điều trị bệnh nhiễm DENV thứ phát, do vòng này có tính trội miễn dịch trong đáp ứng kháng thể của người chống DENV (Sukupolvi-Petty S, et al. (2007). *J Virol.*; 81(23):12816-26) và do đó, các kháng thể đang tồn tại từ trước có thể trung hòa hoạt tính kháng virus của các peptit trên cơ sở kẹp tóc beta FG nếu vòng này không bị loại bỏ. Vì vậy, việc loại bỏ vòng này trong các peptit theo sáng chế làm mất khả năng này.

Dữ liệu này còn chỉ ra một số đặc điểm chung giữa các peptit có cấu trúc kẹp tóc beta có hiệu lực nhất, mà có thể đóng vai trò quan trọng trong việc làm tăng hoạt tính kháng virus của chúng. Một trong số chúng, ví dụ, là sự có mặt của lysin (hoặc d-lysine) ở vị trí trung tâm trên vòng ngoặt beta liên sợi. Peptit PHB5 có hiệu lực hơn so

với PHB6, và sự khác biệt duy nhất của chúng là sự vắng mặt gốc lysin trên vòng ngoặt beta của PHB6 (Bảng 1). Ngoài ra, PHB2 và PHB4 có hiệu lực hơn so với đối tác của chúng PHB1 và PHB3, và không một PHB1 hay PHB3 có gốc lysin ở các vị trí trung tâm của vòng này (lysin này được cho là bất chức về mặt chức năng gốc Lys386 của DIIE). Một đặc điểm để phân biệt khác của các peptit có hiệu lực nhất là sự có mặt của gốc tyrosin ở vị trí tương đương với vị trí của gốc 377 trong DIIE (tung độ từ protein E của DENV3). Ví dụ, peptit PHB9 có hiệu lực hơn so với PHB8, và sự khác biệt duy nhất của chúng là ở chỗ Tyr5 đã được thay thế bằng Asn5 trong PHB8. Ngoài ra, PHB2 (chứa Tyr3) và PHB4 (chứa Tyr5) có hiệu lực hơn so với peptit đối tác của chúng PHB1 và PHB3, trong đó các gốc tyrosin này đã được thay thế bằng các gốc asparagin.

Cuối cùng, dữ liệu này xác nhận rằng việc kéo dài sợi beta bằng cách bổ sung bốn (hai gốc trên mỗi sợi) axit amin bổ sung có tác dụng có lợi đến hoạt tính kháng virus của các peptit thu được. Hiệu lực của peptit PHB4, chẳng hạn, là cao hơn so với hiệu lực của PHB2, và hiệu lực của các peptit PHB8 và PHB9 là cao hơn so với hiệu lực của PHB7. Peptit PHB4 là có hiệu lực nhất trong toàn bộ chuỗi, và là peptit duy nhất có trình tự chứa tất cả ba đặc điểm phân biệt của các peptit có hiệu lực được nêu trên đây. Vì vậy, dữ liệu thử nghiệm thu được trong ví dụ này cùng nhau chứng minh rằng các tiêu chuẩn được theo trong việc thiết kế peptit có cấu trúc kẹp tóc beta theo sáng chế là được lựa chọn sáng suốt.

Bảng 2. Hiệu lực, độc tính *in vitro* và chỉ số chọn lọc đối với các peptit có cấu trúc kẹp tóc beta

| Peptit | Hoạt tính kháng virus trong tế bào |                     |      |
|--------|------------------------------------|---------------------|------|
|        | Vero                               |                     |      |
|        | IC50*, $\mu$ M                     | Ctox50, $\mu$ M     | SI   |
| PHB1   | 75                                 | >>1000 <sup>†</sup> | >>13 |
| PHB2   | 12                                 | 85                  | 7    |
| PHB3   | 17                                 | >>1000 <sup>†</sup> | >>59 |
| PHB4   | 0,003                              | 13                  | 4333 |
| PHB5   | 17                                 | 259                 | 15   |
| PHB6   | 33                                 | 411                 | 12   |
| PHB7   | 79                                 | 1911                | 24   |

|            |    |      |    |
|------------|----|------|----|
| PHB8       | 15 | 300  | 20 |
| PHB9       | 7  | 216  | 31 |
| HDIII3CL   | 20 | 1000 | 50 |
| HDIII3CL2  | 20 | 1000 | 50 |
| HDIII3CLW- | NA | ND   | ND |
| HDIII3CLK- | NA | ND   | ND |
| HDIII3CLC- | NA | ND   | ND |

\*, Hoạt tính kháng virus (hoạt tính ức chế 50%), *NA*, không có hoạt tính phát hiện được ở các nồng độ thấp hơn hoặc bằng 100  $\mu\text{M}$ . <sup>‡</sup>, không gây độc ở 1000  $\mu\text{M}$ . *ND*, không xác định được

Tiếp theo, đã quyết định so sánh hoạt tính kháng virus của các peptit PHB4 và HDIII3CL chống tất cả bốn kiểu huyết thanh DENV, với mục đích là so sánh các trị số  $\text{IC}_{50}$  tương ứng của chúng. So sánh này được thực hiện bằng thử nghiệm làm giảm mảng trên các tế bào Vero, bổ sung virus gây nhiễm đối với mỗi kiểu huyết thanh (DENV1, NIBSC mã West Pac 74, DENV2, NIBSC, mã S16803; DENV3, NIBSC, mã CH53489; DENV 4, NIBSC mã TVP360) ở m.o.i. là 0,001. Như có thể quan sát thấy trong Bảng 3, peptit PHB4 có hoạt tính chống bốn kiểu huyết thanh, và nhiều hơn nhiều so với peptit HDIII3CL (có hiệu lực hơn 4000 đến 7500 lần, tùy thuộc vào kiểu huyết thanh). Thực tế là PHB4 biểu hiện hoạt tính ức chế chống bốn kiểu huyết thanh là phù hợp với vai trò được đề xuất của phức hợp  $\alpha 2\text{M}^*/\text{LRP1}$  làm thụ thể nội bào đối với tất cả các kiểu huyết thanh DENV và với bằng chứng thử nghiệm chứng minh sự gắn kết của peptit PHB4 với các protein này, như được thể hiện dưới đây trong bản mô tả này.

Bảng 3. Hoạt tính kháng virus của các peptit PHB4 và HDIII3CL chống bốn kiểu huyết thanh của virus Dengue

| Peptit   | Hoạt tính kháng virus $\text{IC}_{50}$ , $\mu\text{M}$ |                |                |                |
|----------|--------------------------------------------------------|----------------|----------------|----------------|
|          | chống<br>DENV1                                         | chống<br>DENV2 | chống<br>DENV3 | chống<br>DENV4 |
| PHB4     | 0,002                                                  | 0,003          | 0,005          | 0,01           |
| HDIII3CL | 15                                                     | 20             | 20             | 50             |

Ví dụ 3. Sự ức chế gắn kết của DIIIIE với  $\alpha 2M^*$  bởi các peptit có cấu trúc kẹp tóc beta  
Làm sạch và hoạt hóa  $\alpha 2M$  của người

$\alpha 2M$  của người được làm sạch từ 380 ml huyết tương của người, thu được bằng cách gom các mẫu huyết tương từ người tình nguyện khỏe mạnh ở độ tuổi từ 30 đến 40. Huyết tương được thẩm tách bằng nước đã khử ion, với các thay đổi thường xuyên, trong 72 ở nhiệt độ 4°C. Chất không tan được loại bỏ ra khỏi phần thẩm tách thu được bằng cách ly tâm ở  $10.000 \times g$  ( $100.000 \text{ m/s}^2$ ) trong 30 phút, và dịch nổi được làm cân bằng với PBS ở độ pH=6,0 bằng cách thẩm tách và sau đó, được nạp lên trên cột XK 50/30 (Amersham, UK) đã được nhồi 65 ml Chelating Sepharose Fast Flow (Amersham, UK) được nạp trước bằng  $\text{Zn}^{2+}$  và được làm cân bằng bằng PBS ở độ pH=6,0. Sau khi nạp mẫu, cột này được rửa bằng PBS có độ pH=6,0 cho đến khi độ hấp thụ của dung môi rửa giải bị giảm đến độ hấp thụ nền, và các protein gắn kết được rửa giải bằng dung dịch đệm natri axetat 10 mM/natri clorua 150 mM có độ pH=5,0. Dịch rửa giải gộp lại được cô bằng cách siêu lọc và sau đó, được nạp lên trên cột lọc gel Superdex 200 (Amersham, UK) được làm cân bằng bằng PBS độ pH=7,8. Sự có mặt của  $\alpha 2M$  trong phần có khối lượng phân tử cao nhất được kiểm tra bằng cách thẩm tách Tây bằng chế phẩm kháng thể đa dòng  $\alpha 2M$  kháng người (Sigma, USA).

$\alpha 2M$  đã làm sạch được hoạt hóa bằng cách ủ nó bằng 200 mM metylamin trong dung dịch natri phosphat 50 mM, natri clorua 150 mM, có độ pH=7,4. Chế phẩm  $\alpha 2M\_MeNH_2$  ( $\alpha 2M^*$ ) thu được được thẩm tách bao quát bằng dung dịch natri phosphat 50 mM/natri clorua 0,5 M có độ pH=7,8.

#### Thử nghiệm cạnh tranh

Khả năng của các peptit PHB1-9 và HDIII3CL ức chế sự tương tác của DIIIIE1J tái tổ hợp với  $\alpha 2M^*$  được phân tích bằng cách sử dụng khuôn mẫu ELISA cạnh tranh. Các đĩa được phủ bằng  $\alpha 2M^*$  đã sạch và được ủ bằng DIIIIE1J đã được làm sạch từ trước và được biotin hóa (DIIIIE1Jbiot) với sự có mặt của các peptit thử nghiệm và/hoặc DIIIIE1J tái tổ hợp ở các nồng độ khác nhau, phát hiện DIIIIE1Jbiot đã gắn với  $\alpha 2M^*$  bằng thể tiếp hợp streptavidin-peroxidaza. Chi tiết về quy trình thử nghiệm được theo để thu được DIIIIE1J tái tổ hợp (SEQ ID No. 19) được thể hiện dưới đây, nhưng về cơ bản, phân tử này được cấu thành từ các gốc 289-400 (đánh số theo trình tự PIR:A32401) của protein E của DENV1, chủng 1636 (Chu, M. C., et al. (1989). *Journal of General Virology* 70 (Pt 7), 1701-1712.), tương ứng với miền III tiếp theo là nhãn có sáu histidin đầu tận cùng C.

Ở các nồng độ peptit trong phạm vi thấp từ micromol đến dưới micromol/nanomol, các peptit có cấu trúc kẹp tóc beta PHB5, PHB7, PHB8 và PHB9 ức chế một phần sự gắn kết của DIII1Jbiot với  $\alpha 2M^*$  (Fig. 3), và tỷ lệ phần trăm ức chế tăng một cách đơn điệu với nồng độ peptit. Các peptit PHB5, PHB8 và PHB9 là các chất ức chế có hiệu lực nhất của nhóm này, thể hiện tỷ lệ phần trăm ức chế nằm trong khoảng từ 23 đến 50%, tương tự như tỷ lệ phần trăm ức chế của DIII1J tái tổ hợp. Ở các khoảng nồng độ được phân tích, ba peptit này là các chất ức chế tốt hơn (gấp 2 đến 12 lần, tùy thuộc vào nồng độ chính xác của chúng) của việc gắn kết DIII1Jbiot với  $\alpha 2M^*$  so với peptit HDIII3CL.

Tỷ lệ phần trăm ức chế lớn nhất tính được đối với peptit HDIII3CL trong các thử nghiệm này chỉ là 18%; thấp hơn tỷ lệ phần trăm ức chế ngay cả của PHB7, là peptit có cấu trúc kẹp tóc beta nhỏ nhất. Điều này chứng tỏ rằng trên thực tế, các gốc của vòng liên sợi của kẹp tóc FG của DIII1J là không cần thiết nhằm mục đích tương tác với protein  $\alpha 2M^*$ , do vòng dài có 6 gốc ban đầu đã được thay thế trong peptit PHB7 bởi vòng ngoặt beta typ IP chỉ có hai gốc trung tâm. Trình tự của vòng ngoặt beta này không có sự tương đồng –toàn bộ hoặc một phần- với trình tự của vòng ban đầu, các gốc của nó đã được chọn trên cơ sở các tiêu chuẩn cấu trúc (khuyếch hướng tạo ra vòng ngoặt beta typ IP cao, các đầu nối kẹp tóc beta). Gốc duy nhất từ vòng HDIII3CL ban đầu mà vẫn còn trong peptit PHB7 (và cả PHB8 và PHB9) là Lys11 (đánh số HDIII3CL), mà vai trò chức năng của nó được Lys9 của PHB7 bắt chước, chiếm vị trí không gian tương tự (tương đương về mặt cấu trúc).

Ngoài Lys9 (mà bắt chước Lys11 từ HDIII3CL), có gốc PHB7 khác bắt chước vai trò của các gốc HDIII3CL: a) Asn3, Lys10 và Asn12 từ PHB7 bắt chước các gốc Asn3, Lys14 và Asn16 từ HDIII3CL (đây là các gốc kẹp tóc beta không tạo ra liên kết hydro), mà chuỗi bên của chúng nhô vào bề mặt tiếp xúc của kẹp tóc FG của DIII1J và, do đó, có chức năng tiềm năng; b) Trp13 từ PHB7 tương đương với Trp17 từ HDIII3CL, và tương ứng với gốc Trp mà được bảo toàn nghiêm ngặt qua tất cả các flavivirus; c) Cys1 và Cys14 từ PHB7 tạo ra cầu nối disulfua tương đương với cầu nối được tạo ra bởi Cys1-Cys18 từ HDIII3CL. Thực tế là PHB7 quả thực giữ được, và trên thực tế, cải thiện, hoạt tính ức chế DENV của HDIII3CL, gợi ý rằng các đặc điểm mà được giữ lại trong quá trình thiết kế PHB7 đóng vai trò quan trọng đối với hoạt tính chức năng của các peptit theo sáng chế.

Các peptit PHB8 và PHB9 là các chất ức chế tốt hơn so với peptit PHB7. Điều này chứng tỏ rằng việc bổ sung bốn gốc (hai gốc trên mỗi sợi) vào PHB8 và PHB9 góp phần có lợi cho hoạt tính ức chế DENV của các peptit theo sáng chế.

Như có thể quan sát thấy trên Fig. 4, ái lực biểu kiến của tương tác giữa peptit có cấu trúc kẹp tóc beta PHB5 và  $\alpha 2M^*$  là tương tự như ái lực biểu kiến của tương tác giữa DIIIIE và  $\alpha 2M^*$ , do tỷ lệ phần trăm ức chế đối với mỗi nồng độ PHB5 được thử nghiệm chỉ thấp hơn một chút so với tỷ lệ phần trăm ức chế thu được bởi DIIIIE1J. Các kết quả này chứng tỏ rằng có thể sử dụng peptit có cấu trúc kẹp tóc beta mà cấu trúc liên kết của nó được đảo ngược so với cấu trúc liên kết của kẹp tóc beta FG nguyên thể của DIIIIE và vẫn có thể ức chế tương tác DIIIIE- $\alpha 2M^*$ . Kết luận tương tự có thể được rút ra đối với loại vòng ngoặt beta được thiết kế trong peptit, có tính đến vòng ngoặt typ IIP được sử dụng trong PHB5, còn các peptit PHB7-9 sử dụng vòng ngoặt typ IP. Điều quan trọng là bảo tồn được sự tương đương về cấu trúc của các gốc mà cần thiết đối với tương tác này, tức là chúng được bố trí theo kiểu không gian tương tự ngay cả khi có mặt trong trường hợp khung khác nhau về mặt cấu trúc. Ngoài ra, PHB5 chứng tỏ rằng vai trò mà liên kết disulfua đóng trong việc làm ổn định cấu hình của các peptit PHB8 và PHB9 có thể được giành quyền kiểm soát bởi các môtip cấu trúc khác, như khóa kéo Trp được dùng trong PHB5.

Một yếu tố thiết yếu của sáng chế là phân tích hoạt tính sinh học của các peptit theo sáng chế ở phạm vi nanomol. Các peptit có hiệu lực cao cho phép việc sử dụng với liều điều trị thấp hơn và các ưu điểm chúng mang lại xét về mặt chi phí thấp hơn và khả năng xuất hiện một số vấn đề liên quan đến liều cao thấp hơn, như sự kết tụ, tương tác không đặc hiệu, tính kháng nguyên và khả năng sinh miễn dịch. Như được thể hiện trên Fig. 5, ở phạm vi nanomol/dưới micromol, các peptit PHB2, PHB4, PHB5, PHB8 và PHB9 vẫn là các chất ức chế tốt hơn đối với gắn kết của DIIIIE1J được biotin hóa (DIIIIE1Jbiot) với  $\alpha 2M^*$  so với bản thân DIIIIE1J (tỷ lệ phần trăm ức chế tốt hơn gấp 1,5 đến 3 lần). Mặt khác, ở khoảng nồng độ đó, mức độ ức chế được biểu hiện bởi peptit HDIII3CL là rất thấp so với DIIIIE1J.

Ví dụ 4. Lập bản đồ các gốc thiết yếu đối với gắn kết của DIIIIE với  $\alpha 2M^*$

Chuẩn bị thư viện của thể đột biến alanin đối với DIIIIE (DIIIIE1PRS)

Để xác định xem gốc nào trong DIIIIE từ DENV1 đóng vai trò quan trọng trong sự tương tác của phân tử này với một số phối tử khác nhau, thư viện các thể đột biến

một gốc được chuẩn bị trong đó mỗi gốc tiếp xúc dung môi được thay thế một cách có hệ thống bằng gốc alanin (kỹ thuật được biết phổ biến hơn là ‘quét alanin’) để nghiên cứu tiếp theo gắn kết của biến thể đột biến này với phối tử cần phân tích. Trong loại thử nghiệm này, sự biến đổi bất kỳ liên quan đến sự gắn kết của biến thể cụ thể với phối tử được hiểu là bằng chứng của sự tham gia của gốc được gây đột biến trong tương tác của protein kiểu đại với phối tử này.

Để chuẩn bị thư viện này, phân tích ban đầu được giới hạn ở các gốc 289 đến 395 (đánh số theo ngân hàng gen: AAN32775.1) của protein vỏ của DENV1, chủng PRS 288690 (*Goncalvez, A.P., et al. (2002), Virology 303 (1), 110-119.*). Trong bản mô tả này, trình tự tương ứng với mảnh này của polyprotein của virus được xác định là DIIIIE từ DENV1 chủng PRS 288690 (DIIIIE1PRS), được nêu trong SEQ ID No. 15.

Lựa chọn các gốc cần được gây đột biến trong DIIIIE1PRS

Thay cho chiến lược thiết kế giải thuật brute-force trong đó mỗi gốc được thay thế bằng gốc alanin ở một thời điểm, đã quyết định thực hiện lựa chọn trước dựa trên khả năng tiếp cận dung môi tương đối, như được ước lượng bằng cách sử dụng gói phần mềm WHAT IF phiên bản 20050919-1718 (*Vriend, G., (1990), J.Mol.Graph. 8, 52-6*), và dựa trên việc ước lượng sự chênh lệch độ ổn định của mỗi biến thể có thể đối với protein kiểu đại, được biểu diễn dưới dạng  $\Delta\Delta G$  tính được bằng FoldX phiên bản 6.0 (*Schymkowitz, J., et al. (2005). Nucleic Acids Res. 33, W382-W388*). Cả hai phép tính toán đều dựa trên mô hình độ tương đồng của DIIIIE1PRS (các gốc 1-105 trong SEQ ID No. 15), thu được từ các tọa độ tinh thể học của protein E từ DENV3 (*Modis, Y., et al. (2003). Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 100, 6986-6991*) và được đưa vào quy trình làm giảm năng lượng đến mức tối thiểu.

Tiêu chuẩn được sử dụng để lựa chọn các gốc cần được gây đột biến thành Ala là khả năng tiếp cận tương đối cao hơn 15% và  $\Delta\Delta G$  nhỏ hơn 4 kcal/mol. 79 vị trí thỏa mãn tiêu chuẩn này và các kết quả của việc tính toán các thông số nêu trên được thể hiện trong Bảng 4.

Bảng 4. Các gốc được chọn để quét alanin của DIII1PRS.

| Gốc | aa  | %ACC | $\Delta\Delta G^1$<br>kcal/mol | $\Delta\Delta G^2$<br>kcal/mol | Gốc | aa  | %ACC | $\Delta\Delta G^1$<br>kcal/mol | $\Delta\Delta G^2$<br>kcal/mol |
|-----|-----|------|--------------------------------|--------------------------------|-----|-----|------|--------------------------------|--------------------------------|
| 289 | MET | 78,4 | -                              | -                              | 343 | LYS | 72,2 | 3,4                            | 3                              |
| 290 | ASP | 85,6 | 2,4                            | 2,4                            | 344 | GL  | 31,4 | 4,7                            | 4,3                            |
| 291 | LYS | 88,2 | 2,5                            | 2,4                            | 345 | VA  | 60,8 | 3,2                            | 2,2                            |
| 292 | LEU | 70,4 | 2,3                            | 2,2                            | 346 | THR | 58,2 | 2,7                            | 2,7                            |
| 293 | THR | 82,8 | 2,8                            | 2,8                            | 347 | GL  | 55,3 | 2,6                            | 2,9                            |
| 294 | LEU | 70,6 | 2,3                            | 2,1                            | 348 | ASN | 51,4 | 3,1                            | 3                              |
| 295 | LYS | 76,6 | 3,4                            | 3,3                            | 350 | AR  | 69   | 4                              | 3,7                            |
| 296 | GLY | 26,7 | 3,6                            | 2,2                            | 351 | LEU | 21,1 | 5,4                            | 5,5                            |
| 297 | MET | 58,7 | 2,1                            | 2,1                            | 352 | ILE | 36,3 | 3,4                            | 3,6                            |
| 298 | SER | 91,1 | 2,5                            | 2,3                            | 353 | THR | 42,7 | 3,6                            | 2,8                            |
| 299 | TYR | 32,5 | 3,7                            | 3,2                            | 355 | ASN | 26   | 2,6                            | 2,7                            |
| 300 | VAL | 65,7 | 2,4                            | 2                              | 357 | ILE | 24,1 | 3,8                            | 3,8                            |
| 301 | MET | 57,8 | 2,2                            | 2,4                            | 359 | TRH | 66,6 | 2,5                            | 2,6                            |
| 303 | THR | 76,8 | 2,8                            | 2,9                            | 360 | ASP | 31,5 | 3,1                            | 2,2                            |
| 304 | GLY | 23,2 | 4,6                            | 3,7                            | 361 | LYS | 38,5 | 1,8                            | 2,9                            |
| 305 | SER | 18,5 | 3,2                            | 3,1                            | 362 | GL  | 65,3 | 2,2                            | 2,2                            |
| 307 | LYS | 51,3 | 3,9                            | 3,7                            | 363 | LYS | 61,1 | 3,3                            | 3,1                            |
| 308 | LEU | 31   | 5,3                            | 5                              | 364 | PRO | 34,9 | 4,2                            | 4,3                            |
| 309 | GLU | 32,1 | 2,2                            | 2,6                            | 365 | VA  | 15,4 | 4                              | 4                              |
| 310 | LYS | 67,9 | 3,2                            | 3,1                            | 366 | ASN | 55,8 | 2,7                            | 2,8                            |
| 311 | GLU | 79,1 | 2,8                            | 2,6                            | 368 | GL  | 26,9 | 3,1                            | 3,2                            |
| 312 | VAL | 19   | 3,8                            | 4                              | 370 | GL  | 29   | 3,2                            | 3,1                            |
| 314 | GLU | 42,2 | 1,7                            | 1,5                            | 372 | PRO | 25,1 | 5,5                            | 5,2                            |
| 315 | THR | 37,8 | 5,1                            | 4,7                            | 373 | PHE | 62,9 | 2,7                            | 2,5                            |
| 316 | GLN | 90,6 | 2,8                            | 2,7                            | 374 | GL  | 25   | 4,3                            | 4                              |
| 317 | HIS | 79,1 | 1,8                            | 2,2                            | 375 | GL  | 55,4 | 3,6                            | 3,6                            |
| 321 | LEU | 43,9 | 4,1                            | 4                              | 379 | VA  | 17,7 | 4                              | 4                              |
| 323 | GLN | 23,7 | 2,3                            | 2,8                            | 383 | GL  | 75,8 | 3,4                            | 3,9                            |
| 325 | LYS | 30   | 3,3                            | 3,1                            | 384 | GL  | 68,3 | 3                              | 3                              |
| 327 | GLU | 59,1 | 3,3                            | 3,1                            | 385 | LYS | 67,2 | 3,3                            | 3                              |
| 329 | THR | 84,2 | 2,2                            | 2,6                            | 387 | LEU | 22,8 | 3,6                            | 3,7                            |
| 330 | ASP | 29,5 | 0,5                            | 2                              | 388 | LYS | 60,6 | 3,4                            | 3,5                            |
| 332 | PRO | 40,5 | 3,9                            | 3,8                            | 389 | LEU | 23,1 | 4,7                            | 5,6                            |
| 334 | LYS | 15,1 | 1,8                            | 1,7                            | 390 | SER | 54,4 | 2,5                            | 2,4                            |
| 336 | PRO | 21,5 | 4,9                            | 4,9                            | 391 | TRP | 17,6 | 4,2                            | 5                              |
| 338 | SER | 28   | 2,3                            | 2,3                            | 392 | PHE | 63,8 | 3                              | 3                              |
| 340 | GLN | 17,6 | 2                              | 2,2                            | 394 | LYS | 61,8 | 2,7                            | 2,7                            |
| 342 | GLU | 61,8 | 1,8                            | 1,1                            |     |     |      |                                |                                |

$\Delta\Delta G$ : độ chênh lệch trong  $\Delta G$  gấp cuộn giữa thể đột biến Ala và protein kiểu dại (1: mô hình không được làm giảm đến mức tối thiểu, 2: mô hình được làm giảm đến mức tối thiểu); %AAC: tỷ lệ phần trăm khả năng tiếp cận dung môi. Các gốc được tô đậm tương ứng với các vị trí trong đó  $\Delta\Delta G$  cao hơn 4 kcal/mol.

Chuẩn bị thư viện của các plasmit tái tổ hợp để biểu hiện DIII1PRS và biến thể đột biến của nó ở *Escherichia coli*

Sau khi lựa chọn các gốc DIII1PRS để được dùng để quét alanin, các plasmit tái tổ hợp được chuẩn bị để biểu hiện khác loại mỗi biến thể đột biến Ala của thư viện này ở *E. coli*. Điều này được thực hiện bằng cách tổng hợp, bằng phương pháp của Agarwal và các đồng tác giả (Agarwal KL, et al. (1970), *Nature* 227, 27-34), và bắt đầu từ các oligonucleotit tổng hợp được trên pha rắn thông qua hóa học phosphoramidit (Beaucage SL & Caruthers MH (1981). *Tetrahedron Letters*, 22, 1859), phân tử ADN sợi kép mã hóa các gốc 289-400 (đánh số theo ngân hàng gen: AAN32775.1) của protein E của DENV1, chủng PRS 288690 (Goncalvez, A.P., et al. (2002). *Virology* 303 (1), 110-119), tiếp theo là nhãn 6 histidin đầu tận cùng C; protein tái tổ hợp được xác định ở đây là DIII1PRS tái tổ hợp (rDIII1PRS, SEQ ID No. 17). Phân tử ADN sợi kép này (SEQ ID No. 16) chứa các vị trí nhận biết đối với các enzym giới hạn *Nde* I và *Xho* I, được thiết kế sao cho mảnh này có thể được cài xen vào trong plasmit pET22b (Novagen Inc., USA) trong cùng một khung đọc làm codon mở đầu được tạo ra bởi plasmit này. Sau khi phân cắt, phân tử ADN sợi kép này với các enzym giới hạn *Nde* I và *Xho* I trong điều kiện được quy định bởi nhà sản xuất chúng, mảnh phân cắt được nối, bằng cách sử dụng T4 ADN ligaza dưới điều kiện được quy định bởi nhà sản xuất chúng, vào plasmit pET22b (Novagen Inc., USA) đã được phân cắt từ trước theo cách tương tự. Hỗn hợp nối thu được từ đó được biến nạp vào trong chủng XL-1Blue của *E. coli* (Bullock WO, et al. (1987). *Biotechniques*; 5: 376-8) như được mô tả bởi Sambrook và các đồng tác giả (Sambrook J, et al. *Molecular cloning: A laboratory manual*. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989), và các plasmit từ các khuẩn lạc đã phát triển trong môi trường chọn lọc được sàng lọc, làm sạch và được giải trình tự để thu được plasmit mà trình tự của nó tương ứng với trình tự kỳ vọng. Plasmit này được gọi tên là pET-DIII DENV1 (SEQ ID No. 18), và được biểu diễn dưới dạng sơ đồ trên Fig. 6. Việc tạo cấu trúc của các plasmit tái tổ hợp để biểu hiện 79 thể đột biến Ala đã được lựa chọn trước của DIII1PRS được thực hiện như đã được mô tả trên đây đối với pET-DIII DENV1, nhưng trong mỗi trường hợp, tổng hợp được phân tử ADN sợi kép khác nhau, trong đó codon tương ứng với gốc cần được gây đột biến được thay thế bằng bộ ba GCG, tương ứng với codon alanin. Codon mà đã được thay thế trong mỗi biến thể, cùng với axit amin mà nó mã hóa, được thể hiện trong Bảng 5.

Bảng 5. Gốc được thay thế bằng alanin và codon tương ứng, được thay thế bằng GCG trong mỗi biến thể của thư viện các thể đột biến DIIE1PRS.

| Biến thể | Gốc được thay thế bằng Ala (SEQ ID No. 15) | Codon | Vị trí trong SEQ ID No. 16 | Biến thể | Gốc được thay thế bằng Ala (SEQ ID No. 15) | Codon | Vị trí trong SEQ ID No. 16 |
|----------|--------------------------------------------|-------|----------------------------|----------|--------------------------------------------|-------|----------------------------|
| D290     | D2                                         | GAT   | 7-9                        | K343     | K55                                        | AAA   | 166-168                    |
| K291     | K3                                         | AAA   | 10-12                      | G344     | G56                                        | GGA   | 169-171                    |
| L292     | L4                                         | CTG   | 13-15                      | V345     | V57                                        | GTG   | 172-174                    |
| T293     | T5                                         | ACT   | 16-18                      | T346     | T58                                        | ACC   | 175-177                    |
| L294     | L6                                         | TTA   | 19-21                      | Q347     | Q59                                        | CAG   | 178-180                    |
| K295     | K7                                         | AAA   | 22-24                      | N348     | N60                                        | AAT   | 181-183                    |
| G296     | G8                                         | GGG   | 25-27                      | R350     | R62                                        | AGA   | 187-189                    |
| M297     | M9                                         | ATG   | 28-30                      | L351     | L63                                        | TTG   | 190-192                    |
| S298     | S10                                        | AGC   | 31-33                      | I352     | I64                                        | ATA   | 193-195                    |
| Y299     | Y11                                        | TAT   | 34-36                      | T353     | T65                                        | ACA   | 196-198                    |
| V300     | V12                                        | GTG   | 37-39                      | N355     | N67                                        | AAT   | 202-204                    |
| M301     | M13                                        | ATG   | 40-42                      | I357     | I69                                        | ATA   | 208-210                    |
| T303     | T15                                        | ACA   | 46-48                      | T359     | T71                                        | ACT   | 214-216                    |
| G304     | G16                                        | GGC   | 49-51                      | D360     | D72                                        | GAC   | 217-219                    |
| S305     | S17                                        | TCA   | 52-54                      | K361     | K73                                        | AAA   | 220-222                    |
| K307     | K19                                        | AAG   | 58-60                      | E362     | E74                                        | GAA   | 223-225                    |
| L308     | L20                                        | CTA   | 61-63                      | K363     | K75                                        | AAA   | 226-228                    |
| E309     | E21                                        | GAG   | 64-66                      | P364     | P76                                        | CCA   | 229-231                    |
| K310     | K22                                        | AAG   | 67-69                      | V365     | V77                                        | GTC   | 232-234                    |
| E311     | E23                                        | GAA   | 70-72                      | N366     | N78                                        | AAC   | 235-237                    |
| V312     | V24                                        | GTG   | 73-75                      | E368     | E80                                        | GAG   | 241-243                    |
| E314     | E26                                        | GAG   | 79-81                      | E370     | E82                                        | GAA   | 247-249                    |
| T315     | T27                                        | ACC   | 82-84                      | P372     | P84                                        | CCT   | 253-255                    |
| Q316     | Q28                                        | CAG   | 85-87                      | F373     | F85                                        | TTT   | 256-258                    |
| H317     | H29                                        | CAT   | 88-90                      | G374     | G86                                        | GGT   | 259-261                    |
| L321     | L33                                        | CTA   | 100-102                    | E375     | E87                                        | GAG   | 262-264                    |
| Q323     | Q35                                        | CAG   | 106-108                    | V379     | V91                                        | GTG   | 274-276                    |
| K325     | K37                                        | AAA   | 112-114                    | G383     | G95                                        | GGT   | 286-288                    |
| E327     | E39                                        | GAA   | 118-120                    | E384     | E96                                        | GAA   | 289-291                    |
| T329     | T41                                        | ACA   | 124-126                    | K385     | K97                                        | AAA   | 292-294                    |
| D330     | D42                                        | GAT   | 127-129                    | L387     | L99                                        | TTG   | 298-300                    |
| P332     | P44                                        | CCA   | 133-135                    | K388     | K100                                       | AAA   | 301-303                    |
| K334     | K46                                        | AAG   | 139-141                    | L389     | L101                                       | CTA   | 304-306                    |
| P336     | P48                                        | CCC   | 145-147                    | S390     | S102                                       | AGC   | 307-309                    |
| S338     | S50                                        | TCG   | 151-153                    | W391     | W103                                       | TGG   | 310-312                    |
| Q340     | Q52                                        | CAA   | 157-159                    | F392     | F104                                       | TTC   | 313-315                    |
| E342     | E54                                        | GAG   | 163-165                    | K394     | K106                                       | AAA   | 319-321                    |

Biến nạp các plasmit của thư viện các thể đột biến DIIIIE1PRS vào trong *E. coli* và bảo quản lạnh sâu các dòng vô tính thu được

Để thu được các dòng vô tính của tế bào *E. coli* chứa plasmit để biểu hiện trong vật chủ này, các biến thể DIIIIE1PRS được chọn, các tế bào có khả năng biến nạp của *E. coli* chủng BL21(DE3) (Studier, F. W. & Moffatt, B. A. (1986) *J.Mol.Biol.* 189(1), 113-130) được chuẩn bị và được chia thành các phần phân ước, mỗi phần được biến nạp riêng rẽ bằng 20 ng của một trong số các plasmit của thư viện thể đột biến, bằng các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này (Sambrook, J., et al. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 1989. New York, USA, Cold Spring Harbor Laboratory Press). Phần phân ước đã được biến nạp được đặt riêng rẽ lên trên đĩa thạch LB chứa ampicillin ở 100 µg/ml. Sau khi ủ trong 12 giờ ở nhiệt độ 37°C để cho phép vi khuẩn sinh trưởng, một khuẩn lạc được tách thích hợp từ mỗi đĩa được gây nhiễm vào trong các ống nghiệm riêng, mỗi ống chứa 5 ml canh LB, được bổ sung ampicillin ở 100 µg/ml, và được ủ ở nhiệt độ 37°C kết hợp khuấy (200 vòng/phút) cho đến khi xuất hiện sự vẩn đục nhìn thấy được. Sau đó, môi trường nuôi cấy được ly tâm vô trùng ở 3000 x g ( $30000 \text{ m/s}^2$ ) trong 20 phút ở nhiệt độ 25°C, mỗi môi trường được tạo huyền phù lại trong 250 µl canh LB mới + 250 µl glyxerol 40% (thể tích/thể tích), và sau đó chia thành các phần phân ước 100 µl mà được bảo quản ở nhiệt độ -70°C.

Làm sạch các biến thể đột biến DIIIIE1PRS

Sau khi chuẩn bị thư viện các dòng vô tính *E. coli* được bảo quản lạnh sâu biểu hiện mỗi trong số các biến thể của thư viện thể đột biến DIIIIE1PRS, quy trình quy mô nhỏ được sử dụng để làm sạch các biến thể DIIIIE1PRS này. Nói ngắn gọn, đối với mỗi biến thể, một phần phân ước được bảo quản lạnh sâu của dòng vô tính *E. coli* chứa plasmit tương ứng được sử dụng để gây nhiễm 50 ml môi trường ZYM50502 (Studier, F. W. (2005). *Protein Expr.Purif.* 41(1), 207-234) được bổ sung ampicillin ở 100 µg/ml trong bình Erlenmeyer dung tích 1 L, sau đó, được ủ trong 12 giờ ở nhiệt độ 37°C, 300 vòng/phút. Sau đó, môi trường nuôi cấy được ly tâm ở 3000 x g ( $30000 \text{ m/s}^2$ ), 25°C trong 20 phút, dịch nổi được loại bỏ, và sinh khối thu được được dung giải bằng cách tạo huyền phù lại vào trong 19 ml dung dịch đệm AG (PBX 1X, NaCl 0,3 mol/l, imidazol 20 mM) chứa guanidini hydroclorua (GuHCl) 6 M, làm mất độ nhớt của dịch treo mô đồng thể bằng cách siêu âm nhanh trong 30 với đầu dò thích

hợp. Sau khi làm trong dịch treo mô đồng thể bằng cách ly tâm ở  $3000 \times g$  ( $30000 \text{ m/s}^2$ ),  $25^\circ\text{C}$  trong 45 phút, dịch nổi được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ  $25^\circ\text{C}$  trong máy lắc quay chậm bằng 0,3 ml nhựa  $\text{Ni}^{2+}$ -axit nitrilotriaxetic-agarosa (Ni-NTA agarosa, Qiagen, Đức) và huyền phù đặc thu được nhồi theo trọng lực vào cột NAP-10 rỗng (GE Healthcare, USA) và rửa liên tiếp bằng dung dịch đệm AG chứa  $\text{GuHCl}$  với nồng độ giảm dần (6 M đến 1,2) và, cuối cùng, bằng dung dịch đệm A (PBS 1X,  $\text{NaCl}$  0,3 M, imidazol 20 mM). Sau đó, protein được rửa giải bằng 0,9 ml dung dịch đệm E (PBS 1X,  $\text{NaCl}$  0,3 M, imidazol 300 mM), và dịch rửa giải được đưa ngay sang trao đổi chất đệm với PBS 1X bằng cách lọc gel trên Sephadex G25 bằng cách sử dụng cột PD-10 đã được nhồi trước (Amersham, UK). Nồng độ protein toàn phần của chế phẩm thu được được xác định bằng phương pháp axit bicinchoninic (BCA) (Smith, P. K. (1985). *Anal. Biochem.* 150(1), 76-85), và độ tinh khiết được đánh giá bằng SDS-PAGE dưới điều kiện giảm (Laemmli, U. K. (1970). *Nature* 227(259), 680-685), để bảo đảm rằng không có mặt các sản phẩm phân hủy. Thư viện các biến thể DIIIIE1PRS đã làm sạch được bảo quản ở nhiệt độ  $-20^\circ\text{C}$  cho đến khi được sử dụng.

#### Thử nghiệm cạnh tranh

Khả năng của mỗi thể đột biến alanin DIIIIE1PRS ức chế sự tương tác của DIIIIE tái tổ hợp với  $\alpha 2\text{M}^*$  được phân tích bằng cách sử dụng khuôn mẫu ELISA cạnh tranh. Các đĩa được phủ bằng  $\alpha 2\text{M}^*$  đã sạch và được ủ bằng DIIIIE1PRS được biotin hóa (DIIIIE1PRStbiot) với sự có mặt của mỗi thể đột biến alanin DIIIIE1PRS ở các nồng độ thay đổi, sau đó, phát hiện DIIIIE1PRStbiot đã gắn với  $\alpha 2\text{M}^*$  bằng thể tiếp hợp streptavidin-peroxidaza. Các chỉ số mật độ quang so với nồng độ được làm khớp với đường cong đáp ứng liều, được sử dụng để tính toán  $\text{IC}_{50}$  của mỗi thể đột biến cũng như của DIIIIE1PRS tái tổ hợp kiểu dại.

Như quan sát được trên Fig. 7, sự thay thế bằng alanin của mỗi một trong số năm gốc (Lys361, Glu262, Pro264, Val365 và Lys385) của miền III, trong mỗi trường hợp, làm tăng  $\text{IC}_{50}$  (giảm ái lực của tương tác) hơn một bậc về độ lớn. Lấy mức tăng gấp 2 lần về  $\text{IC}_{50}$  làm ngưỡng, các đột biến thành alanin của tổng số 13 gốc ảnh hưởng đến sự tương tác. Các gốc trong nhóm gồm 13 gốc này, ngoài năm gốc nêu trên, là Glu342, Thr34, Arg350, Lys363, Asn366, Pro372, Gly374 và Glu375.

Các kết quả này ngụ ý rằng gắn kết của DIIIIE với  $\alpha 2\text{M}^*$  bao gồm hai mảnh bề mặt độc lập trong DIIIIE (các fig. 7 và 8): một mảnh nằm trên mặt trên của nó (trong đó đầu tận cùng N được tìm thấy) và mảnh kia nằm trên mặt dưới của nó (mảnh đối diện gần với đầu tận cùng C). Mảnh bên trên chứa các gốc góp phần chủ yếu vào sự tương

tác, bao gồm nhóm gồm năm gốc mà sự thay thế chúng bằng alanin làm giảm ái lực xuống hơn 10 lần. Vì vậy, mảnh này có thể được coi là vị trí chính đối với sự tương tác giữa DIIIE và  $\alpha 2M^*$ . Các gốc thiết yếu của nó là đoạn tuyến tính liền kề của Lys361-Asn366 và gốc Lys385.

Mảnh thứ hai nêu trên, nằm ở mặt dưới của DIIIE (các fig. 7 và 8) được tạo ra bởi các gốc Glu342, Thr346, Arg350, Pro372, Gly374 và Glu375. Việc thay thế mỗi trong số các gốc này bằng alanin tạo ra mức giảm ái lực nhỏ hơn so với sự thay thế tương tự trên các gốc của mảnh bên trên; do đó, mảnh bên dưới này có thể được coi là vị trí tương tác phụ.

Các kết quả thu được trong thử nghiệm này nhằm vào việc lập bản đồ các vị trí trên bề mặt của DIIIE liên quan đến tương tác của nó với  $\alpha 2M^*$  thể hiện sự đúng đắn của các nguyên lý được theo để thiết kế các peptit có cấu trúc kẹp tóc beta theo sáng chế. Ví dụ, sự thận trọng được lưu ý khi bao gồm các gốc lysin mà cấu thành gốc bắt chước cấu trúc/chức năng của Lys385 của DIIIE, và nêu bật rằng đây là gốc góp phần riêng biệt chủ yếu vào sự tương tác (đột biến của nó thành alanin làm giảm ái lực của sự tương tác xuống hơn 22 lần). Các gốc peptit bắt chước gốc này là: Lys8 trong PHB2 và d-Lys8 trong PHB5, Lys9 trong PHB1, PHB6 và PHB7, Lys10 trong PHB4 và Lys11 trong PHB3, PHB8 và PHB9. Theo một ví dụ khác, bốn peptit có cấu trúc kẹp tóc beta mà ức chế có hiệu lực nhất sự tương tác của DIIIE với  $\alpha 2M^*$  (PHB4, PHB5, PHB8 và PHB9, Fig. 5, ví dụ 3) có gốc mà bắt chước cấu trúc/chức năng Glu375 của DIIIE, là gốc quan trọng nhất của vị trí gắn kết phụ được xác định trong ví dụ này. Các gốc trong các peptit có cấu trúc kẹp tóc beta mà bắt chước Glu375 là Glu3 trong PHB3, PHB4, PHB8 và PHB9, và Glu16 trong PHB5 và PHB6. Nói cách khác, các peptit có cấu trúc kẹp tóc beta theo sáng chế mà ức chế có hiệu lực nhất sự gắn kết của DIIIE với  $\alpha 2M^*$  là các peptit chứa, đồng thời, hai gốc quan trọng nhất của các vị trí tương tác chính và phụ được mô tả trong ví dụ này.

Ví dụ 5. Tạo ra các cấu trúc siêu phân tử

#### Động học sự kết tụ của peptit PHB4

Sự tán xạ ánh sáng được sử dụng để giám sát sự kết tụ của peptit PHB4. Các phép đo được thực hiện trên thiết bị phân tích quang phổ huỳnh quang Shimadzu<sup>TM</sup> RF-5301PC (Shimadzu, Nhật Bản), thu nhận dữ liệu bằng phần mềm được cung cấp bởi nhà sản xuất thiết bị. Các bước sóng của chùm ánh sáng tới (kích thích) và detector (phát xạ) được thiết lập ở 320 nm, bằng cách sử dụng các lỗ kích thích và phát xạ có

cỡ 5 nm. Mức độ tán xạ ánh sáng do peptit được tính bằng cách lấy cường độ ánh sáng được phân tán bởi peptit trừ đi cường độ ánh sáng được phân tán bởi dung dịch không chứa peptit (mẫu trắng). Các thay đổi về mức độ tán xạ ánh sáng do sự hòa tan của peptit trong PBS được nghiên cứu bằng cách thu nhận dữ liệu in time course mode, với tần suất đo là 1 hoặc 2 lần trên mỗi giây. Các dung dịch PHB4 trong PBS được chuẩn bị bằng cách trộn một phần dung dịch chứa peptit trong nước với một phần dung dịch PBS 2X.

Dữ liệu thu được trong thử nghiệm này cho thấy rằng ngay khi được hòa tan trong PBS, và sau một khoảng thời gian trễ ngắn hơn 2 phút, cường độ ánh sáng được phân tán bởi peptit tăng nhanh chóng trong 30-40 phút đầu và sau đó, tiếp tục tăng chậm ở tốc độ tuyến tính đến 300 phút, khi phép đo kết thúc. Fig. 9 thể hiện tập tính của tỷ lệ của ánh sáng được phân tán so với ánh sáng được phân tán tại thời điểm

không  $\left(\frac{I}{I_0}\right)$  đối với các nồng độ peptit là 5 và 10  $\mu\text{M}$ . Kiểu của cả hai nồng độ là

tương tự, mặc dù giá trị lớn nhất của  $\left(\frac{I}{I_0}\right)$  ở 5  $\mu\text{M}$  là lớn hơn (11 so với 7) so với giá trị này ở 10  $\mu\text{M}$ , gợi ý rằng sự kết tụ xảy ra ở các nồng độ peptit nhỏ hơn dẫn đến tạo ra kết tụ có kích thước trung bình lớn hơn so với kích thước trung bình ban đầu. Các đồ thị được xây dựng bằng SigmaPlot 10.0 (Systat Software Inc., USA).

#### Phân tích bằng kính hiển vi điện tử truyền qua về hình thái học của cấu trúc siêu phân tử được tạo ra bởi peptit PHB4

Để phân tích hình thái học của các kết tụ được tạo ra bởi peptit PHB4, các dung dịch peptit được xử lý thử nghiệm khác nhau trong đó các điều kiện như nhiệt độ, thời gian ủ và sự có mặt của chất điện phân được thao tác để tạo thuận lợi cho sự kết tụ (Fig. 10). Đối với nghiên cứu cụ thể này, hai dung dịch peptit (2 mg/ml, 0,73 mM) được chuẩn bị, một trong nước và một trong PBS. Sau đó, mẫu được lấy từ mỗi dung dịch, được cố định trực tiếp trên đường kẻ ô và được quan sát dưới kính hiển vi (các mẫu T0). Phần còn lại được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ 50°C và sau đó, các mẫu được lấy và được cố định ngay lập tức (các mẫu T1). Sau đó, phần còn lại được ủ trong 2 giờ nữa ở nhiệt độ trong phòng, và tiếp theo được cố định (các mẫu T2).

Như quan sát thấy trên Fig. 10A, khi được hòa tan trong nước, peptit tạo ra các hạt có đường kính nằm trong khoảng 5-20 nm ở nhiệt độ trong phòng. Cùng với các

hạt, việc xử lý ở nhiệt độ 50°C làm xuất hiện các cấu trúc dạng sợi kiểu protofibril/fibril có kích thước nằm trong khoảng 5-10 nm (Fig. 10E). Có một khoảng thời gian trễ đối với sự tạo ra các sợi fibril trong nước, do chúng được phát hiện trong mẫu T2 chỉ sau khi xử lý bằng nhiệt. Sự tạo ra sợi fibril được ưu tiên ở cường độ ion cao hơn (PBS), do cấu trúc dạng sợi dài hơn (5-20 nm) được tạo ra ngay sau khi hòa tan peptit này trong PBS (Fig. 10B), mà tiếp tục tăng về số lượng sau khi gia nhiệt mẫu này trong 1 giờ ở nhiệt độ 50°C (Fig. 10D và 10F). Các kết quả này chứng tỏ rằng nhiệt độ và cường độ ion cao hơn làm thuận lợi cho sự kết tụ peptit PHB4.

Ngoài ra, nghiên cứu này chỉ rõ rằng peptit PHB4 tạo ra kết tụ siêu phân tử mà hình thái học của nó phụ thuộc vào thành phần môi trường chính xác và nhiệt độ. Kích thước của các cấu trúc dạng sợi quan sát được là phù hợp với kích thước của cấu trúc kiểu dạng tinh bột, mà thường phát triển dưới dạng các sợi kéo dài thông qua việc tạo ra các tấm beta kéo dài.

Kết quả của các quá trình kết tụ protein phụ thuộc vào sự cân bằng chính xác giữa lực đẩy và lực hút giữa các phân tử protein (Juárez, J., et al. (2009) *Biophysical Journal* 96[6], 2353-2370). Đã biết rằng việc bổ sung các chất điện phân vào dung dịch protein thường làm tăng tốc độ tạo ra sợi, do sự chắn lực đẩy tĩnh điện giữa các phân tử protein bởi các chất điện phân này, do đó đẩy sự cân bằng về phía tương tác liên phân tử hấp dẫn và, vì vậy, tạo ra kết tụ (Juárez, J., et al. (2009) *Biophysical Journal* 96[6], 2353-2370; Sagis, L.M., et al. (2004). *Langmuir* 20, 924-927). Động học của quá trình tương tác liên phân tử cũng được làm thuận lợi bởi nhiệt độ, mà đã biết từ lâu là đóng vai trò cơ bản trong việc tạo ra kết tụ protein.

Ví dụ 6. Nghiên cứu sự tương tác của các peptit có cấu trúc kẹp tóc beta với mảnh thụ thể LRP1

Đã biết rằng bệnh nhiễm DENV có thể được phong bế bởi các phân tử mà cản trở sự tương tác giữa các virion DENV và thụ thể tế bào đã biết là LRP1 (Huerta H. et al, WO 2007/124698). LRP1 là protein màng nguyên vẹn (Fig. 11A) được tạo ra bởi chuỗi  $\alpha$  xấp xỉ 500 kDa được liên kết không đồng hóa trị với chuỗi  $\beta$  85 kDa (Anna P. Lillis, et al. (2008) *Physiol Rev* 88: 887-918). Vùng ngoại bào của thụ thể này được tạo ra bởi toàn bộ chuỗi  $\alpha$  và một phần chuỗi  $\beta$ , chứa đoạn xuyên màng và hai môtip NPxY để tương tác với các protein nội bào tham gia trong việc tạo tín hiệu thụ thể và nhập bào. LRP1 là thụ thể nội bào cơ định có thể nội hóa trên 30 phối tử khác nhau,

và đã được biết là tham gia trong một số quá trình quan trọng bao gồm sự chuyển hóa lipid, cầm máu, hoạt hóa các enzym lysosom và sự dẫn truyền thần kinh.

Chuỗi  $\alpha$  của LRP1 tương tác với các phối tử LRP1 ngoại bào. Chuỗi này thể hiện kiến trúc miền điển hình của các thành viên thuộc họ thụ thể lipoprotein tỷ trọng thấp, là họ mà LRP1 thuộc. Đặc biệt, chuỗi  $\alpha$  của LRP1 chứa bốn nhóm chứa 2 (nhóm I), 8 (nhóm II), 10 (nhóm III) và 11 (nhóm IV) vị trí gắn kết phối tử có liên quan về mặt cấu trúc với các vùng giàu Cys của các protein của đợt bỏ thể. Sau mỗi nhóm vị trí gắn kết phối tử có miền giống yếu tố sinh trưởng biểu bì (Epidermal Growth Factor - EGF), được tạo ra bởi các vùng giàu Cys và miền YWTD.

Để xác định xem các miền gắn kết phối tử của LRP1 có tương tác với DIIIIE từ DENV hay không, các protein DIIIIE tái tổ hợp được tạo ra từ các gốc 289-399 của protein E từ DENV1 chủng Jamaica/CV1636/1977 (DIIIIE1J); các gốc 289-399 của protein E từ DENV2 chủng Jamaica 1409 (DIIIIE2); các gốc 287-397 của protein E từ DENV3 chủng H-87 (DIIIIE3) và các gốc 289-399 của protein E từ DENV4, chủng Dominica 814669 (DIIIIE4), được dung hợp với nhãn hexahistidin đầu tận cùng C (SEQ ID No. 19-22), như được thể hiện trên Fig. 11C. Các protein DIIIIE1J và DIIIIE2-DIIIIE4 được thu lại bằng cách biểu hiện khác loại trong *E. coli* và làm sạch bằng cách sắc ký ái lực kim loại cố định (immobilized metal affinity chromatography - IMAC), sản phẩm thu được có độ tinh khiết trên 90%, như được chứng minh bằng phân tích SDS-PAGE (Fig. 11D).

Ngoài ra, thử nghiệm này sử dụng ba protein tái tổ hợp chứa các nhóm II, III hoặc IV từ LRP1, lần lượt được gọi tên là sLRP1-CII (SEQ ID No. 23), sLRP1-CIII (SEQ ID No. 24) và sLRP1-CIV (SEQ ID No. 25), được dung hợp với vùng ổn định của phân tử IgG1 của người (R&D Systems, USA) (Fig. 11B).

Việc đánh giá các tương tác DIII/LRP1 được thực hiện bằng thử nghiệm ELISA, trong đó đĩa 96 lỗ được phủ bằng các protein DIIIIE1J hoặc DIIIIE2-DIIIIE4 ở 10  $\mu\text{g/ml}$ , sau đó, được phong bế bằng albumin huyết thanh bò (Bovine Serum Albumin - BSA) và ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ 37°C với sLRP1 CII, sLRP1 CIII hoặc sLRP1 CIV ở 10  $\mu\text{g/ml}$  trong dung dịch HEPES 20 mM có độ pH=7,5/NaCl 150 mM/CaCl<sub>2</sub> 1 mM/Tween 20 0,05%. Sau khi rửa, các đĩa được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ 37°C với dịch pha loãng theo tỷ lệ 1:1000 của thể tiếp hợp IgG kháng người-peroxidaza và được làm hiện hình bằng o-phenylendiamin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Dữ liệu thu được cho thấy kiểu tương tự của các tương tác đối với DIIIIE từ tất cả bốn kiểu huyết thanh, trong đó sLRP1-CIV biểu hiện mức độ gắn kết mạnh nhất tiếp theo là sLRP1-CII còn

sLRP1-CIII cho thấy không có gắn kết có thể phát hiện được với phân tử DIIIIE bất kỳ (Fig. 12).

Sự tương tác của các peptit có cấu trúc kẹp tóc beta với các mảnh hòa tan của thụ thể LRP1 được nghiên cứu bằng cộng hưởng plasmon bề mặt (Surface Plasmon Resonance - SPR), bằng cách sử dụng đơn vị Biacore X. Trong kỹ thuật này, một trong số các đối tác tương tác cần được nghiên cứu được giữ cố định trên bề mặt của chip, và đối tác tương tác kia được hòa tan trong dung dịch mà chảy qua tế bào đo bên trên của bề mặt tương tác, dưới các điều kiện chảy có kiểm soát. Sự liên kết và phân ly của các đối tác tương tác được đo theo đơn vị cộng hưởng (resonance unit - RU) và được vẽ đồ thị, dưới dạng hàm theo thời gian, trên đồ thị được gọi là ‘đồ thị cảm biến’. Do đó, SPR cho phép người thử nghiệm thu được thông tin chi tiết về sự tương tác mà không cần phải đánh dấu mỗi đối tác tương tác.

Trong ví dụ này, một kênh của chip CM5 (GE Healthcare, USA) được sử dụng để làm bất động protein sLRP1-CIV trên bề mặt của nó ở mật độ cao (xem Bảng 6) và albumin huyết thanh người tái tổ hợp (rHSA, Sigma-Aldrich, USA) được giữ cố định trên kênh kia. Dựa trên mật độ RU đạt được đối với mỗi phân tử, và giả sử rằng có 11 vị trí tương tác tiềm năng đối với mỗi phân tử sLRP1-CIV và một vị trí tương tác tiềm năng đối với mỗi phân tử HSA, do đó, các bề mặt ở cả hai kênh sẽ thể hiện mật độ tương tự của các vị trí gắn kết trên mỗi đơn vị diện tích bề mặt ( $\text{pmol}/\text{mm}^2$ ).

Bảng 6. Tóm tắt các đặc điểm của bề mặt gắn kết trong chip CM5 được dùng để đánh giá các tương tác với sLRP1-CIV

| Kênh | Phối tử   | Khối lượng phân tử (kDa) | RU được giữ cố định | Vị trí gắn kết ( $\text{pmol}/\text{mm}^2$ ) | Nồng độ protein ở bề mặt của chip ( $\text{mol}/\text{l}$ ) |
|------|-----------|--------------------------|---------------------|----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| Fc1  | sLRP1_CIV | 77                       | 1.665               | 0,2                                          | $2,2 \times 10^{-4}$                                        |
| Fc2  | rHSA      | 67                       | 10.108              | 0,2-0,1                                      | $1,5 \times 10^{-3}$                                        |

Khả năng phản ứng của protein được giữ cố định được đánh giá bằng cách sử dụng hai phối tử LRP1 đã biết; cụ thể là,  $\alpha 2\text{M}$  và protein đã biết là protein liên kết thụ thể (Receptor-Associated Protein - RAP). Trước đây đã chứng minh được rằng cả hai phân tử tương tác với nhóm IV của thụ thể LRP1 (Jaap G. Neels, et al. (1999).

*Journal of Biological Chemistry*, 274, 44: 31305-31311). Fig. 13 thể hiện các kết quả kiểm chứng này. Như có thể quan sát thấy, việc nạp  $\alpha$ 2M hoặc RAP làm tăng tín hiệu dò được (RU) trên kênh sLRP1-CIV, nhưng không tạo ra sự tăng cường độ tín hiệu trên kênh rHSA. Kết quả này chứng tỏ rằng sLRP1-CIV được giữ cố định có khả năng thiết lập tương tác đặc hiệu với cả hai phối tử.

Mặc dù, đã quyết định làm bất động sLRP1-CIV ở mật độ cao do điều kiện này làm dễ dàng hơn cho việc phát hiện tương tác tiềm năng bất kỳ bằng các hợp chất mà khối lượng phân tử của chúng thấp hơn khối lượng phân tử của các protein trung bình (như các peptit mà thử nghiệm này dự định nghiên cứu), phải nhấn mạnh rằng trên các bề mặt có mật độ cao, sự hạn chế chuyển khối và khả năng gắn kết đa hóa trị gây khó khăn cho việc xác định chính xác các hằng số động học. Do đó, và để mô tả đặc điểm chi tiết hơn về bề mặt gắn kết sLRP1-CIV, các dịch pha loãng RAP khác nhau (0,6-20  $\mu$ M) được nạp, và RU được ghi dưới các điều kiện của sự cân bằng tương tác (250 giây, xem Fig. 13B). Tập tính được biểu diễn bởi đường cong RU lớn nhất thu được so với nồng độ là khớp tốt với tập tính của mô hình vị trí kép trong đó có sự tương tác ái lực cao với  $K_d$  là 4,2 nM và sự tương tác ái lực thấp với  $K_d$  là 1,1  $\mu$ M. Dữ liệu này là phù hợp với các kết quả khác thu được trong các nghiên cứu khác nhau phân tích sự gắn kết của RAP với LRP1, chỉ ra rằng RAP thiết lập tương tác nhiều điểm với các nhóm II và IV của LRP1 với ái lực nằm trong khoảng 6-18 nM, và sự mất đa hóa trị trong tương tác này dẫn đến hằng số ái lực trong phạm vi micromol. Vì vậy, trong thử nghiệm này, sự có mặt của tương tác mà ái lực của nó thuộc phạm vi micromol có thể được giải thích bởi mật độ cao của sLRP1-CIV được giữ cố định ở bề mặt của chip, tạo thuận lợi cho việc làm mất tương tác đa hóa trị ở nồng độ RAP cao. Dữ liệu này còn chỉ ra rằng sLRP1-CIV được giữ cố định sao chép chính xác các đặc điểm đã được báo cáo trước đây của tương tác LRP1-RAP.

Sự gắn kết của các peptit có cấu trúc kẹp tóc beta với sLRP1-CIV được nghiên cứu bằng cách nạp dịch pha loãng 20  $\mu$ M trong dung dịch đệm chạy của các biến thể peptit khác nhau lên trên chip sLRP1-CIV được mô tả trên đây. Cường độ cao của tín hiệu thu được là phù hợp với sự gắn kết của dạng được kết tụ hơn là dạng monome của các peptit này. Do đó, các biến đổi quan sát được giữa các peptit khác nhau có thể phản ánh sự khác biệt về ái lực của tương tác peptit đơn nhất hoặc sự khác biệt về số lượng và/hoặc hình dạng kết tụ mà dẫn đến các thay đổi về số lượng đơn vị peptit có thể gắn đồng thời với phân tử sLRP1-CIV được giữ cố định theo cách đa hóa trị.

Trong trường hợp các peptit thuộc họ HDIII3CL (các peptit 10-14 trong Bảng 1), biến thể HDIII3CL2 thể hiện mức độ gắn kết mạnh nhất. Cũng có gắn kết đặc hiệu có thể phát hiện được trong trường hợp các biến thể HDIII3CLW và HDIII3CLK, mặc dù cường độ của tương tác là thấp hơn nhiều, gợi ý rằng sự thay thế các gốc Trp17 và Lys14 có tác dụng có hại đến gắn kết với sLRP1-CIV. Có tương tác bên lề nhiều nhất trong trường hợp biến thể HDIII3CLC, chỉ ra rằng sự thay thế các gốc C1 và C18 (nói cách khác, sự làm mất cầu nối disulfua) ảnh hưởng đột ngột đến cường độ của tương tác của peptit với sLRP1-CIV. Kết quả này là phù hợp với dữ liệu trước đó về hiệu lực của hoạt tính kháng virus được thể hiện bởi các peptit này, vì HDIII3CLC, HDIII3CLW và HDIII3CLK, mà việc gắn kết của chúng với sLRP1-CIV bị giảm so với HDIII3CL, không thể hiện hoạt tính kháng virus *in vitro* chống DENV2 trong các tế bào Vero (xem Bảng 2). Mặt khác, sự gắn kết mạnh hơn với sLRP1-CIV được thể hiện bởi HDIII3CL2 không chuyển thành hoạt tính kháng virus có hiệu lực hơn so với HDIII3CL (xem Bảng 2), chứng tỏ rằng sự gắn kết thụ thể *bản thân nó* là cần thiết nhưng không đủ đối với hoạt tính kháng virus. Một giải thích có thể về phát hiện này là có một phần HDIII3CL2 mà gắn kết với các vị trí trên sLRP1-CIV không đóng vai trò liên quan trong tương tác virus-thụ thể, và/hoặc nó gắn kết với ái lực rất thấp; một giả thuyết hợp lý có tính đến kiến trúc nhiều miền của thụ thể LRP1 và các nhóm của nó. Sự khác biệt giữa các peptit HDIII3CL2 và HDIII3CL ở chỗ peptit HDIII3CL2 có lysin đầu tận cùng C bổ sung và do đó, có tính chất cation mạnh hơn, mà có thể tạo thuận lợi cho các tương tác tĩnh điện bổ sung với thụ thể LRP1 tích điện âm. Ngoài ra, phải chỉ ra rằng Lys21 không tạo ra phần của kẹp tóc mà là vùng cấu trúc liên kết bất chức mảnh chức năng trong DIII đã được mô tả trước đây (Huerta V. và các đồng tác giả, WO 2007/124698) và trong sáng chế này.

Quy trình tương tự được thực hiện để đánh giá sự tương tác của các peptit có cấu trúc kẹp tóc beta PHB1, PHB2, PHB3, PHB4, PHB5, PHB8 và PHB9 với bề mặt sLRP1-CIV. Như được thể hiện trên các fig. 14B và 14D, peptit PHB4, mà trong các thử nghiệm trước là peptit kháng virus có hiệu lực nhất của chuỗi này, còn thể hiện mức độ gắn kết mạnh nhất bởi SPR với sLRP1-CIV. Các peptit PHB2, PHB4 và PHB9 cũng thể hiện mức độ gắn kết lớn nhất so với mức độ gắn kết của peptit HDIII3CL (các fig. 14A và 14C), tương ứng với hoạt tính kháng virus *in vitro* của chúng. Sự so sánh mức độ gắn kết lớn nhất của các peptit có cùng kích thước và loại vòng ngoặt beta (PHB1-2, PHB3-4 và PHB8-9) cho thấy rằng các peptit PHB2, PHB4 và PHB9 là chất gắn kết tốt hơn so với đối tác của chúng (PHB1, PHB3 và PHB8),

tương đương với tập tính của chúng trong các thử nghiệm đánh giá hoạt tính kháng virus (xem ví dụ 2).

Ví dụ 7. Sự tương quan giữa hoạt tính kháng virus của các peptit có cấu trúc kẹp tóc beta và mức độ gắn kết của chúng với thụ thể LRP1 và protein  $\alpha 2M^*$

Trước đây thụ thể LRP1 đã được đề xuất làm thụ thể nội bào giả định đối với DENV, và vai trò ‘cầu nối’ hoặc ‘chất mang’ được cho là do protein  $\alpha 2M^*$  (phối tử LRP1) trong quá trình xâm nhập virus vào trong tế bào (*Huerta V. và các đồng tác giả, WO 2007/124698*).

Ví dụ trên (ví dụ 6) chứng minh rằng các peptit có cấu trúc kẹp tóc beta theo sáng chế có thể gắn với mảnh của thụ thể LRP1. Ví dụ này kiểm tra xem hoạt tính kháng virus thu được trong ví dụ 2 có liên quan định lượng với khả năng của các peptit này để gắn kết với thụ thể LRP1. Như có thể quan sát thấy trên Fig. 15, logarit của các trị số  $IC_{50}$  ( $-pIC_{50}$ ) của hoạt tính kháng virus của các peptit trong tế bào Vero thể hiện sự phụ thuộc tuyến tính vào trị số của tín hiệu Biacore thu được với thời gian chạy là 400 giây (RUrem). Trong trường hợp này, chỉ các peptit PHB có cùng cấu trúc liên kết, theo Bảng 1, được thể hiện. Không chỉ hiệu lực của hoạt tính kháng virus của peptit PHB4 cao hơn nhiều so với các peptit còn lại, mà peptit PHB4 làm tốt hơn đáng kể các chỉ tiêu khác xét về mặt gắn kết LRP1. Độ tuyến tính của mối quan hệ quan sát được trên đây còn không đổi ngay cả khi dữ liệu PHB4 được loại trừ (đồ thị lồng trên Fig. 15), do hệ số hồi quy tuyến tính ( $R^2$ ) là 0,99 với dữ liệu của PHB4 và là 0,97 với dữ liệu không có nó. Phân tích dữ liệu đồ thị lồng, có thể dự đoán rằng, nếu sự phụ thuộc tuyến tính được duy trì đối với PHB4 thì các trị số gắn kết Biacore sẽ tương ứng với hiệu lực kháng virus trong phạm vi nanomol, là phù hợp với hiệu lực được xác định bằng thử nghiệm trong ví dụ 2.

Dữ liệu  $pIC_{50}$  đối với hoạt tính kháng virus của các peptit có cấu trúc liên kết chung thể hiện sự tương quan có ý nghĩa thống kê với các trị số RUrem ( $r(\text{Pearson}) = -0,9957$  và  $P < 0,0001$ ). Nếu dữ liệu peptit PHB4 được loại trừ, các trị số của hệ số tương quan của Pearson vẫn tương tự ( $r(\text{Pearson}) = -0,9868$ ,  $P = 0,0018$ ). Các phân tích về sự tương quan, hồi quy tuyến tính và đồ thị được thực hiện bằng Prism v5.03 (GraphPad Software Inc., USA).

Các kết quả này là phù hợp với cơ chế tác dụng kháng virus nhờ đó các peptit PHB cản trở sự tương tác giữa các virion và thụ thể LRP1, dẫn đến sự ức chế xâm nhập virus có hiệu quả vào trong tế bào.

Phân tích tương tự được thực hiện đối với khả năng của các peptit PHB ức chế sự gắn kết của DIIIIE với protein  $\alpha 2M^*$  trong phạm vi dưới micromol/nanomol. Như được thể hiện trong ví dụ 3, ở khoảng nồng độ đó, các peptit này ức chế một phần sự gắn kết của DIIIIE1J được biotin hóa (DIIIIE1Jbiot) với  $\alpha 2M^*$ , với các peptit PHB2, PHB4, PHB5, PHB8 và PHB9 có tỷ lệ phần trăm ức chế tốt hơn (gấp 1,5 đến 3 lần) so với DIIIIE1J đơn lẻ. Trong trường hợp này, khả năng ức chế của các peptit (so với khả năng của DIIIIE1J tái tổ hợp ức chế sự gắn kết của DIIIIE1Jbiot với  $\alpha 2M^*$ ) còn liên quan với hoạt tính kháng virus của chúng chống DENV2 trong tế bào Vero, như được thể hiện trên Fig. 16. Hệ số tương quan của Spearman giữa trị số  $IC_{50}$  và tỷ lệ phần trăm ức chế  $\alpha 2M^*$  (so với tỷ lệ phần trăm ức chế của DIIIIE1J tái tổ hợp) là  $R_s = -0,9762$ ,  $P=0,0004$ ; kết quả này gợi ý rằng các peptit có cấu trúc kẹp tóc beta theo sáng chế có thể cản trở vai trò của protein  $\alpha 2M^*$  trong quá trình xâm nhập của virus vào tế bào.

Ví dụ 8. Tác dụng của các chất ảnh hưởng đến sự kết tụ đến hoạt tính kháng virus của peptit PHB4

Hoạt tính kháng virus của peptit PHB4 được đánh giá sau khi xử lý tạo thuận lợi cho sự kết tụ của nó hoặc với sự có mặt của các chất khác nhau mà điều biến sự kết tụ, với mục đích kiểm tra tác dụng của chúng trên hoạt tính ức chế của peptit này đối với bệnh của các tế bào Huh7.5 nhiễm DENV2 chủng S16803. Huh7.5, dòng tế bào có nguồn gốc từ u gan của người, được chọn không chỉ do nó được chấp nhận trong DENV2, mà còn vì sự thích hợp của nó làm hệ thử nghiệm theo quan điểm về sinh bệnh học DENV (*Lin YL, et al. (2000) J Med Virol.; 60(4):425-31*).

Dựa trên các kết quả được thể hiện trong ví dụ 5, mà chúng tỏ rằng các thay đổi về cường độ ion gây ra các thay đổi về kích thước và hình thái học của kết tụ peptit, thử nghiệm được thiết kế trong đó, bắt đầu từ dung dịch đặc của PHB4 trong nước, peptit này được hòa tan trong (i) môi trường MEM hoặc (ii) PBS (chứa lần lượt 6,8 g/l và 8,0 g/l NaCl, và có độ pH được điều chỉnh đến 7,4) và được đưa vào các điều kiện khác nhau để đánh giá.

Hoạt tính kháng virus được đánh giá trong thử nghiệm về tác động của virus, trong đó các lớp đơn Huh7.5 có mức độ hợp dòng 80-90% được rửa hai lần bằng môi trường DMEM không được bổ sung và sau đó, được gây nhiễm ở m.o.i là 0,01 trong 2 giờ ở nhiệt độ 37°C và 5% CO<sub>2</sub> với sự có mặt của các chế phẩm peptit khác nhau, sau

đó, virus gây nhiễm được loại bỏ bằng cách rửa bằng môi trường DMEM không được bổ sung, và các tế bào được phát triển trong DMEM được bổ sung 2% FBS. Dịch nổi tế bào được gom lại ở 24 giờ *p.i.*, và mức độ tác động của virus được xác định bằng cách chuẩn độ dịch nổi này trong thử nghiệm tạo mảng (*Morens D. M., et al. (1985). N. J. Clin. Microbiology; 22: 250-254.*

Đã biết rằng nhiệt độ ảnh hưởng đáng kể đến sự kết tụ, hoặc sự tự lắp ráp các peptit thành cấu trúc siêu phân tử (*Sabaté R, et al. (2012). Biomacromolecules; 13(2):474-83.*). Do đó, chuỗi thử nghiệm thứ nhất được thiết lập trong đó, bắt đầu từ dung dịch peptit 20  $\mu\text{M}$  trong nước, các dịch pha loãng được pha chế trong MEM với khoảng nồng độ trải dài từ 10-0,01  $\mu\text{M}$ , sau đó, được ủ song song ở nhiệt độ 10°C và 37°C trong 2 giờ và sau đó, được sử dụng trong thử nghiệm ức chế virus. Các dịch peptit loãng không được ủ (tức là được pha chế ngay trước thử nghiệm ức chế virus) được sử dụng làm đối chứng.

Các kết quả thể hiện rằng peptit không được ủ, được hòa tan trong môi trường MEM, ức chế sự nhiễm virus theo cách phụ thuộc liều, với  $\text{IC}_{50}$  là 0,16  $\mu\text{M}$  và  $\text{IC}_{100}$  là 10  $\mu\text{M}$  (Fig. 17, Bảng 7). Tuy nhiên, việc ủ trước peptit này trong MEM ở nhiệt độ 10°C tạo ra mức tăng hiệu lực rõ rệt, với  $\text{IC}_{50}$  giảm xuống 0,037  $\mu\text{M}$ , còn việc ủ nó ở nhiệt độ 37°C tạo ra tác dụng đối lập, với  $\text{IC}_{50}$  của nó được tăng đến 0,89  $\mu\text{M}$ . Các kết quả này chứng tỏ rằng nhiệt độ đóng vai trò quyết định trong quá trình kết tụ peptit, như trong thử nghiệm sơ bộ này, nó tạo ra sự thay đổi về hiệu lực lớn đến 24 lần.

Bảng 7.  $\text{IC}_{50}$  của peptit PHB4 được ủ ở nhiệt độ 10°C hoặc 37°C.

| Chất phụ gia | Xử lý        |              |             |
|--------------|--------------|--------------|-------------|
|              | Không ủ      | 2 giờ-10°C   | 2 giờ-37°C  |
| -            | 0,16 (0,83*) | 0,037 (0,60) | 0,89 (0,87) |

$\text{IC}_{50}$  trong mỗi điều kiện thử nghiệm được xác định từ sự khớp không tuyến tính của dữ liệu, được thực hiện bằng cách sử dụng Prism v5.03. \*Số trong dấu ngoặc đơn là trị số của hệ số hồi quy đối với sự khớp ( $R^2$ ).

Thử nghiệm thứ hai được thiết kế để xác định sự ảnh hưởng của thời gian kết tụ đến hiệu lực kháng virus của peptit PHB4 (Fig. 18). Trong thử nghiệm này, peptit được ủ trong PBS trong các khoảng thời gian khác nhau, và sau đó, được pha loãng trong một

thể tích dung dịch HSA 80 mg/ml trong DMEM nhằm mục đích làm ngừng quá trình kết tụ (HSA là chất điều biến sự kết tụ có hiệu lực đã được thể hiện là ức chế cả sự tạo mầm ban đầu và sự sinh trưởng của sợi peptit dạng tinh bột  $\beta$ , xem Reyes A., et al. (2009) *Journal of Biological Engineering*, 3:5) trước khi đánh giá hoạt tính kháng virus của hỗn hợp thu được. Việc ủ bằng HSA này được thực hiện song song ở nhiệt độ 10°C hoặc 37°C (Fig. 18), và các dịch pha loãng hơn của các mẫu peptit này để đánh giá hoạt tính kháng virus của chúng được thực hiện trong dung dịch HSA 40 mg/ml trong DMEM.

Như được thể hiện trên Fig. 19, dưới các điều kiện của thử nghiệm, các trị số hoạt tính kháng virus của peptit tạo ra đường cong đáp ứng liều có dạng chuông cho thấy sự tồn tại của một khoảng nồng độ peptit tối ưu đối với hoạt tính ức chế của nó. Loại đáp ứng này được thấy phổ biến trong hoạt tính của nhiều hệ sinh học khác nhau, và mặc dù không có cơ chế tác động duy nhất cho tập tính này, yếu tố chung trong tất cả các trường hợp là sự tồn tại của các tương tác đa hóa trị giữa các phân tử trong trường hợp đó.

Các kết quả này chứng tỏ rằng hoạt tính ức chế của peptit là nhạy cảm với thời gian ủ trong PBS để tạo ra các kết tụ có hiệu lực cao hơn, trong đó hiệu lực được hiểu, trong trường hợp này, là nồng độ peptit thấp nhất làm giảm 50% tác động của virus của đối chứng nhiễm bệnh trong thử nghiệm này. Mặt khác, việc ủ bằng HSA ở nhiệt độ 10°C dẫn đến tạo ra các biến thể có hiệu lực thấp hơn so với các kết quả thu được bằng cách ủ ở nhiệt độ 37°C. Điều này xác nhận rằng có thể có tương tác giữa peptit, hoặc các kết tụ vẫn đang phát triển của nó, với HSA, trong đó tiến trình của quá trình kết tụ được thay đổi, dẫn đến tạo ra các biến thể có hiệu lực cao như các biến thể thu được bằng cách ủ trong 45-60 phút trong PBS và sau đó, ủ bằng HSA ở nhiệt độ 37°C, mà có thể tạo ra tổng mức độ ức chế bệnh nhiễm bởi DENV trong dạng thử nghiệm này ở các nồng độ peptit thấp đến 1 nM-10 pM.

Nồng độ peptit ban đầu là một thông số khác mà có thể ảnh hưởng đến động học và các kết quả cuối của quá trình kết tụ theo cách đáng kể. Để phân tích kỹ cách mà thông số này ảnh hưởng đến hoạt tính kháng virus của peptit PHB4, một thử nghiệm được thiết lập (được biểu diễn dưới dạng sơ đồ trên Fig. 20) trong đó các dung dịch peptit trong nước ở các nồng độ nằm trong khoảng từ 100  $\mu$ M đến 2  $\mu$ M được pha loãng bằng một thể tích MEM 2X và được ủ trong 2 giờ ở nhiệt độ 25°C, sau đó, các

dịch pha loãng trong môi trường DMEM không được bổ sung được pha chế và thử nghiệm hoạt tính kháng virus.

Các kết quả này chứng tỏ rằng có mối quan hệ giữa hoạt tính kháng virus và nồng độ peptit PHB4 ban đầu trong nước trước khi bổ sung nó vào dung dịch có cường độ ion cao hơn để khơi mào quá trình sinh trưởng kết tụ (Fig. 21). Ngoài ra, dữ liệu này còn chứng tỏ sự thay đổi về tập tính đáp ứng theo liều, xác nhận sự tiến triển về phía các cấu trúc kết tụ mà khác nhau, tùy thuộc vào các điều kiện ban đầu của việc hòa tan peptit trong nước. Các dạng có hiệu lực nhất một lần nữa thể hiện đường cong đáp ứng liều có dạng chuông, và thu được trong điều kiện trong đó peptit này được tìm thấy ở dịch pha loãng trong nước ban đầu cao nhất được đánh giá trong thử nghiệm này.

Trong tất cả, các kết quả chứng tỏ rằng peptit PHB4 có thể lắp ráp thành dạng kết tụ có hiệu lực kháng virus ở phạm vi nanomol/dưới nanomol, tùy thuộc vào các điều kiện kết tụ. Cần nhấn mạnh rằng phân tích hoạt tính kháng virus được sử dụng trong các thử nghiệm này là một trong số các thử nghiệm nghiêm ngặt nhất nhằm mục đích này, do phân tử được đánh giá chỉ có mặt trong giai đoạn ban đầu của bệnh nhiễm và sau đó được loại bỏ trong quá trình rửa tiếp theo của lớp đơn tế bào. Do đó, thực tế là hoạt tính kháng virus có thể phát hiện được bằng thiết lập thử nghiệm này là phù hợp với cơ chế tác động của peptit PHB4 nhờ đó nó ức chế một trong số các giai đoạn sớm của quá trình xâm nhập virus vào trong tế bào; cụ thể là việc gắn kết với bề mặt tế bào, sự nội hóa hoặc dung hợp màng.

#### Ví dụ 9. Bảo vệ mô hình động vật khỏi sự nhiễm virus

Thử nghiệm được thiết lập để đánh giá hoạt tính kháng virus *in vivo* của peptit PHB4 và so sánh nó với hoạt tính kháng virus của peptit HDIII3CL. Nhằm mục đích này, các nhóm gồm 12 con chuột Balb/c trưởng thành (thể trọng trung bình 20 g) được gây mê bằng cách cho hít ete và được gây nhiễm trong sọ bằng 20  $\mu$ l chế phẩm virus chứa 10 lần liều gây chết trung bình của mô hình này và peptit cần đánh giá. Các con chuột đã hồi phục một cách nhanh chóng và đã có vẻ tỉnh táo năm phút sau khi xử lý, và được giám sát sau đó trong 21 ngày. Dữ liệu này được đánh giá bằng cách sử dụng kiểm định logarit rank Kaplan-Meier.

Bảng 8 thể hiện các kết quả của thử nghiệm được thực hiện với bốn kiểu huyết thanh DENV. Ở liều được thử nghiệm, peptit PHB4 tạo ra sự bảo vệ hoàn toàn cho chuột, và do đó, có hiệu lực hơn so với peptit HDIII3CL. Trong trường hợp chủng DENV2, thử nghiệm này được lặp lại ba lần.

Bảng 8. Tóm tắt các kết quả của thử nghiệm bảo vệ *in vivo*

| Peptit   | Liều  | Mức độ bảo vệ (%) |         |                    |        |
|----------|-------|-------------------|---------|--------------------|--------|
|          |       | DENV1             | DENV2   | DENV3 <sup>a</sup> | DENV4  |
| PHB4     | 30 µg | 100***            | 100 *** | 100 ***            | 100*** |
| HDIII3CL | 30 µg | 50*               | 42**    | ND                 | 17***  |

Ý nghĩa thống kê: \*\*\*,  $P < 0,005$ ; \*\*,  $P < 0,01$ , \*  $P < 0,05$ . ND, không xác định được

a: Liều gây chết đối với chủng DENV3 được dùng trong thử nghiệm này không thể xác định được. Do đó, tỷ lệ mắc bệnh được đánh giá thay thế, giám sát chuột về sự xuất hiện các triệu chứng sau: bộ lông xù lên, liệt chân, và tư thế gập cong, và chuột có các dấu hiệu này được làm chết. bộ lông xù lên, tư thế gập cong, mệt nằm úp sấp, và liệt chân sau; và về thời gian của chúng trong ngày.

Ví dụ 10. Dung hợp peptit PHB4 với nhãn polyhistidin để lắp ráp thành hạt nano trên cơ sở kim loại

Trên đây các tác giả sáng chế đã chỉ ra rằng các peptit có cấu trúc kẹp tóc beta theo sáng chế có thể được sản xuất, bằng cách sử dụng công nghệ tổng hợp hóa học hoặc ADN tái tổ hợp, riêng rẽ hoặc được dung hợp với protein/peptit khác. Ngoài ra, đã chứng minh được trong ví dụ 5 rằng các peptit có cấu trúc kẹp tóc beta theo sáng chế có thể kết tụ và tuân theo các cấu trúc bậc bốn khác nhau, tùy thuộc vào nồng độ peptit ban đầu, loại dung môi và các điều kiện thử nghiệm như nhiệt độ, độ pH, cường độ ion, siêu âm, sự có mặt của các chất phụ gia, sự gắn kết không đồng hóa trị với các protein như HSA, v.v.. Sự tạo ra các cấu trúc siêu phân tử này làm tăng mạnh hoạt tính kháng virus của peptit có cấu trúc kẹp tóc beta (xem ví dụ 8), có thể do thực tế là khả lực của các tương tác của các hạt nano trên cơ sở peptit với thụ thể giả định của chúng là cao hơn nhiều do gắn kết đa hóa trị (sự tương tác đồng thời của một số monome trong cùng hạt nano với một số miền gắn kết phối tử trong thụ thể, hoặc với nhiều hơn một thụ thể trên bề mặt tế bào). Ngoài ra, sự tạo ra các hạt nano có thể góp

phân tích cực vào các đặc tính động học của peptit bằng cách làm tăng thời gian bán thải của nó trong huyết thanh, đem lại tính kháng proteaza huyết thanh, v.v..

Các hạt nano mà các peptit có cấu trúc kẹp tóc beta theo sáng chế đã biết là tạo ra có thể được làm ổn định hơn nữa bằng cách dung hợp các peptit này với các nhóm 'nhận' (A) mà có thể gắn kết không đồng hóa trị với phân tử hoặc nguyên tử 'đệm' (E), với hệ số tỷ lệ là hai hoặc nhiều nhóm 'A' đối với mỗi nhóm 'E'. Thiết kế như vậy sẽ cho phép sự liên kết hai hoặc nhiều peptit PHB với một đệm 'E'. Do đó, theo một phương án của sáng chế, các tác giả sáng chế đã nối, thông qua sự tổng hợp hóa học, nhãn bao gồm năm gốc histidin vào peptit PHB4 (Fig. 22). Nhãn poly-histidin có thể có chức năng như nhóm 'A' đối với các ion kim loại đa hóa trị, như Zn(II), Cu(II), Cu(II), Cs, v.v.. Trong trường hợp này, các nguyên tử của nhóm imidazol mà cấu thành chuỗi bên của gốc histidin thiết lập liên kết phối trí với ion kim loại với hệ số tỷ lệ lên đến bốn nhóm imidazol trên mỗi ion kim loại. Do đó, ở các nồng độ nhất định, ion kim loại gắn polyhistidin có thể tác động như nhóm E và thúc đẩy sự nhị trùng hóa peptit.

Fig. 23 thể hiện dưới dạng sơ đồ cách mà ion kim loại có thể được sử dụng để liên kết với nhau, cả trực tiếp và gián tiếp, các peptit khác nhau mang các nhóm imidazol khả dụng, bằng cách phối trí với các nhóm tạo chelat phụ trợ như các hợp chất tetraanion EGTA (axit etylen glycol-bis(2-aminoetylate)-N,N,N',N'-tetraaxetic) và EDTA (axit 2-({2-[bis(carboxymetyl)amino]etyl}(carboxymetyl)amino)axetic). Trong các trường hợp này, ion kim loại tạo ra phức hợp EGTA(Me)<sub>2</sub> và EDTA(Me)<sub>2</sub> với hệ số tỷ lệ của hai nguyên tử kim loại trên mỗi phân tử axit diamintetracarboxylic, trong đó các ion kim loại này vẫn có thể tạo ra các liên kết phối trí với các nhóm imidazol bổ sung, từ đó tác động như nhóm 'E' mà có thể làm ổn định liên kết chéo của các peptit và các kết tụ của chúng (Fig. 23).

Fig. 22 thể hiện hai phân tử dung hợp được bộc lộ trong sáng chế; một phân tử trong đó nhãn poly-histidin được gắn vào peptit PHB4 thông qua liên kết amit đầu tận cùng C (PHB4H5) và phân tử kia trong đó nhãn này được nối qua đầu tận cùng N với peptit theo cách tương tự (H5PHB4). Cả hai peptit dung hợp được tổng hợp và được làm sạch theo các quy trình được mô tả trên đây trong ví dụ 1, và được sử dụng để chuẩn bị dung dịch 200  $\mu$ M của mỗi peptit trong dung dịch đệm MES 10 mM có độ pH=6,8-7,5 chứa ZnCl<sub>2</sub> 2 mM (cung cấp ion kim loại) hoặc phức hợp EGTA(Zn<sub>2</sub>) 2 mM, đã thu được từ trước bằng cách bổ sung ZnCl<sub>2</sub> ở nồng độ cuối là 8 mM vào dung dịch chứa EGTA 4 mM.

Các chế phẩm peptit này (PHB4H5 và H5PHB4, riêng rẽ hoặc trong phức hợp với Zn hoặc EGTA(Zn<sub>2</sub>)) sau đó được thử nghiệm đánh giá hoạt tính kháng virus đối với DENV2 (chủng M2C) trong các tế bào Vero. Nói ngắn gọn, các tế bào này được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ 37°C với sự có mặt của các chế phẩm peptit, và sau đó, virus gây nhiễm được bổ sung vào ở m.o.i. là 0,001. Hai giờ sau, lớp môi trường có mật độ cao được bổ sung vào và các đĩa được ủ trong 3 ngày ở nhiệt độ 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Các tế bào chỉ được ủ bằng dung dịch chứa ZnCl<sub>2</sub> và EGTA(Zn<sub>2</sub>) ở các nồng độ tương ứng trước khi gây nhiễm bằng virus được sử dụng làm đối chứng âm tính. Các mảng virus được phát hiện bằng cách sử dụng kỹ thuật tập trung miễn dịch (immunofoci) bằng kháng thể đơn dòng đặc hiệu đối với vỏ virus, và tỷ lệ phần trăm ức chế được tính bằng công thức sau:

$$I = 100 - 100 \times \text{NP}_{\text{peptit}} / \text{NP}_{\text{Đối chứng âm tính}}$$

Trong đó I là tỷ lệ phần trăm ức chế và NP là số lượng mảng virus, được tính trung bình qua các bản sao.

Như có thể quan sát thấy trên Fig. 24, mặc dù peptit dung hợp (riêng rẽ, không có chất phụ gia kim loại) ức chế tốt ở nồng độ 20 µM (tỷ lệ phần trăm ức chế gần 100%), nhưng hoạt tính kháng virus biến mất ở các nồng độ peptit là 4 hoặc 0,16 µM. Tuy nhiên, ở các nồng độ này, các phức hợp của peptit với chất đệm EGTA(Zn<sub>2</sub>) vẫn thể hiện hoạt tính kháng virus trong khoảng tỷ lệ phần trăm ức chế là 50-70%. Peptit H5PHB4 có tỷ lệ phần trăm ức chế là 33% ở 0,16 µM.

Các kết quả này chứng tỏ rằng các thể dung hợp của peptit PHB4 với nhân poly-histidin thể hiện hoạt tính kháng virus có hiệu lực hơn khi được tạo phức với chất đệm, đặc biệt là với chất đệm EGTA(Zn<sub>2</sub>).

**YÊU CẦU BẢO HỘ**

1. Peptit có cấu trúc kẹp tóc beta, có hoạt tính kháng virus chống virus Dengue, khác biệt ở chỗ, có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID No. 1 đến SEQ ID No. 9 hoặc trình tự tương tự của nó; trong đó trình tự tương tự này:

(i) có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% so với SEQ ID No. 1 hoặc SEQ ID No. 2, trong đó trình tự này bao gồm:

vị trí 1: Cys, Lys, Asp, hoặc Glu;

vị trí 2: Val, Ile, Trp, Phe, Tyr hoặc Met;

vị trí 3: Tyr hoặc Asn;

vị trí 4: Trp, Val, Phe hoặc Glu;

vị trí 5: Thr, Val hoặc Ile;

vị trí 6: Arg, Ile, Val, Glu hoặc Leu;

vị trí 7: d-Pro;

vị trí 8: Asp, Lys hoặc Asn;

vị trí 9: Trp, Lys, Met, Thr hoặc Gln;

vị trí 10: Lys;

vị trí 11: Val, Met, His hoặc Leu;

vị trí 12: Asn, Asp, Ser hoặc His;

vị trí 13: Trp;

vị trí 14: nếu vị trí 1 là Cys, vị trí 14 là Cys, thì nó tạo thành liên kết disulfua với Cys ở vị trí 1; nếu vị trí 1 là Glu hoặc Asp, vị trí 14 là Lys, thì nó tạo thành liên kết amit với Glu hoặc Asp ở vị trí 1; nếu vị trí 1 là Lys, vị trí 14 là Glu hoặc Asp, thì nó tạo thành liên kết amit với Lys ở vị trí 1; và,

là phần kéo dài đầu tận cùng C, ở các vị trí 15-16: dipeptit Lys-Lys, hoặc ở các vị trí 15-17: tripeptit Lys-Lys-Lys; hoặc

(ii) có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% so với SEQ ID No. 3 hoặc SEQ ID No. 4, trong đó trình tự này bao gồm:

vị trí 1: Cys, Lys, Asp, hoặc Glu;

vị trí 2: Ile, Val, Trp, Phe, Tyr hoặc Met;  
 vị trí 3: Glu hoặc Asp;  
 vị trí 4: Val, Ile, Trp, Phe, Tyr hoặc Met;  
 vị trí 5: Tyr hoặc Asn;  
 vị trí 6: Trp, Val, Phe, Glu;  
 vị trí 7: Thr, Val hoặc Ile;  
 vị trí 8: Arg, Ile, Val, Glu hoặc Leu;  
 vị trí 9: d-Pro;  
 vị trí 10: Asp, Lys hoặc Asn;  
 vị trí 11: Trp, Lys, Met, Thr hoặc Gln;  
 vị trí 12: Lys;  
 vị trí 13: Val, Met, His hoặc Leu;  
 vị trí 14: Asn, Asp, Ser hoặc His;  
 vị trí 15: Trp;  
 vị trí 16: Phe hoặc Tyr;  
 vị trí 17: Ile, Val, Trp, Phe, Tyr hoặc Met;  
 vị trí 18: nếu vị trí 1 là Cys, vị trí 18 là Cys, thì nó tạo thành liên kết disulfua với Cys ở vị trí 1; nếu vị trí 1 là Glu hoặc Asp, vị trí 18 là Lys, thì nó tạo thành liên kết amit với Glu hoặc Asp ở vị trí 1; nếu vị trí 1 là Lys, vị trí 18 là Glu hoặc Asp, thì nó tạo thành liên kết amit với Lys ở vị trí 1; và,  
 là phần kéo dài đầu tận cùng C, ở các vị trí 19-20: dipeptit Lys-Lys, hoặc ở các vị trí 19-21: tripeptit Lys-Lys-Lys; hoặc

(iii) có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% so với SEQ ID No.7, trong đó trình tự này bao gồm:

vị trí 1: Cys, Lys, Asp, hoặc Glu;  
 vị trí 2: Val, Ile, Trp, Phe, Tyr, Met;  
 vị trí 3: Tyr hoặc Asn;  
 vị trí 4: Val, Ile, Phe, Tyr hoặc Leu;  
 vị trí 5: Thr, Val hoặc Ile;  
 vị trí 6: Ile, Val, Tyr, His hoặc Lys;  
 vị trí 7: Asn hoặc Asp;  
 vị trí 8: Gly;

vị trí 9: Lys, His, Arg, Val, Tyr, Glu hoặc Met;

vị trí 10: Lys;

vị trí 11: Tyr, Val, Gln, Trp hoặc Phe;

vị trí 12: Asn, Asp, Ser hoặc His;

vị trí 13: Trp;

vị trí 14: nếu vị trí 1 là Cys, vị trí 14 là Cys, thì nó tạo thành liên kết disulfua với Cys ở vị trí 1; nếu vị trí 1 là Glu hoặc Asp, vị trí 14 là Lys, thì nó tạo thành liên kết amit với Glu hoặc Asp ở vị trí 1; nếu vị trí 1 là Lys, vị trí 14 là Glu hoặc Asp, thì nó tạo thành liên kết amit với Lys ở vị trí 1; và, là phần kéo dài đầu tận cùng C, ở các vị trí 15-16: dipeptit Lys-Lys, hoặc ở các vị trí 15-17: tripeptit Lys-Lys-Lys; hoặc

(iv) có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% so với SEQ ID No. 8 hoặc SEQ ID No. 9, trong đó trình tự này bao gồm:

vị trí 1: Cys, Lys, Asp, hoặc Glu;

vị trí 2: Ile, Val, Trp, Phe, Tyr hoặc Met;

vị trí 3: Glu hoặc Asp;

vị trí 4: Val, Ile, Trp, Phe, Tyr, Met;

vị trí 5: Tyr hoặc Asn;

vị trí 6: Val, Ile, Phe, Tyr hoặc Leu;

vị trí 7: Thr, Val hoặc Ile;

vị trí 8: Ile, Val, Tyr, His hoặc Lys;

vị trí 9: Asn hoặc Asp;

vị trí 10: Gly;

vị trí 11: Lys, His, Arg, Val, Tyr, Glu hoặc Met;

vị trí 12: Lys;

vị trí 13: Tyr, Val, Gln, Trp hoặc Phe;

vị trí 14: Asn, Asp, Ser hoặc His;

vị trí 15: Trp;

vị trí 16: Phe hoặc Tyr;

vị trí 17: Ile, Val, Trp, Phe, Tyr hoặc Met;

vị trí 18: nếu vị trí 1 là Cys, vị trí 18 là Cys, thì nó tạo thành liên kết disulfua với Cys ở vị trí 1; nếu vị trí 1 là Glu hoặc Asp, vị trí 18 là Lys, thì nó tạo thành

liên kết amit với Glu hoặc Asp ở vị trí 1, nếu vị trí 1 là Lys, vị trí 18 là Glu hoặc Asp, thì nó tạo thành liên kết amit với Lys ở vị trí 1; và, là phần kéo dài đầu tận cùng C, ở các vị trí 19-20: dipeptit Lys-Lys, hoặc ở các vị trí 19-21: tripeptit Lys-Lys-Lys; hoặc

(v) có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% so với SEQ ID No. 5 hoặc SEQ ID No. 6, trong đó trình tự này bao gồm:

vị trí 1: Phe hoặc Tyr;

vị trí 2: Trp;

vị trí 3: Asn, Asp, Ser hoặc His;

vị trí 4: Trp;

vị trí 5: Lys;

vị trí 6: Trp;

vị trí 7: Glu, Val, Arg, Ile hoặc Asp;

vị trí 8: d-Pro hoặc d-Lys;

vị trí 9: Asn, Asp hoặc Lys;

vị trí 10: Lys, Met, Trp, Gln hoặc Thr;

vị trí 11: Trp;

vị trí 12: Thr, Val hoặc Ile;

vị trí 13: Trp;

vị trí 14: Tyr hoặc Asn;

vị trí 15: Ile, Val, Trp, Phe, Tyr hoặc Met;

vị trí 16: Glu hoặc Asp; và, là phần kéo dài đầu tận cùng C, ở các vị trí 17-20: tetrapeptit Gly-Gly-Lys-Lys, hoặc ở các vị trí 17-21: pentapeptit Gly-Gly-Lys-Lys-Lys.

2. Dược phẩm, khác biệt ở chỗ, dược phẩm này chứa một hoặc nhiều peptit theo điểm 1 và ít nhất một tá dược được dụng.

3. Dược phẩm theo điểm 2, trong đó dược phẩm này chứa albumin huyết thanh người.

4. Dược phẩm theo điểm 2, trong đó các peptit này tạo ra kết tụ siêu phân tử.

## DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA

<120> PEPTIT CÓ CẤU TRÚC KẸP TÓC BETA CÓ HOẠT TÍNH KHÁNG VIRUT DENGUE VÀ ĐƯỢC PHÂN CHỨA PEPTIT NÀY

<130>

<140>

<141>

<150> CU 2014-0026

<151> 2014-03-03

<160> 25

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (7)

<223> chất đồng phân lập thể D-Prolin

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (17)

<223> Sự amit hóa ở đầu tận C

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit kẹp tóc beta, thiết kế hợp lý

<220>

<221> DISULFUA

<222> (1)..(14)

<400> 1

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Cys | Val | Asn | Trp | Thr | Glu | Pro | Asp | Lys | Lys | Val | Asn | Trp | Cys | Lys | Lys |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |     |

Lys

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> DISULFUA

<222> (1)..(14)

<220>

<221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 <223> chất đồng phân lập thể D-Prolin

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (17)  
 <223> Sự amit hóa ở đầu tận C

<220>  
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit kẹp tóc beta,  
 thiết kế hợp lý

<400> 2  
 Cys Val Tyr Trp Thr Arg Pro Lys Trp Lys Val Asn Trp Cys Lys Lys  
           1                                  5                                  10                                  15

Lys

<210> 3  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <221> DISULFUA  
 <222> (1)..(18)

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (9)  
 <223> chất đồng phân lập thể D-Prolin

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (21)  
 <223> Sự amit hóa ở đầu tận C

<220>  
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit kẹp tóc beta,  
 thiết kế hợp lý

<400> 3  
 Cys Ile Glu Val Asn Trp Thr Glu Pro Asp Lys Lys Val Asn Trp Phe  
           1                                  5                                  10                                  15

Ile Cys Lys Lys Lys  
                                   20

<210> 4  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <221> DISULFUA  
 <222> (1)..(18)

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (9)

<223> chất đồng phân lập thể D-Prolin

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (21)

<223> Sự amit hóa ở đầu tận C

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit kẹp tóc beta,  
thiết kế hợp lý

<400> 4

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Cys | Ile | Glu | Val | Tyr | Trp | Thr | Arg | Pro | Lys | Trp | Lys | Val | Asn | Trp | Phe |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

|     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ile | Cys | Lys | Lys | Lys |
|     |     |     |     | 20  |

<210> 5

<211> 21

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (8)

<223> chất đồng phân lập thể D-Lys

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (21)

<223> Sự amit hóa ở đầu tận C

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit kẹp tóc beta,  
thiết kế hợp lý

<400> 5

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Phe | Trp | Asn | Trp | Lys | Trp | Glu | Lys | Asn | Lys | Trp | Thr | Trp | Asn | Val | Glu |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

|     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Gly | Lys | Lys | Lys |
|     |     |     |     | 20  |

<210> 6

<211> 21

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (8)

<223> chất đồng phân lập thể D-Lys

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (21)

<223> Sự amit hóa ở đầu tận C

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit kẹp tóc beta,

## thiết kế hợp lý

&lt;400&gt; 6

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Phe | Trp | Asn | Trp | Lys | Trp | Glu | Pro | Asn | Lys | Trp | Thr | Trp | Asn | Val | Glu |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

|     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Gly | Lys | Lys | Lys |
|     |     |     |     | 20  |

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; DISULFUA

&lt;222&gt; (1) .. (14)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (17)

&lt;223&gt; Sự amit hóa ở đầu tận C

&lt;220&gt;

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit kẹp tóc beta,  
thiết kế hợp lý

&lt;400&gt; 7

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Cys | Val | Asn | Val | Thr | Ile | Asn | Gly | Lys | Lys | Tyr | Asn | Trp | Cys | Lys | Lys |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

Lys

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; DISULFUA

&lt;222&gt; (1) .. (18)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (21)

&lt;223&gt; Sự amit hóa ở đầu tận C

&lt;220&gt;

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit kẹp tóc beta,  
thiết kế hợp lý

&lt;400&gt; 8

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Cys | Ile | Glu | Val | Asn | Val | Thr | Ile | Asn | Gly | Lys | Lys | Tyr | Asn | Trp | Phe |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

|     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ile | Cys | Lys | Lys | Lys |
|     |     |     |     | 20  |

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 21

```

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> DISULFUA
<222> (1)..(18)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (21)
<223> Sự amit hóa ở đầu tận C

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit kẹp tóc beta,
      thiết kế hợp lý

<400> 9
Cys Ile Glu Val Tyr Val Thr Ile Asn Gly Lys Lys Tyr Asn Trp Phe
  1             5             10             15

Ile Cys Lys Lys Lys
      20

<210> 10
<211> 20
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> DISULFUA
<222> (1)..(18)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (20)
<223> Sự amit hóa ở đầu tận C

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit kẹp tóc beta,
      thiết kế hợp lý

<400> 10
Cys Ser Asn Ile Val Ile Gly Ile Gly Asp Lys Ala Leu Lys Ile Asn
  1             5             10             15

Trp Cys Lys Lys
      20

<210> 11
<211> 21
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> DISULFUA
<222> (1)..(18)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (21)
<223> Sự amit hóa ở đầu tận C

```

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit kẹp tóc beta,  
thiết kế hợp lý

<400> 11

Cys Ser Asn Ile Val Ile Gly Ile Gly Asp Lys Ala Leu Lys Ile Asn  
1 5 10 15

Trp Cys Lys Lys Lys  
20

<210> 12

<211> 21

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> DISULFUA

<222> (1)..(18)

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (21)

<223> Sự amit hóa ở đầu tận C

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit kẹp tóc beta,  
thiết kế hợp lý

<400> 12

Cys Ser Asn Ile Val Ile Gly Ile Gly Asp Lys Ala Leu Lys Ile Asn  
1 5 10 15

Ala Cys Lys Lys Lys  
20

<210> 13

<211> 21

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> DISULFUA

<222> (1)..(18)

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (21)

<223> Sự amit hóa ở đầu tận C

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit kẹp tóc beta,  
thiết kế hợp lý

<400> 13

Cys Ser Asn Ile Val Ile Gly Ile Gly Asp Lys Ala Leu Ala Ile Asn  
1 5 10 15

Trp Cys Lys Lys Lys  
20

<210> 14  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (21)  
 <223> Sự amit hóa ở đầu tận C

<220>  
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit kẹp tóc beta,  
 thiết kế hợp lý

<400> 14  
 Ser Ser Asn Ile Val Ile Gly Ile Gly Asp Lys Ala Leu Lys Ile Asn  
           1                          5                          10                          15  
 Trp Ser Lys Lys Lys  
                           20

<210> 15  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> Virut gây bệnh sốt xuất huyết typ 1

<220>  
 <221> DISULFUA  
 <222> (14)..(45)

<400> 15  
 Met Asp Lys Leu Thr Leu Lys Gly Met Ser Tyr Val Met Cys Thr Gly  
           1                          5                          10                          15  
 Ser Phe Lys Leu Glu Lys Glu Val Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Val  
                           20                          25                          30  
 Leu Val Gln Val Lys Tyr Glu Gly Thr Asp Ala Pro Cys Lys Ile Pro  
           35                          40                          45  
 Phe Ser Thr Gln Asp Glu Lys Gly Val Thr Gln Asn Gly Arg Leu Ile  
           50                          55                          60  
 Thr Ala Asn Pro Ile Val Thr Asp Lys Glu Lys Pro Val Asn Ile Glu  
           65                          70                          75                          80  
 Thr Glu Pro Pro Phe Gly Glu Ser Tyr Ile Val Val Gly Ala Gly Glu  
                           85                          90                          95  
 Lys Ala Leu Lys Leu Ser Trp Phe Lys Lys  
           100                          105

<210> 16  
 <211> 342  
 <212> ADN  
 <213> Virut gây bệnh sốt xuất huyết typ 1

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)

<223> mảnh Nde I/Xho I mã hóa rDIII DENV1

<220>

<223> ADN, sợi kép thẳng

<400> 16

```
catatggata aactgacttt aaaagggatg agctatgtga tgtgcacagg ctcatttaag 60
ctagagaagg aagtggctga gaccagcat ggaactgttc tagtgcaggt taaatacgaa 120
ggaacagatg cgccatgcaa gatccccctt tcgaccaag atgagaaagg agtgaccag 180
aatgggagat tgataacagc caatcccata gttactgaca aagaaaaacc agtcaacatt 240
gagacagaac caccttttgg tgagagctac atcgtggtag gggcaggtga aaaagctttg 300
aaactaagct ggttcaagaa aggaagcagc atagggctcg ag 342
```

<210> 17

<211> 119

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> VỊ TRÍ

<222> (114)..(119)

<223> nhân histidin

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: rDIII DENV1,  
miền III tái tổ hợp từ DENV1

<400> 17

```
Met Asp Lys Leu Thr Leu Lys Gly Met Ser Tyr Val Met Cys Thr Gly
  1          5          10          15

Ser Phe Lys Leu Glu Lys Glu Val Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Val
      20          25          30

Leu Val Gln Val Lys Tyr Glu Gly Thr Asp Ala Pro Cys Lys Ile Pro
      35          40          45

Phe Ser Thr Gln Asp Glu Lys Gly Val Thr Gln Asn Gly Arg Leu Ile
      50          55          60

Thr Ala Asn Pro Ile Val Thr Asp Lys Glu Lys Pro Val Asn Ile Glu
      65          70          75          80

Thr Glu Pro Pro Phe Gly Glu Ser Tyr Ile Val Val Gly Ala Gly Glu
      85          90          95

Lys Ala Leu Lys Leu Ser Trp Phe Lys Lys Gly Ser Ser Ile Gly Val
      100          105          110

Asp His His His His His His
      115
```

<210> 18

<211> 5700

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ADN, sợi kép, vòng

&lt;220&gt;

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: plasmid  
pET-DIII DEN1 mã hóa rDIII DENV1

&lt;400&gt; 18

```

catatggata aactgacttt aaaagggatg agctatgtga tgtgcacagg ctcatttaag 60
ctagagaagg aagtggctga gaccagcat ggaactgttc tagtgcagg taaatacgaa 120
ggaacagatg cgccatgcaa gatccccctt tcgacccaag atgagaaaagg agtgaccag 180
aatgggagat tgataacagc caatcccata gttactgaca aagaaaaacc agtcaacatt 240
gagacagaac caccttttgg tgagagctac atcgtggtag gggcaggtag aaaagctttg 300
aaactaagct ggttcaagaa aggaagcagc atagggctcg agcaccacca ccaccaccac 360
tgagatccgg ctgctaacia agcccgaaag gaagctgagt tggctgctgc caccgctgag 420
caataactag cataaccctt tggggcctct aaacgggtct tgaggggttt tttgctgaaa 480
ggaggaacta tatccggatt ggcgaatggg acgcgccctg tagcggcgca ttaagcgcg 540
cgggtgtggt ggttacgcgc agcgtgaccg ctacacttgc cagcgcccta gcgccgctc 600
ctttcgcttt ctcccttcc tttctcgcca cgttcgccgg ctttccccgt caagctctaa 660
atcgggggct ccttttaggg ttccgattta gtgctttacg gcacctcgac ccaaaaaaac 720
ttgattaggg tgatggttca cgtagtgggc catcgccctg atagacggtt tttcgccctt 780
tgacgttggg gtccacgttc tttaatagtg gactcttggt ccaactgga acaacactca 840
accctatctc ggtctattct tttgatttat aagggatttt gccgatttcg gcctattggg 900
taaaaaatga gctgatttaa caaaaattta acgcgaattt taacaaaata ttaacgttta 960
caatttcagg tggcactttt cggggaaaatg tgcgcggaac ccctatttgc ttatttttct 1020
aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg cttcaataat 1080
attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac atttccgtgt cgccttattt cctttttttg 1140
cggcattttt cttctctgtt tttgctcacc cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg 1200
aagatcagtt ggtgacagca gtgggttaca tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc 1260
ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc caatgatgag cacttttaaa gttctgctat 1320
gtggcgcggt attatcccggt attgacgccg ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact 1380
attctcagaa tgacttggtt gagtactcac cagtcacaga aaagcatctt acggatggca 1440
tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca taaccatgag tgataacact gcggccaact 1500
tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg agctaaccgc ttttttgac aacatggggg 1560
atcatgtaac tcgccttgat cgttggaac cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg 1620
agcgtgacac cacgatgcct gcagcaatgg caacaacgtt gcgcaacta ttaactggcg 1680
aactacttac tctagcttcc cggcaacaat taatagactg gatggaggcg gataaagttg 1740
caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg ctggctggtt tattgctgat aaatctggag 1800
ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg cagcactggg gccagatggt aagccctccc 1860
gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc aggcaactat ggatgaacga aatagacaga 1920
tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc attggttaact gtcagaccaa gtttactcat 1980
atatacttta gattgattta aaacttcatt tttaatttta aaggatctag gtgaagatcc 2040
tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt ttcgttcac tgagcgtcag 2100
accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct 2160
gcttgcaaac aaaaaacca ccgtaccag cggtagtttg tttgcccgaat caagagctac 2220
caactctttt tccgaaggta cctggcttca gcagagcgca gataccaaat actgctcttc 2280
tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca agaactctgt agcaccgcct acatacctcg 2340
ctctgctaatt cctgttacca gtggctgctg ccagtgcgga taagtcgtgt cttaccgggt 2400
tggactcaag acgatagtta ccggataagg cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt 2460
gcacacagcc cagcttgag cgaacgacct acaccgaact gagataccta cagcgtgagc 2520
tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga gaaaggcgga caggatccg gtaagcggca 2580
gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata 2640
gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg 2700
ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg cggccttttt acggttcctg gccttttgct 2760
ggccttttgc tcacatgttc tttcctgctg tatccctga tttgtggat aaccgtatta 2820
ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc gcagccgaac gaccgagcgc agcagtcag 2880
tgagcgagga agcgggaagag cgcctgatgc ggtattttct ccttacgcat ctgtcggtta 2940
tttcacaccg catatatggt gcaactctag tacaactctgc tctgatgccg catagttaag 3000
ccagtataca ctccgctatc gctacgtgac tgggtcatgg ctgcgccccg acaccgcca 3060
acaccgctg acgcgccctg acgggcttgt ctgctcccg catccgctta cagacaagct 3120
gtgaccgtct ccgggagctg catgtgtcag aggtttttcac cgtcatcacc gaaacgcgcg 3180
aggcagctgc ggtaaagctc atcagcgtgg tcgtgaagcg attcacagat gtctgcctgt 3240

```

```

tcattccgct ccagctcggt gagtttctcc agaagcggtta atgtctggct tctgataaag 3300
cgggccatgt taagggcggt tttttctgt ttggctactg atgcctccgt gtaaggggga 3360
tttctgttca tgggggtaat gataccgatg aaacgagaga ggatgctcac gatacggggt 3420
actgatgatg aacatgcccg gttactggaa cgttgtgagg gtaaacaact ggcggtatgg 3480
atgcggcggg accagagaaa aatcactcag ggtcaatgcc agcgcttcgt taatacagat 3540
gtaggtgttc cacagggtag ccagcagcat cctgcgatgc agatccggaa cataatggtg 3600
cagggcgctg acttccgctg ttccagactt tacgaaacac ggaaaccgaa gaccattcat 3660
gttggtgctc aggtcgcaga cgttttgcag cagcagtcgc ttcacgttcg ctgcgctatc 3720
ggtgattcat tctgctaacc agtaaggcaa ccccgccagc ctagccgggt cctcaacgac 3780
aggagcacga tcatgcgcac ccgtggggcc gccatgccgg cgataatggc ctgcttctcg 3840
ccgaaacgtt tgggtggcggg accagtgcag aaggcttgag cgagggcggt caagattccg 3900
aataccgcaa gcgacaggcc gatcatcgtc gcgctccagc gaaagcggtc ctgcgccgaa 3960
atgaccaga gcgctgccgg cactgtctct acgagttgca tgataaagaa gacagtcata 4020
agtgcggcga cgaatgtcat gcccgcgcgc caccggaagg agctgactgg gttgaaggct 4080
ctcaagggca tcggtcgaga tcccgggtcc taatgagtga gctaacttac attaatgctg 4140
ttgcgctcac tgcccgttt ccagtcggga aacctgtcgt gccagctgca ttaatgaatc 4200
ggccaacgcg cggggagagg cggtttgct attgggcgcg aggggtggtt ttcttttcac 4260
cagtgcagcg ggcaacagct gattgccctt caccgcctgg cctgagaga gttgcagcaa 4320
gcggtccacg ctggtttgct ccagcaggcg aaaatcctgt ttgatggtgg ttaacggcg 4380
gatataacat gagctgtctt cggatcgct gtatccact accgagatat ccgcaccaac 4440
gcgcagcccg gactcggtaa tggcgcgcgt tgcgccagc gccatctgat cgttggcaac 4500
cagcatcgca gtgggaacga tgccctcatt cagcatttgc atgggttgtt gaaaaccgga 4560
catggcactc cagtcgcctt cccgttccgc tatcggtgca atttgattgc gagtgcagata 4620
tttatgccag ccagccagac gcagacgcgc cgagacagaa cttaatgggc ccgctaacag 4680
cgcgatttgc tggtgacca atgcgaccag atgctccacg cccagtcgcg tacctgtctt 4740
atgggagaaa ataatactgt tgatgggtgt ctggtcagag acatcaagaa ataacgccgg 4800
aacattagtg caggcagctt ccacagcaat ggcactcctg tcatccagcg gatagttaat 4860
gatcagccca ctgacgcgtt gcgcgagaag attgtgcacc gccgctttac aggttcgac 4920
gccgcttcgt tctaccatcg acaccaccac gctggcacc agttgatcgg cgcgagattt 4980
aatcgccgcy acaatttgcy acggcgcggt cagggccaga ctggaggtgg caacgccaat 5040
cagcaacgac tgtttgccc cagttgttg tgcacgcgg ttgggaatgt aattcagctc 5100
cgccatcgcc gcttccactt tttccgcgt tttcgagaa acgtggctgg cctggttcac 5160
cacgcgggaa acggtctgat aagagacacc ggcatactct gcgacatcgt ataacgttac 5220
tggtttcaca ttcaccacc tgaattgact ctcttcggg cgctatcatg ccataccgcy 5280
aaaggttttg cgccattcga tgggtgcgg gatctcgacg ctctccctta tgcgactcct 5340
gcattagga gacgcccagt agtaggttga ggcggttgag caccgccgc gcaaggaatg 5400
gtgcatgcaa ggagatggcg cccaacagtc cccgggccac ggggcctgcc accataccca 5460
cgccgaaaca agcgtcatg agcccgaagt ggcgagcccg atcttcccca tcggtgatgt 5520
cgcgatata ggcgccagca accgcacctg tggcgccggg gatgccggcc acgatgcgtc 5580
cgcgtagag gatcgagatc tcgatccgc gaaattaata cgactcata taggggaatt 5640
gtgagcggat aacaattccc ctctagaaat aattttgttt aactttaaga aggagatata 5700

```

<210> 19

<211> 119

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> TUONG TỰ

<222> (114) .. (119)

<223> nhãn histidin

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: protein tái tổ hợp chứa miền III của protein vỏ từ virus gây bệnh sốt xuất huyết typ 1

<300>

<400> 19

Met Asp Lys Leu Gln Leu Lys Gly Met Ser Tyr Ser Met Cys Thr Gly  
1 5 10 15

Lys Phe Lys Ile Val Lys Glu Ile Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Ile  
                     20                    25                    30  
 Val Ile Arg Val Gln Tyr Glu Gly Asp Gly Ser Pro Cys Lys Ile Pro  
                     35                    40                    45  
 Phe Glu Ile Met Asp Leu Glu Lys Arg His Val Leu Gly Arg Leu Ile  
                     50                    55                    60  
 Thr Val Asn Pro Ile Val Thr Glu Lys Asp Ser Pro Val Asn Ile Glu  
                     65                    70                    75                    80  
 Ala Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Ile Ile Gly Val Glu Pro  
                     85                    90                    95  
 Gly Gln Leu Lys Leu Asn Trp Phe Lys Lys Gly Ser Ser Ile Gly Leu  
                     100                    105                    110  
 Glu His His His His His His  
                     115

<210> 20

<211> 119

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> VỊ TRÍ

<222> (114)..(119)

<223> nhãn histidin

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: protein tái tổ hợp chứa miền III của protein vỏ từ virus gây bệnh sốt xuất huyết typ 2

<400> 20

Met Asp Lys Leu Thr Leu Lys Gly Met Ser Tyr Val Met Cys Thr Gly  
   1                    5                    10                    15

Ser Phe Lys Leu Glu Lys Glu Val Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Val  
                     20                    25                    30

Leu Val Gln Val Lys Tyr Glu Gly Thr Asp Ala Pro Cys Lys Ile Pro  
                     35                    40                    45

Phe Ser Thr Gln Asp Glu Lys Gly Val Thr Gln Asn Gly Arg Leu Ile  
                     50                    55                    60

Thr Ala Asn Pro Ile Val Thr Asp Lys Glu Lys Pro Val Asn Ile Glu  
                     65                    70                    75                    80

Thr Glu Pro Pro Phe Gly Glu Ser Tyr Ile Val Val Gly Ala Gly Glu  
                     85                    90                    95

Lys Ala Leu Lys Leu Ser Trp Phe Lys Lys Gly Ser Ser Ile Gly Leu  
                     100                    105                    110

Glu His His His His His His  
                     115

<210> 21  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <221> VỊ TRÍ  
 <222> (114)..(119)  
 <223> nhãn histidin

<220>  
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: protein tái tổ hợp chứa miền III của protein vỏ từ virus gây bệnh sốt xuất huyết typ 3

<400> 21  
 Met Asp Lys Leu Glu Leu Lys Gly Met Ser Tyr Ala Met Cys Thr Asn  
           1                  5                  10                  15  
 Thr Phe Val Leu Lys Lys Glu Val Ser Glu Thr Gln His Gly Thr Ile  
                   20                  25                  30  
 Leu Ile Lys Val Glu Tyr Lys Gly Glu Asp Val Pro Cys Lys Ile Pro  
           35                  40                  45  
 Phe Ser Thr Glu Asp Gly Gln Gly Lys Ala His Asn Gly Arg Leu Ile  
           50                  55                  60  
 Thr Ala Asn Pro Val Val Thr Lys Lys Glu Glu Pro Val Asn Ile Glu  
           65                  70                  75                  80  
 Ala Glu Pro Pro Phe Gly Glu Ser Asn Ile Val Ile Gly Ile Gly Asp  
                   85                  90                  95  
 Asn Ala Leu Lys Ile Asn Trp Tyr Lys Lys Gly Ser Ser Ile Gly Leu  
           100                  105                  110  
 Glu His His His His His His  
           115

<210> 22  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <221> VỊ TRÍ  
 <222> (114)..(119)  
 <223> nhãn histidin

<220>  
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: protein tái tổ hợp chứa miền III của protein vỏ từ virus gây bệnh sốt xuất huyết typ 4

<400> 22  
 Met Glu Lys Leu Arg Ile Lys Gly Met Ser Tyr Thr Met Cys Ser Gly  
           1                  5                  10                  15  
 Lys Phe Ser Ile Asp Lys Glu Met Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Thr  
           20                  25                  30

Val Val Lys Val Lys Tyr Glu Gly Ala Gly Ala Pro Cys Lys Val Pro  
                   35                                  40                                  45  
 Ile Glu Ile Arg Asp Val Asn Lys Glu Lys Val Val Gly Arg Ile Ile  
           50                                  55                                  60  
 Ser Ser Thr Pro Leu Ala Glu Asn Thr Asn Ser Val Thr Asn Ile Glu  
       65                                  70                                  75                                  80  
 Leu Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Val Ile Gly Val Gly Asn  
                                   85                                  90                                  95  
 Ser Ala Leu Thr Leu His Trp Phe Arg Lys Gly Ser Ser Ile Gly Leu  
                   100                                  105                                  110  
 Glu His His His His His His  
           115  
  
 <210> 23  
 <211> 617  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <223> nhóm II of LRP1 của người  
  
 <400> 23  
 Arg Pro Pro Ile Phe Glu Ile Arg Met Tyr Asp Ala Gln Gln Gln Gln  
   1                                  5                                  10                                  15  
 Val Gly Thr Asn Lys Cys Arg Val Asn Asn Gly Gly Cys Ser Ser Leu  
                   20                                  25                                  30  
 Cys Leu Ala Thr Pro Gly Ser Arg Gln Cys Ala Cys Ala Glu Asp Gln  
           35                                  40                                  45  
 Val Leu Asp Ala Asp Gly Val Thr Cys Leu Ala Asn Pro Ser Tyr Val  
       50                                  55                                  60  
 Pro Pro Pro Gln Cys Gln Pro Gly Glu Phe Ala Cys Ala Asn Ser Arg  
       65                                  70                                  75                                  80  
 Cys Ile Gln Glu Arg Trp Lys Cys Asp Gly Asp Asn Asp Cys Leu Asp  
                                   85                                  90                                  95  
 Asn Ser Asp Glu Ala Pro Ala Leu Cys His Gln His Thr Cys Pro Ser  
           100                                  105                                  110  
 Asp Arg Phe Lys Cys Glu Asn Asn Arg Cys Ile Pro Asn Arg Trp Leu  
           115                                  120                                  125  
 Cys Asp Gly Asp Asn Asp Cys Gly Asn Ser Glu Asp Glu Ser Asn Ala  
       130                                  135                                  140  
 Thr Cys Ser Ala Arg Thr Cys Pro Pro Asn Gln Phe Ser Cys Ala Ser  
       145                                  150                                  155                                  160  
 Gly Arg Cys Ile Pro Ile Ser Trp Thr Cys Asp Leu Asp Asp Asp Cys  
                   165                                  170                                  175  
 Gly Asp Arg Ser Asp Glu Ser Ala Ser Cys Ala Tyr Pro Thr Cys Phe  
           180                                  185                                  190

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Pro | Leu | Thr | Gln | Phe | Thr | Cys | Asn | Asn | Gly | Arg | Cys | Ile | Asn | Ile | Asn | 195 | 200 | 205 |     |
| Trp | Arg | Cys | Asp | Asn | Asp | Asn | Asp | Cys | Gly | Asp | Asn | Ser | Asp | Glu | Ala | 210 | 215 | 220 |     |
| Gly | Cys | Ser | His | Ser | Cys | Ser | Ser | Thr | Gln | Phe | Lys | Cys | Asn | Ser | Gly | 225 | 230 | 235 | 240 |
| Arg | Cys | Ile | Pro | Glu | His | Trp | Thr | Cys | Asp | Gly | Asp | Asn | Asp | Cys | Gly | 245 | 250 | 255 |     |
| Asp | Tyr | Ser | Asp | Glu | Thr | His | Ala | Asn | Cys | Thr | Asn | Gln | Ala | Thr | Arg | 260 | 265 | 270 |     |
| Pro | Pro | Gly | Gly | Cys | His | Thr | Asp | Glu | Phe | Gln | Cys | Arg | Leu | Asp | Gly | 275 | 280 | 285 |     |
| Leu | Cys | Ile | Pro | Leu | Arg | Trp | Arg | Cys | Asp | Gly | Asp | Thr | Asp | Cys | Met | 290 | 295 | 300 |     |
| Asp | Ser | Ser | Asp | Glu | Lys | Ser | Cys | Glu | Gly | Val | Thr | His | Val | Cys | Asp | 305 | 310 | 315 | 320 |
| Pro | Ser | Val | Lys | Phe | Gly | Cys | Lys | Asp | Ser | Ala | Arg | Cys | Ile | Ser | Lys | 325 | 330 | 335 |     |
| Ala | Trp | Val | Cys | Asp | Gly | Asp | Asn | Asp | Cys | Glu | Asp | Asn | Ser | Asp | Glu | 340 | 345 | 350 |     |
| Glu | Asn | Cys | Glu | Ser | Leu | Ala | Cys | Arg | Pro | Pro | Ser | His | Pro | Cys | Ala | 355 | 360 | 365 |     |
| Asn | Asn | Thr | Ser | Val | Cys | Leu | Pro | Pro | Asp | Lys | Leu | Ile | Glu | Gly | Arg | 370 | 375 | 380 |     |
| Met | Asp | Pro | Lys | Ser | Cys | Asp | Lys | Thr | His | Thr | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | 385 | 390 | 395 | 400 |
| Ala | Pro | Glu | Leu | Leu | Gly | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | 405 | 410 | 415 |     |
| Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | 420 | 425 | 430 |     |
| Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp | Pro | Glu | Val | Lys | Phe | Asn | Trp | Tyr | 435 | 440 | 445 |     |
| Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | 450 | 455 | 460 |     |
| Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | Val | Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val | Leu | His | 465 | 470 | 475 | 480 |
| Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys | Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys | 485 | 490 | 495 |     |
| Ala | Leu | Pro | Ala | Pro | Ile | Glu | Lys | Thr | Ile | Ser | Lys | Ala | Lys | Gly | Gln | 500 | 505 | 510 |     |
| Pro | Arg | Glu | Pro | Gln | Val | Tyr | Thr | Leu | Pro | Pro | Ser | Arg | Asp | Glu | Leu | 515 | 520 | 525 |     |

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
530 535 540

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
545 550 555 560

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
565 570 575

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val  
580 585 590

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
595 600 605

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
610 615

<210> 24

<211> 656

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> nhóm III of LRP1 của người

<400> 24

Ser Ser Cys Arg Ala Gln Asp Glu Phe Glu Cys Ala Asn Gly Glu Cys  
1 5 10 15

Ile Asn Phe Ser Leu Thr Cys Asp Gly Val Pro His Cys Lys Asp Lys  
20 25 30

Ser Asp Glu Lys Pro Ser Tyr Cys Asn Ser Arg Arg Cys Lys Lys Thr  
35 40 45

Phe Arg Gln Cys Ser Asn Gly Arg Cys Val Ser Asn Met Leu Trp Cys  
50 55 60

Asn Gly Ala Asp Asp Cys Gly Asp Gly Ser Asp Glu Ile Pro Cys Asn  
65 70 75 80

Lys Thr Ala Cys Gly Val Gly Glu Phe Arg Cys Arg Asp Gly Thr Cys  
85 90 95

Ile Gly Asn Ser Ser Arg Cys Asn Gln Phe Val Asp Cys Glu Asp Ala  
100 105 110

Ser Asp Glu Met Asn Cys Ser Ala Thr Asp Cys Ser Ser Tyr Phe Arg  
115 120 125

Leu Gly Val Lys Gly Val Leu Phe Gln Pro Cys Glu Arg Thr Ser Leu  
130 135 140

Cys Tyr Ala Pro Ser Trp Val Cys Asp Gly Ala Asn Asp Cys Gly Asp  
145 150 155 160

Tyr Ser Asp Glu Arg Asp Cys Pro Gly Val Lys Arg Pro Arg Cys Pro  
165 170 175

Leu Asn Tyr Phe Ala Cys Pro Ser Gly Arg Cys Ile Pro Ser Trp Thr

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|
|     |     |     |     | 180 |     |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |  |  |  |  |
| Cys | Asp | Lys | Glu | Asp | Asp | Cys | Glu | His | Gly | Glu | Asp | Glu | Thr | His | Cys |  |  |  |  |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |  |  |  |  |
| Asn | Lys | Phe | Cys | Ser | Glu | Ala | Gln | Phe | Glu | Cys | Gln | Asn | His | Arg | Cys |  |  |  |  |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Ile | Ser | Lys | Gln | Trp | Leu | Cys | Asp | Gly | Ser | Asp | Asp | Cys | Gly | Asp | Gly |  |  |  |  |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |  |  |  |  |
| Ser | Asp | Glu | Ala | Ala | His | Cys | Glu | Gly | Lys | Thr | Cys | Gly | Pro | Ser | Ser |  |  |  |  |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |  |  |  |  |
| Phe | Ser | Cys | Pro | Gly | Thr | His | Val | Cys | Val | Pro | Glu | Arg | Trp | Leu | Cys |  |  |  |  |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |  |  |  |  |
| Asp | Gly | Asp | Lys | Asp | Cys | Ala | Asp | Gly | Ala | Asp | Glu | Ser | Ile | Ala | Ala |  |  |  |  |
|     | 275 |     |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |  |  |  |  |
| Gly | Cys | Leu | Tyr | Asn | Ser | Thr | Cys | Asp | Asp | Arg | Glu | Phe | Met | Cys | Gln |  |  |  |  |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Asn | Arg | Gln | Cys | Ile | Pro | Lys | His | Phe | Val | Cys | Asp | His | Asp | Arg | Asp |  |  |  |  |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |  |  |  |  |
| Cys | Ala | Asp | Gly | Ser | Asp | Glu | Ser | Pro | Glu | Cys | Glu | Tyr | Pro | Thr | Cys |  |  |  |  |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     | 335 |     |     |  |  |  |  |
| Gly | Pro | Ser | Glu | Phe | Arg | Cys | Ala | Asn | Gly | Arg | Cys | Leu | Ser | Ser | Arg |  |  |  |  |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |  |  |  |  |
| Gln | Trp | Glu | Cys | Asp | Gly | Glu | Asn | Asp | Cys | His | Asp | Gln | Ser | Asp | Glu |  |  |  |  |
|     | 355 |     |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |  |  |  |  |
| Ala | Pro | Lys | Asn | Pro | His | Cys | Thr | Ser | Gln | Glu | His | Lys | Cys | Asn | Ala |  |  |  |  |
|     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Ser | Ser | Gln | Phe | Leu | Cys | Ser | Ser | Gly | Arg | Cys | Val | Ala | Glu | Ala | Leu |  |  |  |  |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |  |  |  |  |
| Leu | Cys | Asn | Gly | Gln | Asp | Asp | Cys | Gly | Asp | Ser | Ser | Asp | Glu | Arg | Gly |  |  |  |  |
|     |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |     |  |  |  |  |
| Cys | His | Ile | Ile | Glu | Gly | Arg | Met | Asp | Pro | Lys | Ser | Cys | Asp | Lys | Thr |  |  |  |  |
|     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |     |     |  |  |  |  |
| His | Thr | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Leu | Leu | Gly | Gly | Pro | Ser |  |  |  |  |
|     |     | 435 |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |     |     |  |  |  |  |
| Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg |  |  |  |  |
|     | 450 |     |     |     |     | 455 |     |     |     |     | 460 |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp | Pro |  |  |  |  |
| 465 |     |     |     |     | 470 |     |     |     |     | 475 |     |     |     |     | 480 |  |  |  |  |
| Glu | Val | Lys | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | Ala |  |  |  |  |
|     |     |     |     | 485 |     |     |     |     | 490 |     |     |     | 495 |     |     |  |  |  |  |
| Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | Val | Val |  |  |  |  |
|     |     |     | 500 |     |     |     |     | 505 |     |     |     |     | 510 |     |     |  |  |  |  |
| Ser | Val | Leu | Thr | Val | Leu | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr |  |  |  |  |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|
| 515 | 520 | 525 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Lys | Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Ala | Leu | Pro | Ala | Pro | Ile | Glu | Lys | Thr |  |  |  |  |
| 530 |     |     |     |     |     | 535 |     |     |     |     | 540 |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Ile | Ser | Lys | Ala | Lys | Gly | Gln | Pro | Arg | Glu | Pro | Gln | Val | Tyr | Thr | Leu |  |  |  |  |
| 545 |     |     |     |     | 550 |     |     |     |     | 555 |     |     |     |     | 560 |  |  |  |  |
| Pro | Pro | Ser | Arg | Asp | Glu | Leu | Thr | Lys | Asn | Gln | Val | Ser | Leu | Thr | Cys |  |  |  |  |
|     |     |     |     | 565 |     |     |     |     | 570 |     |     |     |     | 575 |     |  |  |  |  |
| Leu | Val | Lys | Gly | Phe | Tyr | Pro | Ser | Asp | Ile | Ala | Val | Glu | Trp | Glu | Ser |  |  |  |  |
|     |     |     | 580 |     |     |     |     | 585 |     |     |     |     | 590 |     |     |  |  |  |  |
| Asn | Gly | Gln | Pro | Glu | Asn | Asn | Tyr | Lys | Thr | Thr | Pro | Pro | Val | Leu | Asp |  |  |  |  |
|     |     | 595 |     |     |     |     | 600 |     |     |     |     | 605 |     |     |     |  |  |  |  |
| Ser | Asp | Gly | Ser | Phe | Phe | Leu | Tyr | Ser | Lys | Leu | Thr | Val | Asp | Lys | Ser |  |  |  |  |
|     | 610 |     |     |     |     | 615 |     |     |     |     | 620 |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Arg | Trp | Gln | Gln | Gly | Asn | Val | Phe | Ser | Cys | Ser | Val | Met | His | Glu | Ala |  |  |  |  |
| 625 |     |     |     |     | 630 |     |     |     | 635 |     |     |     |     | 640 |     |  |  |  |  |
| Leu | His | Asn | His | Tyr | Thr | Gln | Lys | Ser | Leu | Ser | Leu | Ser | Pro | Gly | Lys |  |  |  |  |
|     |     |     |     | 645 |     |     |     |     | 650 |     |     |     |     | 655 |     |  |  |  |  |

<210> 25  
 <211> 685  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <223> nhóm IV of LRP1 của người  
  
 <400> 25

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Asn | Cys | Thr | Ala | Ser | Gln | Phe | Val | Cys | Lys | Asn | Asp | Lys | Cys | Ile |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Pro | Phe | Trp | Trp | Lys | Cys | Asp | Thr | Glu | Asp | Asp | Cys | Gly | Asp | His | Ser |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Asp | Glu | Pro | Pro | Asp | Cys | Pro | Glu | Phe | Lys | Cys | Arg | Pro | Gly | Gln | Phe |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Gln | Cys | Ser | Thr | Gly | Ile | Cys | Thr | Asn | Pro | Ala | Phe | Ile | Cys | Asp | Gly |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     | 60  |     |     |     |     |     |
| Asp | Asn | Asp | Cys | Gln | Asp | Asn | Ser | Asp | Glu | Ala | Asn | Cys | Asp | Ile | His |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |     |
| Val | Cys | Leu | Pro | Ser | Gln | Phe | Lys | Cys | Thr | Asn | Thr | Asn | Arg | Cys | Ile |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Pro | Gly | Ile | Phe | Arg | Cys | Asn | Gly | Gln | Asp | Asn | Cys | Gly | Asp | Gly | Glu |
|     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |     |
| Asp | Glu | Arg | Asp | Cys | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Ala | Pro | Asn | Gln | Phe | Gln |
|     | 115 |     |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| Cys | Ser | Ile | Thr | Lys | Arg | Cys | Ile | Pro | Arg | Val | Trp | Val | Cys | Asp | Arg |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Asn | Asp | Cys | Val | Asp | Gly | Ser | Asp | Glu | Pro | Ala | Asn | Cys | Thr | Gln | 145 | 150 | 155 | 160 |
| Met | Thr | Cys | Gly | Val | Asp | Glu | Phe | Arg | Cys | Lys | Asp | Ser | Gly | Arg | Cys | 165 | 170 | 175 |     |
| Ile | Pro | Ala | Arg | Trp | Lys | Cys | Asp | Gly | Glu | Asp | Asp | Cys | Gly | Asp | Gly | 180 | 185 | 190 |     |
| Ser | Asp | Glu | Pro | Lys | Glu | Glu | Cys | Asp | Glu | Arg | Thr | Cys | Glu | Pro | Tyr | 195 | 200 | 205 |     |
| Gln | Phe | Arg | Cys | Lys | Asn | Asn | Arg | Cys | Val | Pro | Gly | Arg | Trp | Gln | Cys | 210 | 215 | 220 |     |
| Asp | Tyr | Asp | Asn | Asp | Cys | Gly | Asp | Asn | Ser | Asp | Glu | Glu | Ser | Cys | Thr | 225 | 230 | 235 | 240 |
| Pro | Arg | Pro | Cys | Ser | Glu | Ser | Glu | Phe | Ser | Cys | Ala | Asn | Gly | Arg | Cys | 245 | 250 | 255 |     |
| Ile | Ala | Gly | Arg | Trp | Lys | Cys | Asp | Gly | Asp | His | Asp | Cys | Ala | Asp | Gly | 260 | 265 | 270 |     |
| Ser | Asp | Glu | Lys | Asp | Cys | Thr | Pro | Arg | Cys | Asp | Met | Asp | Gln | Phe | Gln | 275 | 280 | 285 |     |
| Cys | Lys | Ser | Gly | His | Cys | Ile | Pro | Leu | Arg | Trp | Arg | Cys | Asp | Ala | Asp | 290 | 295 | 300 |     |
| Ala | Asp | Cys | Met | Asp | Gly | Ser | Asp | Glu | Glu | Ala | Cys | Gly | Thr | Gly | Val | 305 | 310 | 315 | 320 |
| Arg | Thr | Cys | Pro | Leu | Asp | Glu | Phe | Gln | Cys | Asn | Asn | Thr | Leu | Cys | Lys | 325 | 330 | 335 |     |
| Pro | Leu | Ala | Trp | Lys | Cys | Asp | Gly | Glu | Asp | Asp | Cys | Gly | Asp | Asn | Ser | 340 | 345 | 350 |     |
| Asp | Glu | Asn | Pro | Glu | Glu | Cys | Ala | Arg | Phe | Val | Cys | Pro | Pro | Asn | Arg | 355 | 360 | 365 |     |
| Pro | Phe | Arg | Cys | Lys | Asn | Asp | Arg | Val | Cys | Leu | Trp | Ile | Gly | Arg | Gln | 370 | 375 | 380 |     |
| Cys | Asp | Gly | Thr | Asp | Asn | Cys | Gly | Asp | Gly | Thr | Asp | Glu | Glu | Asp | Cys | 385 | 390 | 395 | 400 |
| Glu | Pro | Pro | Thr | Ala | His | Thr | Thr | His | Cys | Lys | Asp | Lys | Lys | Glu | Phe | 405 | 410 | 415 |     |
| Leu | Cys | Arg | Asn | Gln | Arg | Cys | Leu | Ser | Ser | Ser | Leu | Arg | Cys | Asn | Met | 420 | 425 | 430 |     |
| Phe | Asp | Asp | Cys | Gly | Asp | Gly | Ser | Asp | Glu | Glu | Asp | Cys | Ser | Ile | Asp | 435 | 440 | 445 |     |
| Ile | Glu | Gly | Arg | Met | Asp | Pro | Lys | Ser | Cys | Asp | Lys | Thr | His | Thr | Cys | 450 | 455 | 460 |     |
| Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Leu | Leu | Gly | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Leu | 465 | 470 | 475 | 480 |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | 485 | 490 | 495 |
| Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp | Pro | Glu | Val | Lys | 500 | 505 | 510 |
| Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys | Thr | Lys | 515 | 520 | 525 |
| Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | Val | Val | Ser | Val | Leu | 530 | 535 | 540 |
| Thr | Val | Leu | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys | Cys | Lys | 545 | 550 | 555 |
| Val | Ser | Asn | Lys | Ala | Leu | Pro | Ala | Pro | Ile | Glu | Lys | Thr | Ile | Ser | Lys | 565 | 570 | 575 |
| Ala | Lys | Gly | Gln | Pro | Arg | Glu | Pro | Gln | Val | Tyr | Thr | Leu | Pro | Pro | Ser | 580 | 585 | 590 |
| Arg | Asp | Glu | Leu | Thr | Lys | Asn | Gln | Val | Ser | Leu | Thr | Cys | Leu | Val | Lys | 595 | 600 | 605 |
| Gly | Phe | Tyr | Pro | Ser | Asp | Ile | Ala | Val | Glu | Trp | Glu | Ser | Asn | Gly | Gln | 610 | 615 | 620 |
| Pro | Glu | Asn | Asn | Tyr | Lys | Thr | Thr | Pro | Pro | Val | Leu | Asp | Ser | Asp | Gly | 625 | 630 | 635 |
| Ser | Phe | Phe | Leu | Tyr | Ser | Lys | Leu | Thr | Val | Asp | Lys | Ser | Arg | Trp | Gln | 645 | 650 | 655 |
| Gln | Gly | Asn | Val | Phe | Ser | Cys | Ser | Val | Met | His | Glu | Ala | Leu | His | Asn | 660 | 665 | 670 |
| His | Tyr | Thr | Gln | Lys | Ser | Leu | Ser | Leu | Ser | Pro | Gly | Lys |     |     |     | 675 | 680 | 685 |

Fig. 1

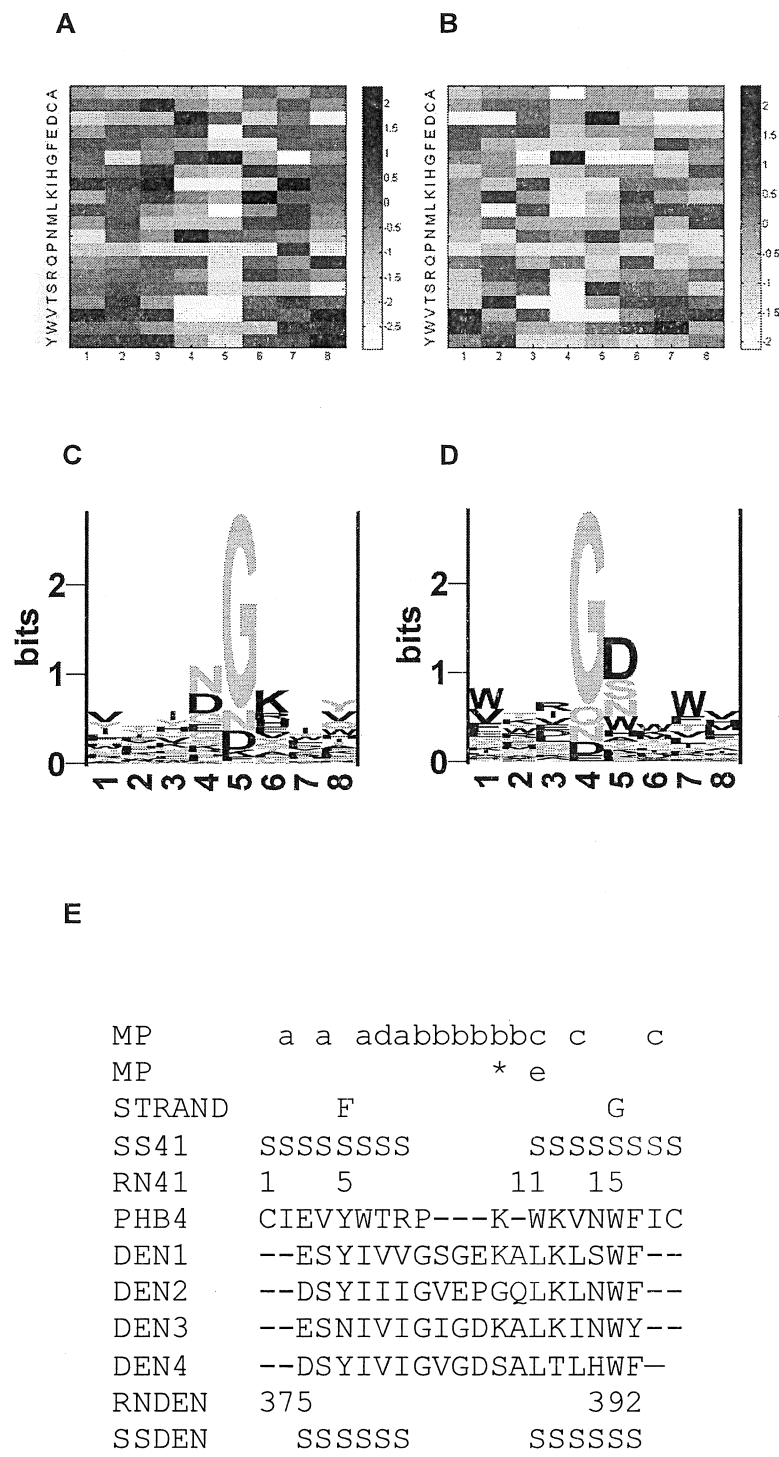


Fig. 2

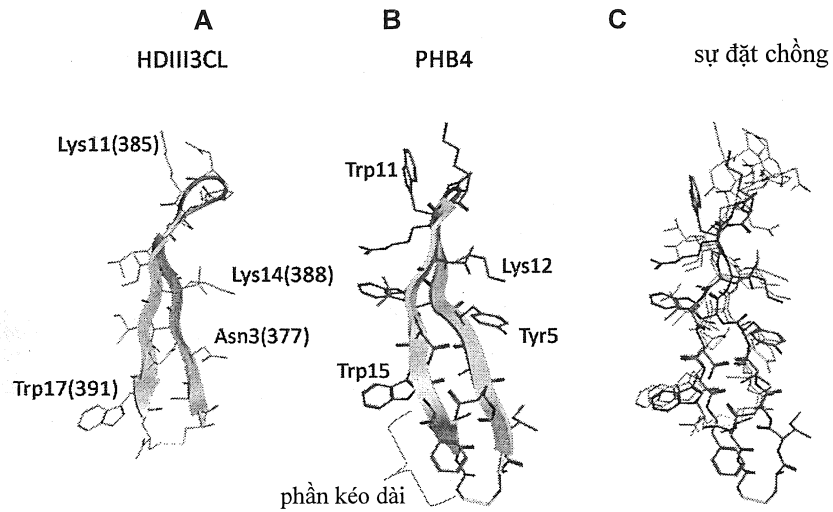


Fig. 3

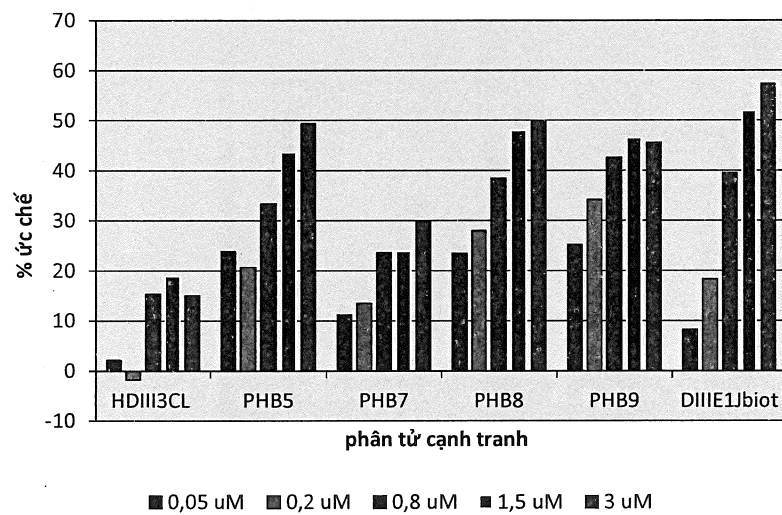


Fig. 4

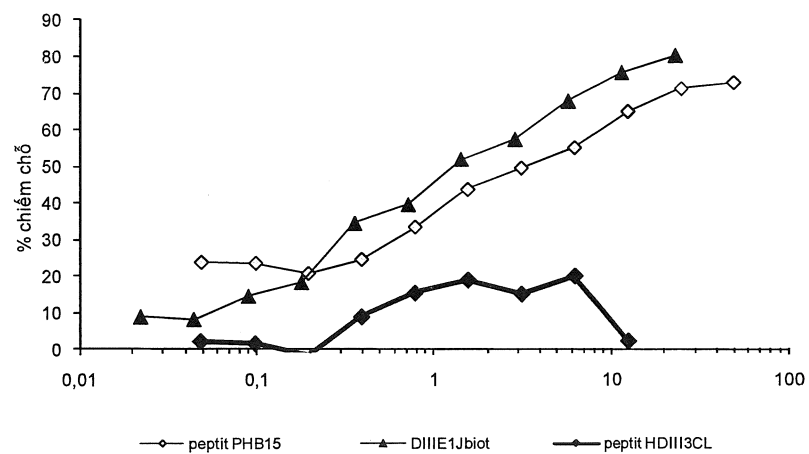


Fig. 5

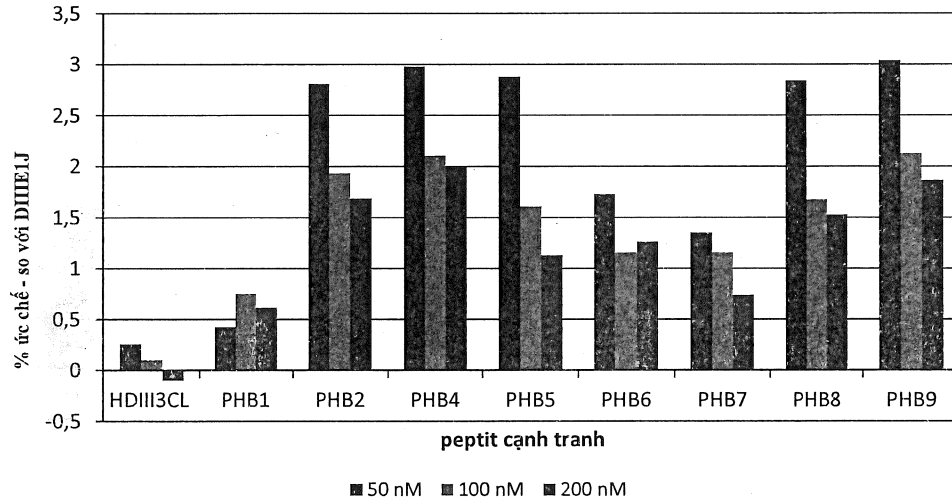


Fig. 6

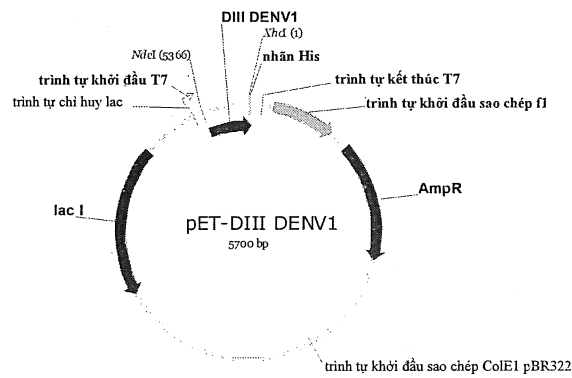
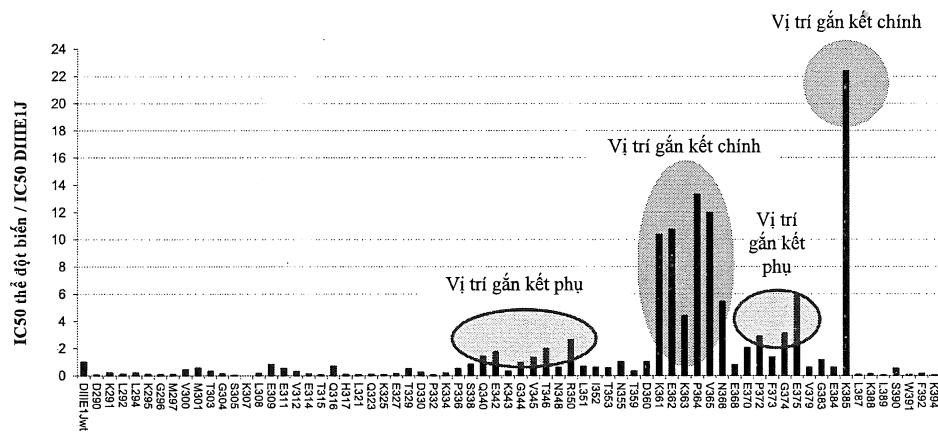
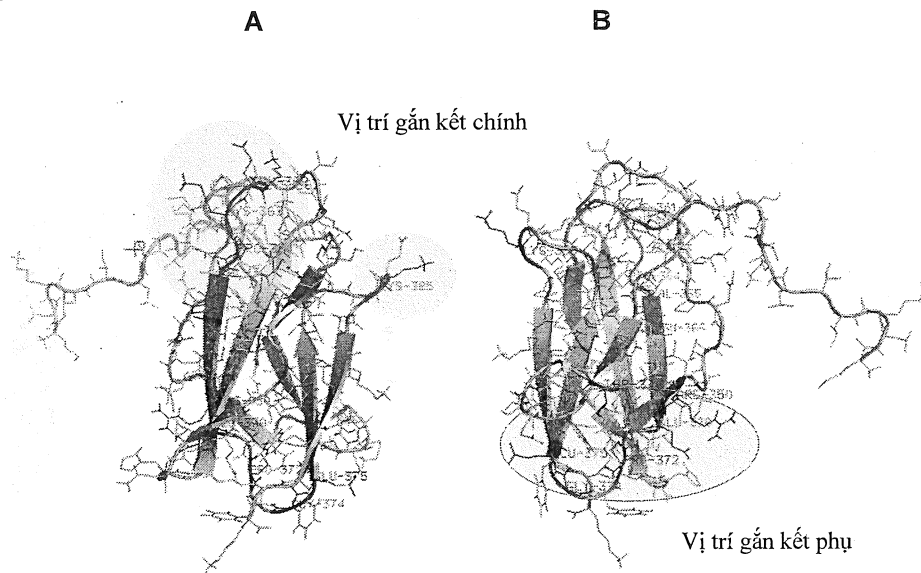


Fig. 7



**Fig. 8**



**Fig. 9**

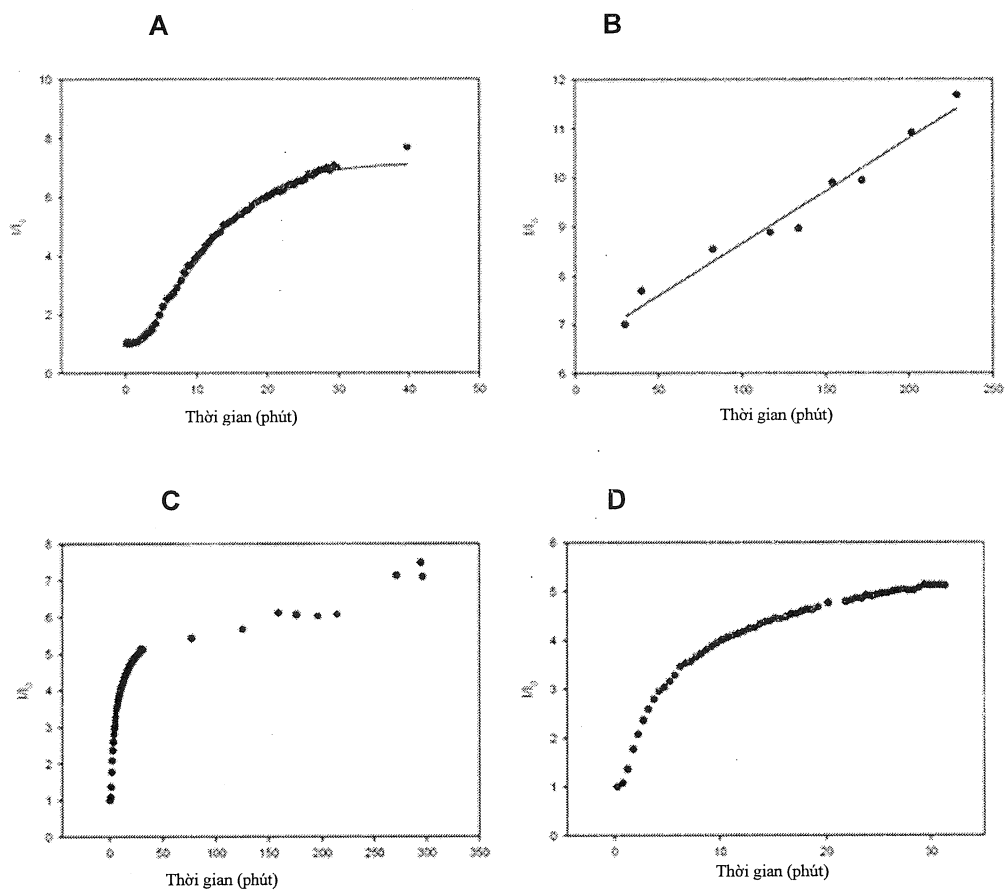


Fig. 10

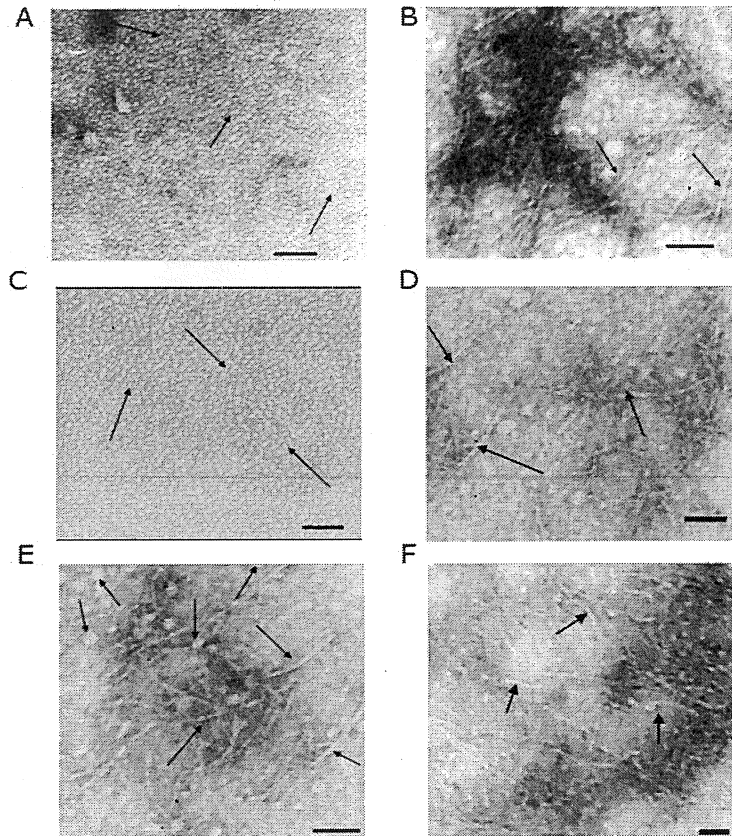


Fig. 11

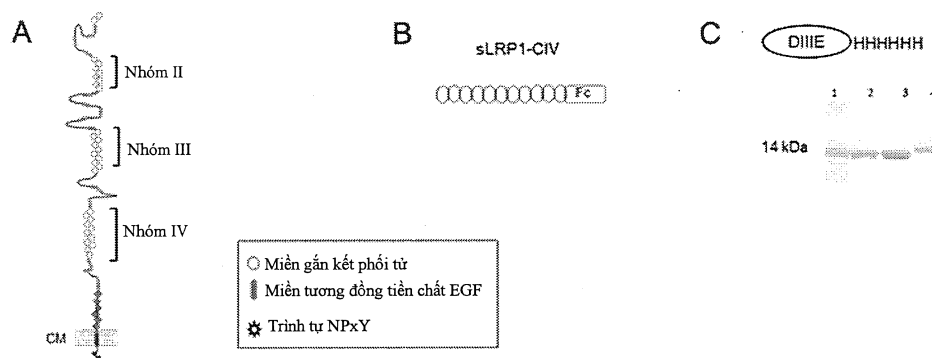


Fig. 12

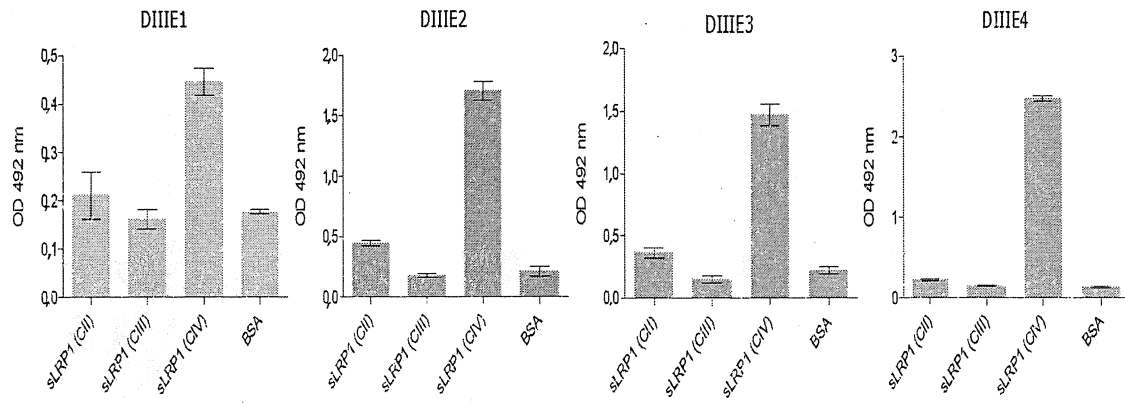


Fig. 13

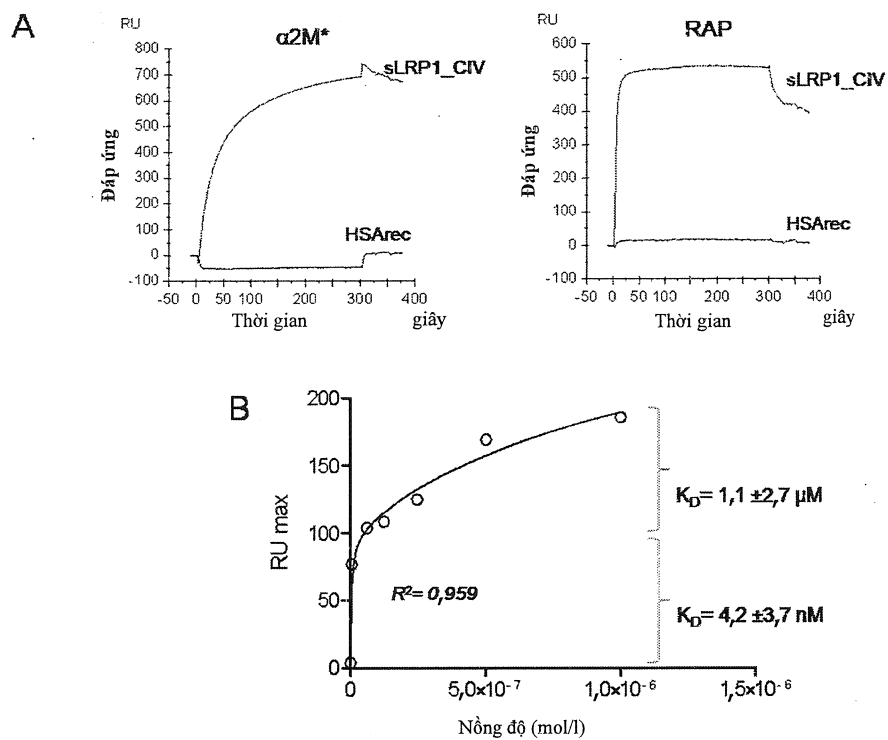


Fig. 14

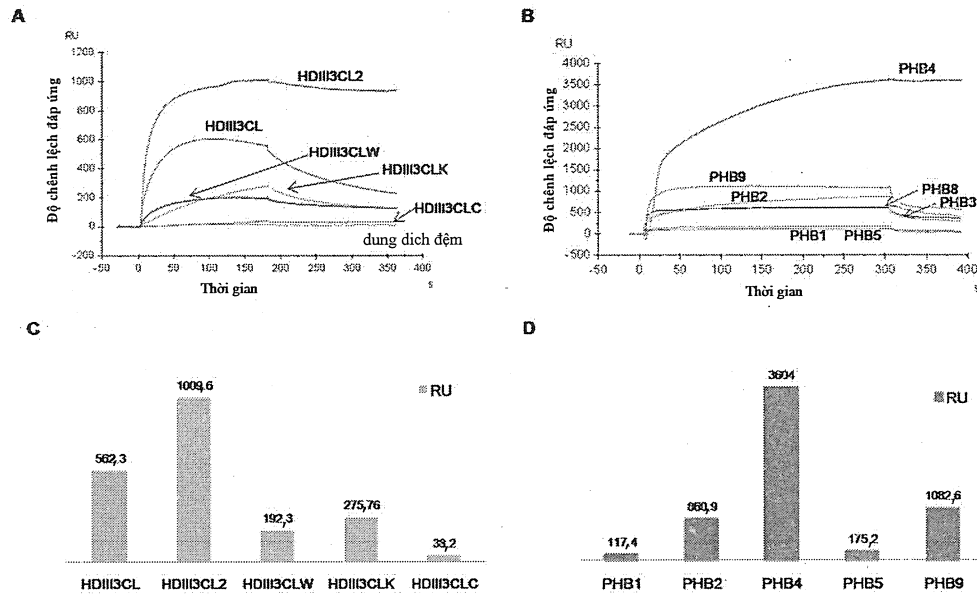


Fig. 15

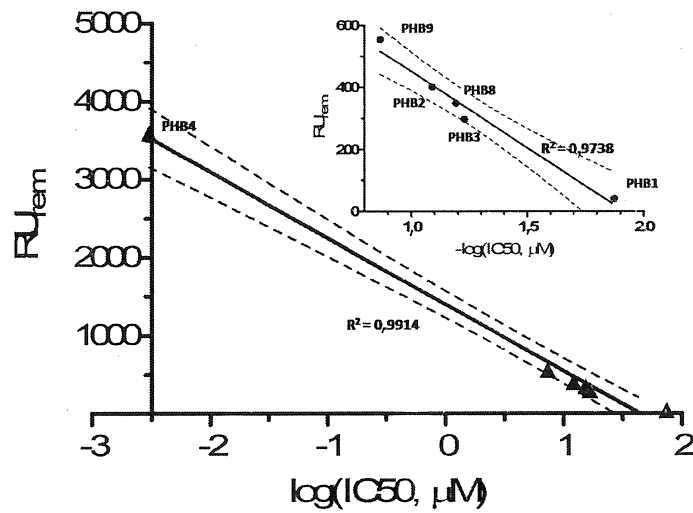


Fig. 16

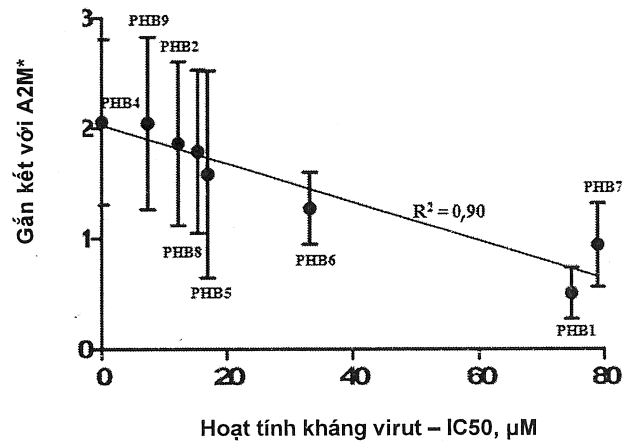


Fig. 17

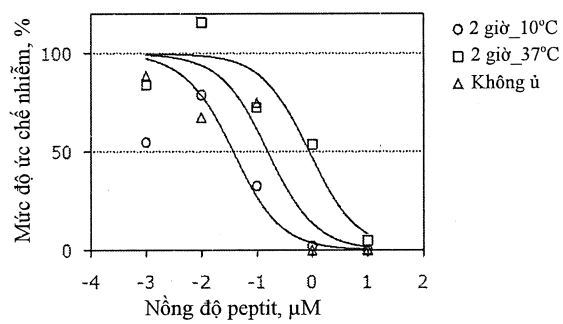


Fig. 18

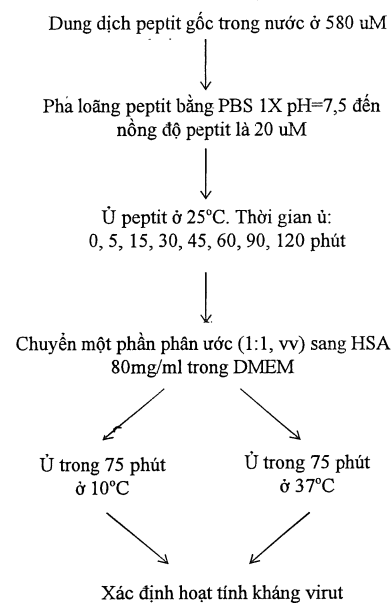


Fig. 19

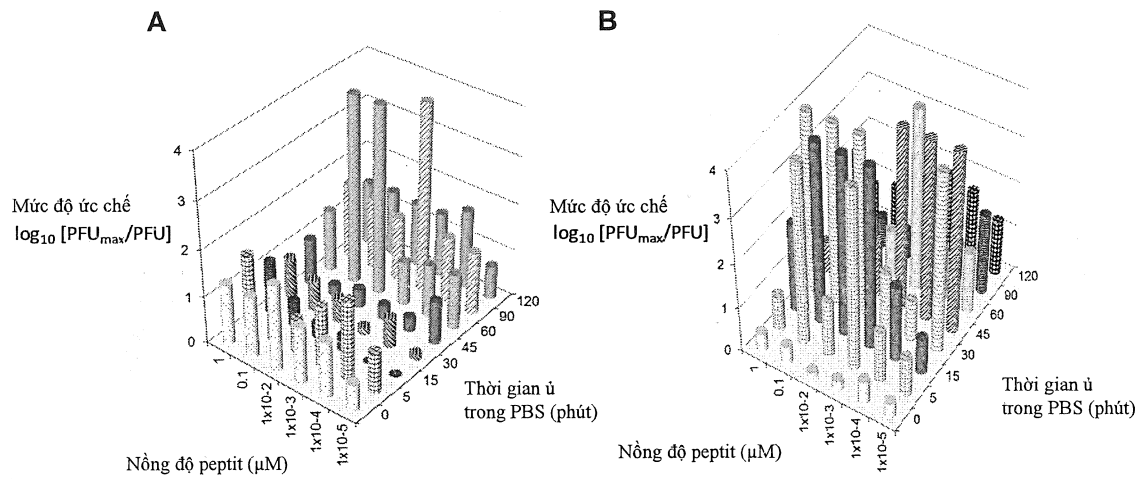


Fig. 20

Dung dịch peptit gốc trong nước ở 580  $\mu M$



Pha loãng peptit trong nước đến:

- 100  $\mu M$
- 50  $\mu M$
- 20  $\mu M$
- 2  $\mu M$



Ủ 2 giờ ở nhiệt độ 37°C



Xác định hoạt tính kháng virus

Fig. 21

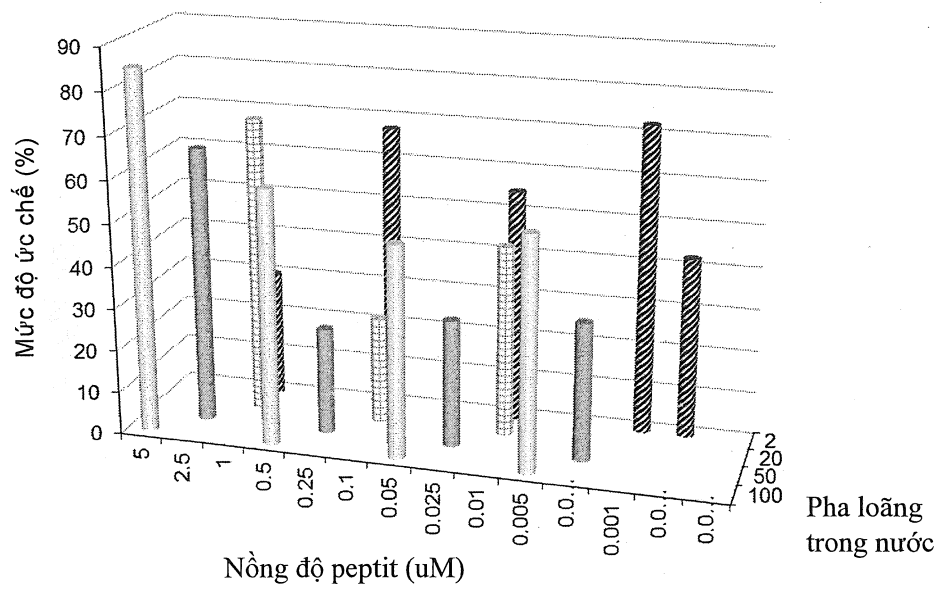


Fig. 22

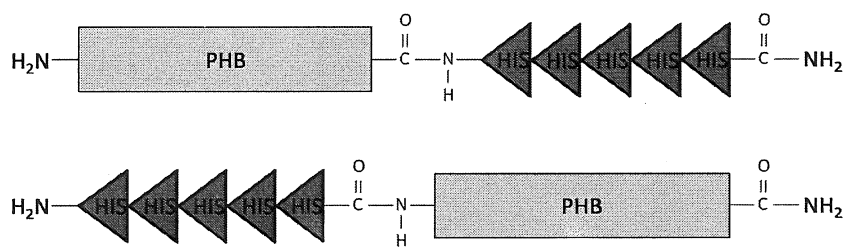


Fig. 23

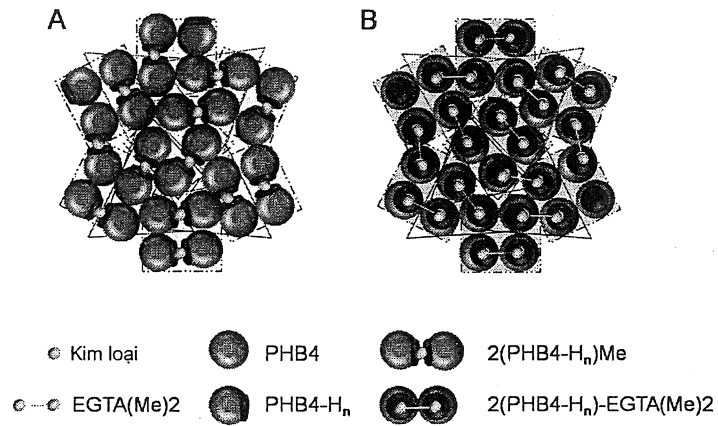
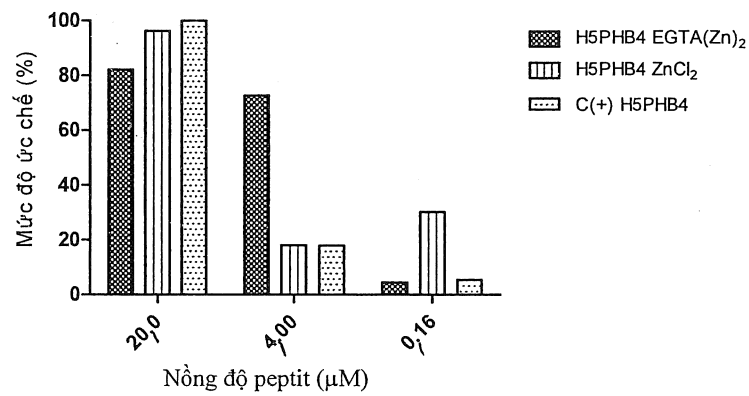


Fig. 24:

**A****B**