



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

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

(11)



1-0035441

(51)⁷ A61K 39/12; A61K 39/295

(13) B

(21) 1-2017-01226

(22) 21/08/2015

(86) PCT/IB2015/056352 21/08/2015

(87) WO 2016/034974 10/03/2016

(30) 2478/DEL/2014 01/09/2014 IN

(45) 25/04/2023 421

(43) 25/08/2017 353A

(73) INTERNATIONAL CENTRE FOR GENETIC ENGINEERING AND
BIOTECHNOLOGY (IN)

Aruna Asaf Ali Marg, New Delhi 110067, India

(72) KHANNA, Navin (IN); RAMASAMY, Viswanathan (IN).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) HẠT GIỐNG VIRUT VÀ VACXIN NGỪA BỆNH DENGUE THỂ TỬ TRỊ TÁI TỔ
HỢP CHỨA HẠT GIỐNG VIRUT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến hạt giống virat (VLP) bao gồm polypeptit tái tổ hợp bao gồm miền EDIII của mỗi kiểu huyết thanh trong số các kiểu huyết thanh DENV-1, DENV-2, DENV-3 và DENV-4 của virus gây bệnh dengue được liên kết với đầu tận N của HBsAg. Sáng chế cũng đề cập đến vacxin ngừa bệnh dengue thể tử trị chứa hạt giống virus này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến vaccin siêu phân tử dengue tái tổ hợp kháng cả bốn kiểu huyết thanh của virus gây bệnh dengue DENV-1, DENV-2, DENV-3 và DENV-4. Sáng chế cũng đề cập đến ứng viên vaccin thể tứ trị ngừa bệnh dengue trên cơ sở VLP tái tổ hợp bao gồm phân tử EDIII-T thể tứ trị và kháng nguyên bề mặt của virus viêm gan B (HBsAg). Sáng chế cũng đề cập đến quy trình sản xuất ứng viên vaccin thể tứ trị ngừa bệnh dengue trên cơ sở VLP (hạt giống virus) tái tổ hợp.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh dengue gây ra bởi bốn loại virus gây bệnh dengue (DENV) khác biệt về mặt kháng nguyên là mối lo ngại về sức khỏe nghiêm trọng ở trên 150 quốc gia trên thế giới và đặc biệt là quốc gia có tính đặc hữu cao như Ấn Độ. Bệnh này đã gia tăng trong thập kỷ qua và đã trở thành mối đe dọa cho sức khỏe cộng đồng toàn cầu do thiếu liệu pháp vaccin hoặc kháng virus hữu hiệu. Bệnh dengue là thử thách toàn cầu đối với hệ thống chăm sóc sức khỏe đặc biệt là khi dịch bùng phát, và hàng triệu đô la được chi mỗi năm để kiểm soát vật truyền. Vaccin hiệu quả và an toàn mà tiết kiệm chi phí sẽ giải quyết được gánh nặng mà virus gây bệnh dengue gây ra đối với các quốc gia bị ảnh hưởng. Mặc dù đã có những nỗ lực mạnh mẽ trong ba thập kỷ qua nhằm phát triển vaccin phòng bệnh để hạn chế sự lây lan của bệnh, đến nay vẫn chưa có vaccin được cấp phép nào trên thị trường. Các nhóm/công ty nghiên cứu trên thế giới vẫn đang nỗ lực phát triển vaccin thể tứ trị hữu hiệu kháng tất cả các kiểu huyết thanh của virus gây bệnh dengue. Trước đây hầu hết các vaccin đã phát triển được dựa trên virus sống, giảm độc lực, dạng khảm và một số trong đó hiện nay đang được thử nghiệm lâm sàng. Tuy nhiên, do các hạn chế như sự giao thoa virus, trọng tâm nghiên cứu đã chuyển sang vaccin siêu phân tử đặc biệt là sử dụng miền III của protein vỏ (E) của virus gây bệnh dengue. Nhiều bằng sáng chế/công bố đơn khai thác miền này cũng đã được báo cáo.

Mặc dù vaccin ngừa bệnh dengue dựa trên flavivirus sống đã bước vào thử nghiệm lâm sàng giai đoạn III, các vấn đề do sự giao thoa virus đã được báo cáo. Sự giao thoa virus phát sinh có thể là do sự khác biệt về tiềm năng sao chép và khả năng

sinh miễn dịch của bốn chủng virus vaccin.

Vaccin siêu phân tử không sao chép có tiềm năng khắc phục nguy cơ giao thoa virus liên quan đến vaccin virus sống [Swaminathan, Khanna, N. (2009), *Dengue: Recent advances in biology and current status of translational research*, *Current Mol. Med.* 9: 152-173]. Một vài phương pháp sử dụng vaccin siêu phân tử trên cơ sở protein và ADN tái tổ hợp đã được nghiên cứu. Phần lớn các vaccin siêu phân tử tái tổ hợp này tập trung vào protein vỏ (E) chính. Một số bằng chứng còn cho thấy nhiều đặc tính trong số các đặc tính vaccin của protein E có liên quan đến miền III (EDIII).

Miền III trên vỏ của DENV (EDIII) được cho thấy là chịu trách nhiệm về việc nhận diện thụ thể tế bào chủ và tạo ra kháng thể trung hòa [Swaminathan, Khanna, N. (2009). *Dengue: Recent advances in biology and current status of translational research*, *Current Mol. Med.* 9: 152-173; Guzman, M.G. Hermida, L., Bernardo, L., Ramirez, R., Guillen, G. (2010). *Domain II of the envelope protein as a dengue vaccine target*]. Ngoài ra, EDIII đã được báo cáo là chỉ có tiềm năng nội tại rất thấp trong việc cảm ứng kháng thể phản ứng chéo [Simmons, M., Nelson, W.M., Wu, S.J., Hayes, C.G. (1998). *Evaluation of the protective efficacy of a recombinant dengue envelope B domain fusion protein against dengue 2 virus infection in mice*; *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 58: 655-662; Simmons, M., Murphy, G.S., Hayes, C.G. (2001). *Short report: anti-body responses of mice immunized with a tetravalent dengue recombinant protein subunit vaccine*, *Am. Med. Hyg.* 65: 65: 159-161]. Các thuộc tính này khiến EDIII là ứng viên vaccin vượt trội. Hiệu lực của EDIII làm kháng nguyên vaccin ngừa bệnh dengue tiềm năng ở dạng protein thể tứ trị đã được các tác giả sáng chế xác lập [Etemad, B., Batra, G., Raut, R., Dahiya, S., Khanam, S., Swaminathan, S., Khanna, N.

Nhiều bằng sáng chế/công bố đơn khai thác miền III của protein vỏ (E) của virus gây bệnh dengue đã được báo cáo.

Suzarte, E., Gil, L., Valdés, I., Marcos, E., Lazo, L., Izquierdo, A., ... & Hermida, L. (2015), *International immunology*, dxv011 bộc lộ chế phẩm thể tứ trị mới kết hợp bốn protein miền III-capsit kết tụ từ virus gây bệnh dengue cảm ứng đáp ứng miễn dịch chức năng ở chuột nhắt và khỉ. Tài liệu này đề cập đến ứng viên vaccin kháng virus gây bệnh dengue dựa trên hai vùng khác nhau của virus, miền III của protein vỏ và protein capsit, trong đó chế phẩm thể tứ trị của protein DIIC được sử

dụng. Protein dạng khảm mới từ virus gây bệnh dengue-2 (miền III-capsit (DIIIC-2)), khi được đưa ra ở dạng kết tụ mà kết hợp oligodeoxynucleotit, thì cảm ứng kháng thể kháng virus và trung hòa, đáp ứng miễn dịch tế bào, và tạo sự bảo vệ đáng kể cho chuột nhắt và khỉ. Các cấu trúc còn lại đã thu được và được mô tả đặc điểm một cách thích hợp. Dựa trên các bằng chứng này, sáng chế nhằm đánh giá đáp ứng miễn dịch ở chuột nhắt của protein dạng khảm DIIIC của mỗi kiểu huyết thanh, là chế phẩm đơn trị và chế phẩm thể tứ trị. Các tác giả sáng chế đã chứng tỏ khả năng sinh miễn dịch của mỗi protein về tính miễn dịch thể dịch và qua trung gian tế bào, mà không có sự cạnh tranh kháng nguyên ở hỗn hợp tạo ra chế phẩm Tetra DIIIC. Theo đó có được sự bảo vệ đáng kể khi được đo bằng tải lượng virus giới hạn ở mô hình viêm não của chuột. Việc đánh giá chế phẩm thể tứ trị ở động vật linh trưởng không phải người cũng được thực hiện. Ở mô hình động vật này, đã chứng tỏ được rằng chế phẩm này cảm ứng kháng thể trung hòa và đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào nhớ với khả năng tiết IFN- γ và gây độc tế bào, không phụ thuộc vào con đường gây miễn dịch được sử dụng. Chế phẩm thể tứ trị của protein DIIIC cấu thành ứng viên vacxin hứa hẹn để kháng virus gây bệnh dengue.

Zuest, R., Valdes, I., Skibinski, D., Lin, Y., Toh, Y. X., Chan, K., ... (2015), Vaccine 33(12),1474-1482 bộc lộ khả năng sinh miễn dịch của chế phẩm thể tứ trị của protein dung hợp tái tổ hợp bao gồm miền III của protein E và protein capsit của các kiểu huyết thanh dengue từ 1 đến 4 (Tetra DIIIC) để tạo tính miễn dịch kháng virus gây bệnh dengue. Miền III của protein E là epitop cho kháng thể trung hòa hiệu quả trong khi protein capsit chứa epitop tế bào T. Ngoài việc kết hợp với epitop tế bào B và T, Tetra DIIIC tạo miễn dịch cao do dạng kết tụ của nó và tá được hai thành phần. Theo các nghiên cứu trước đây nhằm đánh giá chế phẩm DIIIC đơn trị, đã đề cập đến chất lượng và phạm vi của đáp ứng tế bào T và kháng thể của Tetra DIIIC ở chuột nhắt. Tetra DIIIC cảm ứng đáp ứng kiểu Th1 kháng cả bốn kiểu huyết thanh DENV và kháng thể đặc hiệu đối với bệnh dengue chủ yếu là IgG1 và IgG2a và trung hòa, trong khi việc cảm ứng kháng thể trung hòa phụ thuộc vào sự truyền tín hiệu IFN. Quan trọng là profin Th1 và IgG1/IgG2a của phương pháp vacxin DIIIC tương tự với đáp ứng chống bệnh dengue tự nhiên hiệu quả.

Izquierdo, A., García, A., Lazo, L., Gil, L., Marcos, E., Alvarez, M., & Guzmán, M. G. (2014), Archives of Virology, 159(10), 2597-2604 bộc lộ vacxin ngừa

bệnh dengue thể tứ trị chứa hỗn hợp của protein miền III-P64k và miền III-capsit cảm ứng đáp ứng bảo vệ ở chuột nhắt. Tài liệu này đề cập đến ứng viên vaccin chứa miền III của protein vỏ của virus gây bệnh dengue (typ 1, 3 và 4) được dung hợp với protein P64k từ *Neisseria meningitidis* và miền III của virus gây bệnh dengue typ 2 (D2) được phát hiện là tạo miễn dịch. Protein dung hợp tái tổ hợp chứa miền III của protein vỏ của virus gây bệnh dengue được dung hợp với protein P64k từ *Neisseria meningitidis* và miền III của virus gây bệnh dengue typ 2 (D2) được dung hợp với protein capsit của kiểu huyết thanh tạo miễn dịch và tạo ra sự bảo vệ ở chuột nhắt chống lại thử thách gây chết ở chuột nhắt được gây miễn dịch với chế phẩm thể tứ trị này được đánh giá.

Vaccin giảm độc lực sống (LAV), được coi là phương pháp hữu hiệu nhất đối với bệnh dengue, lại trái ngược với sự mong đợi này. Số liệu gần đây từ thử nghiệm đánh giá hiệu lực của ứng viên LAV tiên tiến nhất đã thể hiện hiệu lực tổng thể là 30%, không có hiệu lực với DENV-2. Kết quả này đòi hỏi phải nghiêm túc nghiên cứu các phương pháp thay thế để phát triển vaccin ngừa bệnh dengue. Ứng viên vaccin thể tứ trị ngừa bệnh dengue trên cơ sở VLP, “DSV⁴”, là VLP trên cơ sở HBsAg mà biểu lộ cả bốn EDIII tương ứng với bốn kiểu huyết thanh DENV đã phát triển.

Ban đầu, như được bộc lộ trong bằng độc quyền sáng chế Ấn Độ số 261749, protein miền III thể tứ trị (rTDIII), polypeptit dạng khảm đơn bao gồm miền III của cả bốn kiểu huyết thanh của virus gây bệnh dengue, là các kiểu huyết thanh 1, 2, 3 và 4 của virus gây bệnh dengue, được liên kết với nhau thông qua phần tử liên kết pentaglyxin, được tối ưu hóa codon để biểu hiện ở *E. coli*.

Một đơn xin cấp bằng độc quyền sáng chế Ấn Độ khác số 1259/DEL/2007 bộc lộ protein thể tứ trị trên cơ sở miền III vỏ tái tổ hợp có và không có peptit tín hiệu tiết gây ra đáp ứng miễn dịch bảo vệ đối với mỗi kiểu huyết thanh trong số bốn kiểu huyết thanh của virus gây bệnh dengue, DEN-1, DEN-2, DEN-3 và DEN-4, protein này được mã hóa bởi trình tự polynucleotit được tối ưu hóa codon để biểu hiện trong hệ biểu hiện sinh vật nhân chuẩn.

Khả năng của kháng nguyên bề mặt virus viêm gan B (HBsAg) để dùng làm nền tảng để trình diện và biểu lộ epitop ngoại lai được minh họa rõ ràng nhờ thành công của ứng viên vaccin sốt rét RTS,S. Để tăng khả năng sinh miễn dịch của EDIII-T, các tác giả sáng chế đã nghiên cứu xem HBsAg có thể dùng tốt để biểu lộ nó hay

không. Vì thế, EDIII-T được tách dòng để dung hợp với HBsAg và trên nền của bốn cat-xet biểu hiện của HBsAg trong vector *P. pastoris* (Fig.1A). Cấu trúc này của DSV⁴ tương tự với cấu trúc của RTS,S (Họ sáng chế: WO9310152 A1, MX9206574 A, EP0614465 A1, v.v.), mà biểu lộ epitop của virus sốt rét trên VLP HBsAg.

Tính mới của sáng chế nằm ở cấu trúc của EDIII-T với HBsAg và trên nền của bốn cat-xet biểu hiện của HBsAg trong vector. Vì thế, cấu trúc này của EDIII-T và HBsAg (được gọi là “DSV⁴”) có thể được coi là mới. Trình độ sáng tạo của sáng chế nằm ở sự dung hợp EDIII-T với HBsAg để gia tăng khả năng sinh miễn dịch của protein được biểu hiện bằng cách dùng làm nền tảng để trình diện và để protein HBsAg được biểu hiện đồng thời có thể kết hợp thành VLP. Miễn thể tứ trị tái tổ hợp (EDIII-T) được tách dòng để dung hợp với HBsAg và được biểu hiện đồng thời với HBsAg để tạo ra hạt giống virus (VLP) DSV⁴. Vaccin thể tứ trị siêu phân tử DSV⁴ tạo ra kháng thể trung hòa đặc hiệu kiểu huyết thanh DENV và có hiệu quả kháng mỗi kiểu huyết thanh trong số 4 kiểu huyết thanh của virus gây bệnh dengue.

Sáng chế đã và được dự kiến là có các ưu điểm sau đây so với các vaccin hiện có được đề xuất.

Vaccin giảm độc lực sống của Sanofi hiện đang trong thử nghiệm giai đoạn 3 cần ba lần gây miễn dịch trong lịch trình định liều kéo dài (0, 6 và 12) gồm 12 tháng để tạo ra đáp ứng kháng thể trung hòa cân bằng cho cả 4 kiểu huyết thanh, trong khi Glaxo Smith Kline (trong thử nghiệm giai đoạn 1) đang nhắm đến loại lịch trình định liều gồm 2 liều cách nhau 28 ngày và Takeda (thử nghiệm giai đoạn 2 đã hoàn thành) với phác đồ gây miễn dịch gồm hai liều cách nhau chỉ trong ba tháng. Vì thế, với số liệu sơ bộ, lịch trình gây miễn dịch của vaccin theo sáng chế sẽ ngắn hơn vaccin đang thử nghiệm của Sanofi. Ngoài ra, vaccin theo sáng chế chứa EDIII-T của cả 4 kiểu huyết thanh DENV và HBsAg là protein tái tổ hợp đơn, trong khi tất cả các ứng viên vaccin khác đang thử nghiệm bao gồm vaccin giảm độc lực sống của Sanofi là hỗn hợp của bốn ứng viên vaccin tương ứng với bốn kiểu huyết thanh.

Ngoài ra, sự dung hợp EDIII-T tái tổ hợp với HBsAg sẽ không chỉ dẫn đến sự tạo thành VLP và sự biểu hiện đồng thời của protein tạo miễn dịch tái tổ hợp và kháng nguyên bề mặt của virus viêm gan B mà còn có thể cung cấp sự bảo vệ/gây miễn dịch chống bệnh viêm gan B cùng với bệnh dengue. Điều này có thể dẫn đến việc phát triển

vacxin kép, cung cấp sự gây miễn dịch đồng thời kháng tất cả các kiểu huyết thanh của virus gây bệnh dengue cũng như virus viêm gan B.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích quan trọng của sáng chế là đề xuất vacxin siêu phân tử ngừa bệnh dengue kháng cả bốn kiểu huyết thanh DENV-1, DENV-2, DENV-3 và DENV-4.

Một mục đích khác của sáng chế là đề xuất ứng viên vacxin thể tứ trị ngừa bệnh dengue trên cơ sở VLP tái tổ hợp, DSV4.

Một mục đích khác của sáng chế là đề xuất ứng viên vacxin thể tứ trị ngừa bệnh dengue trên cơ sở VLP tái tổ hợp, DSV⁴, tạo ra kháng thể trung hòa đặc hiệu kiểu huyết thanh DENV kháng mỗi kiểu huyết thanh trong số 4 kiểu huyết thanh của virus gây bệnh dengue, DENV-1, DENV-2, DENV-3 và DENV-4.

Một mục đích khác của sáng chế là đề xuất quy trình sản xuất vacxin thể tứ trị ngừa bệnh dengue tiềm năng trên cơ sở VLP tái tổ hợp.

Một mục đích khác của sáng chế là mô tả phương pháp chủng ngừa hiệu quả và an toàn kháng cả bốn kiểu huyết thanh của virus gây bệnh dengue.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất polypeptit tái tổ hợp bao gồm miền EDIII của mỗi kiểu huyết thanh trong số các kiểu huyết thanh của virus gây bệnh dengue DENV-1, DENV-2, DENV-3 và DENV-4 được liên kết với đầu tận N của HBsAg.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất trình tự axit nucleic mã hóa protein tái tổ hợp bao gồm miền EDIII của kiểu huyết thanh của virus gây bệnh dengue DENV-1, DENV-2, DENV-3 và DENV-4 được liên kết với đầu tận N của HBsAg.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tế bào chủ được biến nạp hoặc được chuyển nhiễm với axit nucleic theo sáng chế, trong đó tế bào chủ này biểu hiện HBsAg.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hạt nano sinh học bao gồm polypeptit tái tổ hợp theo sáng chế.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra hạt nano sinh học chứa polypeptit tái tổ hợp theo sáng chế, bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ theo

sáng chế trong điều kiện thích hợp và thu hồi protein tái tổ hợp hoặc hạt nano sinh học được biểu hiện.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất vaccin chứa polypeptit tái tổ hợp theo sáng chế.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất vaccin bao gồm hạt nano sinh học theo sáng chế.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế mô tả phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa virus gây bệnh dengue, bao gồm bước cho đối tượng dùng polypeptit tái tổ hợp theo sáng chế, hạt nano sinh học theo sáng chế hoặc vaccin theo sáng chế.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế mô tả polypeptit tái tổ hợp theo sáng chế, hạt nano sinh học theo sáng chế hoặc vaccin của sáng chế để sử dụng trong điều trị hoặc ngăn ngừa virus gây bệnh dengue

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1: (A) Cấu trúc của DSV⁴: EDIII-T bao gồm bốn EDIII tương ứng với bốn DENV được liên kết qua phần tử liên kết hexaglyxyl được dung hợp di truyền với HBsAg (S) để mã hóa cho EDIII-T-HBsAg, được tách dòng trong vectơ mang bốn cat-xet biểu hiện của HBsAg. Plasmid tái tổ hợp được xử lý bằng Bgl II và được xung điện vào tế bào *P. pastoris* để thu được clon biểu hiện đồng thời EDIII-T-HBsAg và HBsAg.

(B) Cảm ứng bằng metanol: Sinh khối không được cảm ứng (U) và được cảm ứng (I) của clon đã chọn được chuẩn bị bằng cách cảm ứng bằng metanol và được phân tích về sự biểu hiện bằng cách nhuộm bạc và thẩm tách Western. Gel được nhuộm bạc thể hiện sự biểu hiện cả EDIII-T-HBsAg (~72kDa) và HBsAg (~25kDa) trong mẫu được cảm ứng. Việc thẩm tách Western với mAb đặc hiệu với EDIII phát hiện được EDIII-T-HBsAg, và với mAb đặc hiệu HBsAg thì phát hiện được cả EDIII-T-HBsAg và HBsAg.

(C) Tinh chế DSV⁴: Ba mẫu DSV⁴ được tinh chế từ sinh khối được cảm ứng.

Fig.2: (A) Sắc ký lọc gel của DSV⁴: DSV⁴ được rửa giải trong thể tích rỗng khi được thực hiện sắc ký lọc gel. Phân tích protein trong thể tích rỗng bằng cách nhuộm bạc biểu thị sự có mặt của cả EDIII-T-HBsAg và HBsAg.

(B) Siêu ly tâm CsCl: Dịch chuyển đồng thời EDIII-T-HBsAg và HBsAg bằng siêu ly tâm trên cột CsCl.

(C) Ảnh hiển vi điện tử của VLP DSV⁴: VLP DSV⁴ có kích thước 25-35 nm khi được quan sát bằng nhuộm âm bản dưới kính hiển vi điện tử.

Fig.3: (A) Nguồn của trình tự EDIII: Kiểu gen của mỗi kiểu huyết thanh DENV mà từ đó thu được trình tự aa EDIII tương ứng.

(B) Khả năng phản ứng ELISA của kháng huyết thanh DSV⁴: Khả năng phản ứng của kháng huyết thanh DSV⁴ cộng gộp kháng HBsAg, EDIII-1, EDIII-2, EDIII-3 và EDIII-4. Đường cong màu tím là khả năng phản ứng của huyết thanh không được gây miễn dịch kháng DSV⁴.

(C) DSV⁴ tạo ra hiệu giá trung hòa cân bằng: Hiệu giá trung hòa trên cơ sở FACS của kháng huyết thanh DSV⁴ kháng (các) kiểu gen cụ thể của mỗi kiểu huyết thanh.

(D) Phạm vi trung hòa kiểu gen với huyết thanh cộng gộp Fig.4: (a) trình tự axit amin của miền III vỏ của DENV-1 (SEQ ID NO:1) và axit nucleic mã hóa (SEQ ID NO:5);

(b) trình tự axit amin của miền III vỏ của DENV-2 (SEQ ID NO:2) và axit nucleic mã hóa (SEQ ID NO:6);

(c) trình tự axit amin của miền III vỏ của DENV-3 (SEQ ID NO:3) và axit nucleic mã hóa (SEQ ID NO:7);

(d) trình tự axit amin của miền III vỏ của DENV-4 (SEQ ID NO:4) và axit nucleic mã hóa (SEQ ID NO:8);

(e) trình tự axit amin của đầu tận N của HBsAg (SEQ ID NO:9) và axit nucleic mã hóa (SEQ ID NO:10);

(f) trình tự axit amin của polypeptit tái tổ hợp theo sáng chế bao gồm trình tự của EDIII từ DENV-1, 2, 3 và 4 được liên kết với đầu tận N của HBsAg (SEQ ID NO:11) và axit nucleic mã hóa (SEQ ID NO:12), trong đó các trình tự axit nucleic và axit amin được in nghiêng là các phần tử liên kết hexa-glyxin và các trình tự axit nucleic và axit amin được gạch chân thu được từ việc dịch mã vị trí giới hạn KpnI. EDIII được sắp xếp theo thứ tự từ đầu tận N- đến đầu tận C- DNV-1, DNV-3, DNV-4

và DENV-2.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến vaccin siêu phân tử ngừa bệnh dengue kháng cả bốn kiểu huyết thanh - kiểu huyết thanh của virus gây bệnh dengue DENV-1, DENV-2, DENV-3 và DENV-4. Vaccin siêu phân tử này bao gồm protein tái tổ hợp bao gồm EDIII-T thể tứ trị và HBsAg. Sáng chế cũng đề cập đến vaccin siêu phân tử bao gồm ứng viên vắc-xin thể tứ trị trên cơ sở VLP để phòng ngừa bệnh dengue kháng cả bốn kiểu huyết thanh DENV.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến trình tự axit nucleic mã hóa protein tái tổ hợp bao gồm miền EDIII của kiểu huyết thanh của virus gây bệnh dengue DENV-1, DENV-2, DENV-3 và DENV-4 được liên kết trong khung với đầu tận N của HBsAg. Các trình tự nucleotit mã hóa mỗi miền EDIII của kiểu huyết thanh của virus gây bệnh dengue DENV-1, DENV-2, DENV-3 và DENV-4 có thể được liên kết với đầu tận N của HBsAg theo thứ tự liên tiếp bất kỳ.

Tốt hơn nếu trình tự axit nucleic mã hóa các miền EDIII của mỗi kiểu huyết thanh trong số các kiểu huyết thanh của virus gây bệnh dengue DENV-1, DENV-2, DENV-3 và DENV-4, lần lượt có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1, 2, 3 và 4. Tốt hơn nếu trình tự axit nucleic mã hóa mỗi miền EDIII của kiểu huyết thanh của virus gây bệnh dengue DENV-1, DENV-2, DENV-3 và DENV-4 lần lượt là SEQ ID NO: 5, 6, 7 và 8.

Tốt hơn nếu trình tự axit nucleic mã hóa HBsAg có trình tự axit amin có SEQ ID NO:9. Tốt hơn nếu trình tự axit nucleic mã hóa HBsAg là SEQ ID NO:10.

Theo một phương án, trình tự axit nucleic bao gồm mỗi trình tự nucleotit trong số các trình tự nucleotit SEQ ID NO: 5, 6, 7 và 8 được liên kết trong khung với đầu tận N của SEQ ID NO: 10. Các trình tự nucleotit SEQ ID NO: 5, 6, 7 và 8 có thể được liên kết với đầu tận N của SEQ ID NO: 10 theo thứ tự liên tiếp bất kỳ.

Tốt hơn nếu trình tự axit nucleic mã hóa phần tử liên kết mà liên kết mỗi miền EDIII của các kiểu huyết thanh của virus gây bệnh dengue DENV-1, DENV-2, DENV-3 và DENV-4. Tốt hơn nếu axit nucleic mã hóa phần tử liên kết linh hoạt, tốt nhất là phần tử liên kết hexa-glyxin. Tốt hơn nếu trình tự axit nucleic mã hóa phần tử liên kết

mà liên kết miền EDIII của kiểu huyết thanh của virus gây bệnh dengue DENV-1, DENV-2, DENV-3 và DENV-4 với đầu tận N của HBsAg. Tốt hơn nếu axit nucleic mã hóa phần tử liên kết linh hoạt, tốt nhất là phần tử liên kết hexa-glyxin.

Tốt hơn nếu trình tự axit nucleic mã hóa polypeptit tái tổ hợp có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 11. Tốt hơn nếu trình tự axit nucleic mã hóa polypeptit tái tổ hợp là trình tự axit nucleic có SEQ ID NO:12.

Theo một phương án, trình tự axit nucleic được tối ưu hóa codon để biểu hiện ở nấm men, tốt hơn là để biểu hiện ở *P. pastoris*. Theo một phương án, axit nucleic là vector biểu hiện.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến tế bào chủ được biến nạp hoặc được chuyển nhiễm với axit nucleic theo sáng chế, trong đó tế bào chủ biểu hiện HBsAg. Theo một phương án, tế bào chủ được biến nạp hoặc được chuyển nhiễm với trình tự axit nucleic mã hóa HBsAg. Tốt hơn nếu tế bào chủ được biến nạp hoặc được chuyển nhiễm với 1, 2, 3, 4 trình tự axit nucleic biểu hiện HBsAg hoặc nhiều hơn. Theo một phương án, tế bào chủ là nấm men. Tốt nhất nếu tế bào chủ là *P. pastoris*.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến polypeptit tái tổ hợp bao gồm miền EDIII của mỗi kiểu huyết thanh trong số các kiểu huyết thanh của virus gây bệnh dengue DENV-1, DENV-2, DENV-3 và DENV-4 được liên kết với đầu tận N của HBsAg. Trình tự axit amin mã hóa mỗi miền EDIII của kiểu huyết thanh của virus gây bệnh dengue DENV-1, DENV-2, DENV-3 và DENV-4 có thể được liên kết với đầu tận N của HBsAg theo thứ tự liên tiếp bất kỳ. Tốt hơn nếu miền EDIII của kiểu huyết thanh của virus gây bệnh dengue DENV-1, DENV-2, DENV-3 và DENV-4 được dung hợp liên tiếp, từ đầu tận N đến đầu tận C, theo trình tự DENV-1, DENV-3, DENV-4 và DENV-2.

Tốt hơn nếu trình tự axit amin của miền EDIII của mỗi kiểu huyết thanh trong số các kiểu huyết thanh của virus gây bệnh dengue DENV-1, DENV-2, DENV-3 và DENV-4 là SEQ ID NO: 1, 2, 3 và 4. Tốt hơn nếu đầu tận N của HBsAg có trình tự polypeptit có SEQ ID NO: 9. Tốt hơn nếu polypeptit tái tổ hợp bao gồm mỗi trình tự trong số các trình tự axit amin SEQ ID NO: 1, 2, 3 và 4 được liên kết với đầu tận N của SEQ ID NO:9. Các trình tự axit amin SEQ ID NO: 1, 2, 3 và 4 có thể được liên kết với đầu tận N của SEQ ID NO: 9 theo thứ tự liên tiếp bất kỳ. Tốt hơn nếu polypeptit

tái tổ hợp bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:1, 2, 3, và 4 liên tiếp, từ đầu tận N đến đầu tận C, theo trình tự SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 và SEQ ID NO:2.

Tốt hơn nếu các miền EDIII của mỗi kiểu huyết thanh trong số các kiểu huyết thanh của virus gây bệnh dengue DENV-1, DENV-2, DENV-3 và DENV-4 được liên kết bằng phần tử liên kết, tốt hơn là phần tử liên kết linh hoạt, tốt nhất là phần tử liên kết hexa-glyxin. Tốt hơn nếu miền EDIII được liên kết với đầu tận N của HBsAg bằng phần tử liên kết, tốt hơn là phần tử liên kết linh hoạt, tốt nhất là phần tử liên kết hexa-glyxin.

Theo một khía cạnh, polypeptit tái tổ hợp có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 11.

Tế bào chủ được biến nạp hoặc được chuyển nhiễm theo sáng chế tổng hợp cả HBsAg và polypeptit tái tổ hợp theo sáng chế. Các tác giả sáng chế đã thể hiện rằng hai polypeptit này kết hợp đồng thời theo cách tự phát thành hạt nano sinh học. Theo một khía cạnh, sáng chế bao gồm hạt nano sinh học chứa HBsAg và polypeptit tái tổ hợp theo sáng chế.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra protein tái tổ hợp hoặc hạt nano sinh học bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ theo sáng chế trong điều kiện thích hợp và thu hồi protein tái tổ hợp hoặc hạt nano sinh học được biểu hiện.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến vacxin bao gồm polypeptit tái tổ hợp hoặc hạt nano sinh học theo sáng chế. Tốt hơn nếu vacxin bao gồm polypeptit tái tổ hợp hoặc hạt nano sinh học theo sáng chế trong chất mang được dụng hoặc chất pha loãng thích hợp.

Theo một khía cạnh, sáng chế mô tả phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa virus gây bệnh dengue, bao gồm bước cho đối tượng dùng protein tái tổ hợp, hạt nano sinh học hoặc vacxin theo sáng chế. Theo một phương án, virus gây bệnh dengue là kiểu huyết thanh DENV-1, DENV-2, DENV-3 hoặc DENV-4.

Phần tử trên cơ sở EDIII thể tứ trị, EDIII-T, được phát triển, được thiết kế để chứa cả bốn EDIII được liên kết với nhau qua phần tử liên kết glyxyl linh hoạt như được mô tả trên Fig. 1A. EDIII-T được biểu hiện ở *Pichia pastoris*, được tinh chế và

được phát hiện là gây miễn dịch ở chuột nhắt. Cấu trúc của phân tử EDIII-T được đưa ra trong bằng độc quyền sáng chế Ấn Độ số 261749.

Khả năng của kháng nguyên bề mặt của virus viêm gan B (HBsAg) dùng làm nền tảng để trình diện và biểu lộ epitop ngoại lai được minh họa rõ ràng nhờ thành công của ứng viên vacxin sốt rét RTS,S trong đơn xin cấp bằng độc quyền sáng chế số WO 93/10152.

Sáng chế nghiên cứu các khả năng xem HBsAg có thể dùng để tăng khả năng sinh miễn dịch của EDIII-T hay không. Vì thế, EDIII-T được tách dòng để dung hợp với HBsAg và trên nền của bốn cat-xet biểu hiện của HBsAg trong vector *P. pastoris* như được mô tả trên Fig.1A. Cấu trúc này của EDIII-T và HBsAg được gọi là “DSV⁴” và tương tự với cấu trúc của RTS,S trong đơn xin cấp bằng độc quyền sáng chế số WO9310152 mà biểu lộ epitop của virus sốt rét trên VLP HBsAg.

Plasmid tái tổ hợp được xung điện trong *P. pastoris* và khuẩn lạc được sàng lọc về sự biểu hiện đồng thời protein EDIII-T-HBsAg và HBsAg bằng cách cảm ứng clon bằng metanol. Một trong số các clon dương tính biểu hiện đồng thời hai protein như được thể hiện trên Fig.1B, được chọn để nghiên cứu thêm. Sinh khối đã cảm ứng được phân giải và protein liên quan đến màng được chiết và được lọc áp lực (diafiltration) qua màng 300kDa. Bước này được thiết kế để cho phép làm giàu protein kích thước lớn xét rằng hai protein được biểu hiện đồng thời kết hợp thành VLP DSV⁴. Thành phần không được lọc qua màng được tinh chế qua nhựa phenyl 600M với độ tinh khiết cao như được mô tả trên Fig.1C.

Khả năng của protein được biểu hiện đồng thời có thể kết hợp thành VLP được đánh giá qua việc lọc gel như được thể hiện trên Fig.2A, siêu ly tâm CsCl như được thể hiện trên Fig.2B và phương pháp kính hiển vi điện tử như được thể hiện trên Fig.2C. Quan sát thấy rằng cả hai thành phần protein của DSV⁴ được rửa giải cùng nhau trong thể tích rộng trong quá trình lọc gel như được thể hiện trên Fig.2A và được dịch chuyển đồng thời trong quá trình siêu ly tâm CsCl như được thể hiện trên Fig.2B. Khi quan sát dưới kính hiển vi điện tử, chúng được thấy là kết hợp thành VLP có kích thước 25-35 nm như được thể hiện trên Fig.2C.

Tính toàn vẹn cấu hình riêng của EDIII của cả bốn DENV trong VLP DSV⁴ được đánh giá qua sự nhận diện epitop EDIII quan trọng bởi mAb đã xác định rõ đặc

điểm theo dạng ELISA kẹp.

Khả năng của các VLP này có thể gây ra đáp ứng miễn dịch mạnh kháng bốn kiểu huyết thanh DENV được đánh giá bằng cách gây miễn dịch ở chuột nhắt BALB/c như được thể hiện trên Fig.3. VLP DSV⁴ đã tinh chế được gây miễn dịch (20 μ g/500 μ g Al là alhydrogel/100 μ L trong PBS) trong màng bụng trong nhóm gồm sáu chuột nhắt BALB/c vào ngày 0, 30 và 90. Lượng máu lớn được lấy vào ngày 100 và được phân tích về đáp ứng đối với DSV⁴ bằng ELISA. Huyết thanh từ các đối tượng có đáp ứng dương tính được gộp lại và được mô tả đặc điểm về sự có mặt của kháng thể kháng cả năm thành phần của nó, cụ thể là EDIII-1, EDIII-2, EDIII-3, EDIII-4 và HBsAg (Fig.3B). Quan sát thấy rằng đáp ứng miễn dịch mạnh được tạo ra kháng toàn bộ các thành phần này. Quan trọng là phải xác định xem đáp ứng chống bệnh dengue có khả năng trung hòa bốn DENV hay không. Vì thế, huyết thanh cộng gộp được đánh giá về khả năng trung hòa của nó thông qua thử nghiệm trên cơ sở FACS và quan sát thấy rằng kháng huyết thanh DSV⁴ thực sự có khả năng trung hòa cả bốn DENV (Fig.3C). Fig.3A minh họa cấu trúc của DSV⁴ và chủng mà từ đó thu được trình tự aa EDIII tương ứng. Fig.3C minh họa hiệu giá trung hòa của kháng huyết thanh DSV⁴ kháng bốn DENV (của chủng cụ thể) và các chủng có hai kiểu gen bổ sung của DENV-3. Rõ ràng là các kiểu gen DENV-2, DENV-3 và DENV-4 được sử dụng trong thử nghiệm trung hòa khác với các kiểu gen mà từ đó có được trình tự EDIII, và nó không gây tác động bất lợi đến khả năng trung hòa của kháng huyết thanh DSV⁴, biểu thị mức độ mạnh của đáp ứng miễn dịch được tạo ra. Ngoài ra, đáp ứng tổng thể kháng các kiểu gen khác nhau cũng có vẻ cân bằng, làm nổi bật khả năng ứng viên của DSV⁴ làm vaccin ngừa bệnh dengue tiềm năng như được mô tả trên Fig.3D. DSV⁴ có vẻ có hiệu lực đến mức có thể so sánh được với các tá được khác nhau đã đánh giá (Fig.3D)

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế được mô tả có tham khảo các ví dụ sau đây, được bao gồm chỉ nhằm mục đích minh họa và làm rõ sáng chế. Các ví dụ cụ thể này không được hiểu là giới hạn phạm vi của sáng chế theo hình thức bất kỳ nào.

Ví dụ 1: Cấu trúc của ứng viên vaccin thể tứ trị ngừa bệnh dengue trên cơ sở VLP tái tổ hợp

EDIII-T được tách dòng để dung hợp với HBsAg và trên nền của bốn cat-xet

biểu hiện của HBsAg trong vectơ *P. pastoris* như được mô tả trên Fig.1A. Cấu trúc của EDIII-T và HBsAg được gọi là “DSV⁴”. Plasmid tái tổ hợp được xung điện trong *P. pastoris* và khuẩn lạc được sàng lọc về sự biểu hiện đồng thời protein EDIII-T-HBsAg và HBsAg bằng cách cảm ứng clon bằng metanol.

Ví dụ 2: Mô tả đặc điểm của ứng viên vacxin thể tứ trị ngừa bệnh dengue - DSV⁴

Một trong số các clon dương tính biểu hiện đồng thời hai protein như được thể hiện trên Fig.1B, được chọn để nghiên cứu thêm. Sinh khối đã cảm ứng được phân giải và protein liên quan đến màng được chiết và được lọc áp lực qua màng 300kDa. Bước này được thiết kế để cho phép làm giàu protein kích thước lớn xét rằng hai protein được biểu hiện đồng thời kết hợp thành VLP DSV⁴. Thành phần không được lọc qua màng được tinh chế qua nhựa phenyl 600M với độ tinh khiết cao như được mô tả trên Fig.1C.

Ví dụ 3: Nhận diện và mô tả đặc điểm của VLP

Khả năng của protein được biểu hiện đồng thời có thể kết hợp thành VLP được đánh giá qua việc lọc gel như được thể hiện trên Fig.2A, siêu ly tâm CsCl như được thể hiện trên Fig.2B và phương pháp kính hiển vi điện tử như được thể hiện trên Fig.2C. Quan sát thấy rằng cả hai thành phần protein của DSV⁴ được rửa giải cùng nhau trong thể tích rỗng trong quá trình lọc gel như được thể hiện trên Fig.2A và được dịch chuyển đồng thời trong quá trình siêu ly tâm CsCl như được thể hiện trên Fig.2B. Khi quan sát dưới kính hiển vi điện tử, chúng được thấy là kết hợp thành VLP có kích thước 25-35 nm như được thể hiện trên Fig.2C.

Ví dụ 4: Đánh giá tính toàn vẹn cấu trúc của cả bốn DENV trong VLP DSV⁴ bằng mAb (kháng thể đơn dòng)

Tính toàn vẹn cấu hình riêng của EDIII của cả bốn DENV trong VLP DSV⁴ được đánh giá qua sự nhận diện epitop EDIII quan trọng bởi mAb đã xác định rõ đặc điểm theo dạng ELISA kẹp. mAb đặc hiệu với bệnh dengue được phủ trong các lỗ vi hiệu giá và VLP DSV⁴ được bổ sung VLP đã liên kết được để lộ ra thông qua Hepnostika kháng HBsAg được đánh dấu peroxidaza. Hầu hết các mAb này kháng mạch A và vùng gờ bên của EDIII, được tin là thiết yếu cho việc tạo ra đáp ứng miễn dịch trung hòa mạnh. Khả năng phản ứng ELISA của DSV⁴ bởi 21 mAb dengue (mAb đặc hiệu với EDIII và thành phần khác EDIII) được minh họa trong Bảng 1 và kết quả

biểu thị rằng các epitop EDIII của cả bốn DENV còn nguyên vẹn trong VLP DSV⁴.

Bảng 1: Danh sách các mAb đặc hiệu với EDIII, vùng được nhận diện bởi mAb này và khả năng phản ứng của mAb này với VLP “DSV⁴” (xét về OD ELISA)

mAb kháng EDIII	Trung hoà mạnh	Tính đặc hiệu vùng	OD ELISA
E103	DENV-1	Vòng L.R-BC	3,96
3H5	DENV-2	Vòng A .S và BC (L.R)	0,77
70		A .S	0,48
106		A .S	0,51
104		Mạch C/vòng CC'	0,52
8A1		Đầu tận LR-N của A .S, FG loop	1,30
E51 236	DENV-3	LR	1,84
E51 202		LR	3,90
E88	DENV-4	BC và vòng DE (L.R)	0,53
E76	DENV-4, -2	Đầu tận N A .S, vòng CC', mạch B, D và G	0,51
E106	DENV-1, -4	A.S và L.R	3,60
E113	DENV-1, -2, -4	L.R	1,20
h-2J20	DENV-1, -3		2,50
E61	DENV-1, -2, -3, -4	A.S và mạch G	0,71
E77		A.S, vòng BC và mạch G	0,81

mAb không EDIII	Typ Ab	Tính đặc hiệu vùng	OD ELISA
-2K2	Phức hợp	prM	0,06
4G2		Vòng dung hợp	0,05
h-1M7			0,06
h-DVC23.13			0,05
3H4			0,05
h-1N5			0,05

Ví dụ 5: Gây miễn dịch cho chuột bằng VLP DSV⁴ được tinh chế

Khả năng của các VLP này có thể gây ra đáp ứng miễn dịch mạnh kháng bốn kiểu huyết thanh DENV được đánh giá bằng cách gây miễn dịch ở chuột nhắt BALB/c như được thể hiện trên Fig.3. VLP DSV⁴ đã tinh chế được gây miễn dịch (20µg/500µg Al là alhydrogel/100µL trong PBS) trong màng bụng trong nhóm gồm sáu chuột nhắt BALB/c vào ngày 0, 30 và 90. Lượng máu lớn được lấy vào ngày 100 và được phân tích về đáp ứng đối với DSV⁴ bằng ELISA. Huyết thanh từ các đối tượng có đáp ứng dương tính được gộp lại và được mô tả đặc điểm về sự có mặt của kháng thể kháng cả năm thành phần của nó, cụ thể là EDIII-1, EDIII-2, EDIII-3, EDIII-4 và HbsAg như được mô tả trên Fig.3B và phạm vi trung hòa kiểu gen của kháng huyết thanh DSV⁴ được tạo ra với các tá được khác nhau còn được xác định như được mô tả trên Fig.3D.

Đáp ứng miễn dịch

Quan sát thấy rằng đáp ứng miễn dịch mạnh được tạo ra kháng cả năm thành phần, cụ thể là EDIII-1, EDIII-2, EDIII-3, EDIII-4 và HbsAg. Quan trọng là phải xác định xem đáp ứng chống bệnh dengue có khả năng trung hòa bốn DENV hay không. Vì thế, huyết thanh cộng gộp được đánh giá về khả năng trung hòa của nó thông qua thử nghiệm trên cơ sở FACS và quan sát thấy rằng kháng huyết thanh DSV⁴ thực sự có khả năng trung hòa cả bốn DENV như được thể hiện trên Fig.3C, hình vẽ này minh họa hiệu giá trung hòa của kháng huyết thanh DSV⁴ kháng bốn chủng tham chiếu WHO DENV và các chủng có hai kiểu gen bổ sung của DENV-3. Rõ ràng là các kiểu gen DENV-2, DENV-3 và DENV-4 được sử dụng trong thử nghiệm trung hòa khác với các kiểu gen mà từ đó có được trình tự EDIII, và nó không gây tác động bất lợi đến khả năng trung hòa của kháng huyết thanh DSV⁴, biểu thị mức độ mạnh của đáp ứng miễn dịch được tạo ra. Ngoài ra, đáp ứng tổng thể kháng các kiểu huyết thanh khác nhau cũng có vẻ cân bằng, làm nổi bật khả năng của DSV⁴ làm vaccin ngừa bệnh dengue tiềm năng. Bảng 2 dưới đây minh họa FNT sau khi dùng hết trên EDIII-3-MBP tạo ra Ab trung hòa đặc hiệu kiểu huyết thanh.

Bảng 2: FNT sau khi dùng hết trên EDIII-3-MBP tạo ra Ab trung hòa đặc hiệu kiểu huyết thanh

	Dùng hết huyết thanh	FNT ₅₀ - Vero			
		DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4
Huyết thanh 1: Dùng hết Ab DENV-3	MBP	714	678	2259	415
	EDIII-3-MBP	1276	581	288	449
Huyết thanh 2: Dùng hết Ab DENV-2	MBP	không xác định	775	1022	không xác định
	EDIII-2-MBP	không xác định	78	975	không xác định

Sáng chế cũng bao gồm các khía cạnh cụ thể sau đây:

Khía cạnh 1. Ứng viên vaccin thể tứ trị ngừa bệnh dengue trên cơ sở VLP tái tổ hợp bao gồm phân tử EDIII-T thể tứ trị và kháng nguyên bề mặt của virus viêm gan B (HbsAg).

Khía cạnh 2. Ứng viên vaccin thể tứ trị ngừa bệnh dengue trên cơ sở VLP tái tổ

hợp được gọi là DSV⁴.

Khía cạnh 3. Ứng viên vaccin thể tứ trị ngừa bệnh dengue trên cơ sở VLP tái tổ hợp, DSV⁴, trong đó phân tử EDIII thể tứ trị bao gồm EDIII của DENV-1, DENV-2, DENV-3 và DENV-4.

Khía cạnh 4. Ứng viên vaccin thể tứ trị ngừa bệnh dengue trên cơ sở VLP tái tổ hợp như được nêu trong khía cạnh 2 của sáng chế, trong đó DSV⁴ tạo ra kháng thể trung hòa đặc hiệu kiểu huyết thanh DENV kháng DENV-1, DENV-2, DENV-3 và DENV-4.

Khía cạnh 5. Quy trình sản xuất ứng viên vaccin thể tứ trị ngừa bệnh dengue trên cơ sở VLP tái tổ hợp theo khía cạnh 1 bao gồm các bước sau đây:

- i) tách dòng EDIII-T để dung hợp với HbsAg trong cấu trúc tái tổ hợp mang bốn cat-xet biểu hiện của HbsAg;
- ii) xung điện plasmit tái tổ hợp vào tế bào *Pichia pastoris* để thu được clon biểu hiện đồng thời EDIII-T-HbsAg và HbsAg;
- iii) sàng lọc để biểu hiện đồng thời protein EDIII-T-HbsAg và HbsAg;
- iv) phân tích sự biểu hiện protein EDIII-T-HbsAg và HbsAg bằng cách nhuộm bạc và thẩm tách Western;
- v) phân giải sinh khối được cảm ứng;
- vi) chiết protein liên quan đến màng và được lọc áp lực;
- vii) tinh chế DSV⁴.

Khía cạnh 6. Quy trình như được nêu trong khía cạnh 5, trong đó việc sàng lọc trong bước (iii) được thực hiện bằng cảm ứng clon bằng metanol.

Khía cạnh 7. Vaccin siêu phân tử ngừa bệnh dengue bao gồm ứng viên vaccin thể tứ trị ngừa bệnh dengue trên cơ sở VLP tái tổ hợp như được nêu trong khía cạnh 1.

Khía cạnh 8. Vaccin siêu phân tử ngừa bệnh dengue như được nêu trong khía cạnh 7, trong đó vaccin này có hoạt tính kháng các kiểu huyết thanh của virus gây bệnh dengue DENV-1, DENV-2, DENV-3 và DENV-4.

Khía cạnh 9. Vaccin siêu phân tử ngừa bệnh dengue như được nêu trong khía cạnh 8, trong đó vaccin này có thể được dùng trong màng bụng hoặc trong cơ.

Khía cạnh 10. Ứng viên vacxin thể tứ trị ngừa bệnh dengue trên cơ sở VLP tái tổ hợp để sử dụng làm ứng viên vacxin siêu phân tử ngừa bệnh dengue tiềm năng chứa phân tử EDIII-T thể tứ trị và kháng nguyên bề mặt của virus viêm gan B (HBsAg).

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hạt giống virus (VLP) bao gồm:

a) polypeptit tái tổ hợp bao gồm miền EDIII của mỗi kiểu huyết thanh của virus gây bệnh dengue trong số các kiểu huyết thanh DENV-1, DENV-2, DENV-3 và DENV-4, được liên kết với đầu tận N của polypeptit HbsAg, như được mô tả dưới đây:

EDIII-1---EDIII-3---EDIII-4---EDIII-2---HbsAg;

trong đó đường nét đứt là phân tử liên kết; và

trong đó trình tự axit amin của miền EDIII của mỗi kiểu huyết thanh của virus gây bệnh dengue trong số các kiểu huyết thanh DENV-1, DENV-2, DENV-3 và DENV-4 lần lượt là SEQ ID NO 1, 2, 3 và 4; và

b) 4 đơn vị của polypeptit HbsAg.

2. Trình tự axit nucleic mã hóa polypeptit tái tổ hợp như được đề cập ở điểm 1.

3. Hạt giống virus (VLP) theo điểm 1, trong đó polypeptit tái tổ hợp có trình tự axit amin theo SEQ ID NO 11.

4. Vacxin ngừa bệnh dengue thể tứ trị chứa hạt giống virus (VLP) bao gồm:

a) polypeptit tái tổ hợp bao gồm miền EDIII của mỗi kiểu huyết thanh của virus gây bệnh dengue trong số các kiểu huyết thanh DENV-1, DENV-2, DENV-3 và DENV-4, được liên kết với đầu tận N của polypeptit HbsAg, như được mô tả dưới đây:

EDIII-1---EDIII-3---EDIII-4---EDIII-2---HbsAg;

trong đó đường nét đứt là phân tử liên kết; và

trong đó trình tự axit amin của miền EDIII của mỗi kiểu huyết thanh của virus gây bệnh dengue trong số các kiểu huyết thanh DENV-1, DENV-2, DENV-3 và DENV-4 lần lượt là SEQ ID NO 1, 2, 3 và 4; và

b) 4 đơn vị của polypeptit HbsAg.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology
 <120> HẠT GIỐNG VIRUT VÀ VACCIN NGỪA BỆNH DENGUE THỂ TỬ TRỊ TÁI TỒ HỢP CHỨA
 HẠT GIỐNG VIRUT NÀY
 <130> ICG-006US
 <150> PCT/IB15/056352
 <151> 2015-08-21
 <150> IN 2478/DEL/2014
 <151> 2014-09-01
 <160> 12
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 104
 <212> PRT
 <213> Virut gây bệnh Dengue typ 1
 <400> 1

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

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

Thr Asp Ala Pro Cys Lys Ile Pro Phe Ser Ser Gln Asp Glu Lys Gly
 35 40 45

Val Thr Gln Asn Gly Arg Leu Ile Thr Ala Asn Pro Ile Val Thr Asp
 50 55 60

Lys Glu Lys Pro Val Asn Ile Glu Ala Glu Pro Pro Phe Gly Glu Ser
 65 70 75 80

Tyr Ile Val Val Gly Ala Gly Glu Lys Ala Leu Lys Leu Ser Trp Phe
 85 90 95

Lys Lys Gly Ser Ser Ile Gly Lys
 100

<210> 2
 <211> 104

<212> PRT

<213> Virut gây bệnh Dengue typ 2

<400> 2

Met Ser Tyr Ser Met Cys Thr Gly Lys Phe Lys Val Val Lys Glu Ile
 1 5 10 15

Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Ile Val Ile Arg Val Gln Tyr Glu Gly
 20 25 30

Asp Gly Ser Pro Cys Lys Thr Pro Phe Glu Ile Met Asp Leu Glu Lys
 35 40 45

Arg His Val Leu Gly Arg Leu Thr Thr Val Asn Pro Ile Val Thr Glu
 50 55 60

Lys Asp Ser Pro Val Asn Ile Glu Ala Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser
 65 70 75 80

Tyr Ile Ile Ile Gly Val Glu Pro Gly Gln Leu Lys Leu Asp Trp Phe
 85 90 95

Lys Lys Gly Ser Ser Ile Gly Gln
 100

<210> 3

<211> 104

<212> PRT

<213> Virut gây bệnh Dengue typ 3

<400> 3

Met Ser Tyr Ala Met Cys Leu Asn Thr Phe Val Leu Lys Lys Glu Val
 1 5 10 15

Ser Glu Thr Gln His Gly Thr Ile Leu Ile Lys Val Glu Tyr Lys Gly
 20 25 30

Glu Asp Ala Pro Cys Lys Ile Pro Phe Ser Thr Glu Asp Gly Gln Gly
 35 40 45

Lys Ala His Asn Gly Arg Leu Ile Thr Ala Asn Pro Val Val Thr Lys
 50 55 60

Lys Glu Glu Pro Val Asn Ile Glu Ala Glu Pro Pro Phe Gly Glu Ser

65

70

75

80

Asn Ile Val Ile Gly Ile Gly Asp Lys Ala Leu Lys Ile Asn Trp Tyr
 85 90 95

Arg Lys Gly Ser Ser Ile Gly Lys
 100

<210> 4
 <211> 103
 <212> PRT
 <213> Virut gây bệnh Dengue typ 4

<400> 4

Met Ser Tyr Thr Met Cys Ser Gly Lys Phe Ser Ile Asp Lys Glu Met
 1 5 10 15

Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Thr Val Val Lys Val Lys Tyr Glu Gly
 20 25 30

Ala Gly Ala Pro Cys Lys Val Pro Ile Glu Ile Arg Asp Val Asn Lys
 35 40 45

Glu Lys Val Val Gly Arg Ile Ile Ser Pro Thr Pro Phe Ala Glu Asn
 50 55 60

Thr Asn Ser Val Thr Asn Ile Glu Leu Glu Arg Pro Leu Asp Ser Tyr
 65 70 75 80

Ile Val Ile Gly Val Gly Asp Ser Ala Leu Thr Leu His Trp Phe Arg
 85 90 95

Lys Gly Ser Ser Ile Gly Lys
 100

<210> 5
 <211> 312
 <212> ADN
 <213> Virut gây bệnh Dengue typ 1

<400> 5
 atgtcttacg tcatgtgcac tggttctttc aaattggaga aggaggtagc tgaaactcaa 60
 catggcactg tcttagttca agttaagtac gaaggaacag atgccccatg caaaatcccc 120
 ttctcctccc aagatgaaaa ggggtgtcact caaaatggta gattgataac agctaacca 180

atcgttaccg acaaggagaa acccgtgaat atcgaggccg agcctccttt cggcgaaagt 240
 tacatagtag ttggagccgg agaaaaagca ctgaaattgt cttggttcaa aaagggttcc 300
 tctattggaa aa 312

<210> 6
 <211> 312
 <212> ADN
 <213> Virut gây bệnh Dengue typ 2

<400> 6
 atgagttact ccatgtgcac cgggaaattc aaagtagtta aagagattgc cgagactcag 60
 cacggtacaa tcgttattcg agtgcaatat gaaggatgatg gaagtccatg taagacccca 120
 tttgagataa tggacttgga aaagaggcac gttctaggga ggttgaccac tgttaacca 180
 attgtgacag agaaagattc tccagtgaat atcgaagctg aaccaccttt tgggtgattct 240
 tacatcatta tcggagttga acctggtcag cttaagttag attggttcaa gaagggtcc 300
 tcaataggtc ag 312

<210> 7
 <211> 312
 <212> ADN
 <213> Virut gây bệnh Dengue typ 3

<400> 7
 atgagttacg ccatgtgtct gaatacgttt gtgcttaaga aagaggtttc tgaaacgcaa 60
 cacggaacca ttcttatcaa ggtggaatac aagggtgagg acgctccatg caagatccca 120
 ttttctaccg aagatgggca gggtaaagct cataatggta gactgattac tgctaatacct 180
 gttgtaacaa agaaggaaga gccagtcaac atcgaggcag aacctccctt tggcgaatca 240
 aacatagtca tagggatagg tgacaaggca ctaaagatta actggtatcg taagggttca 300
 tctattggca ag 312

<210> 8
 <211> 309
 <212> ADN
 <213> Virut gây bệnh Dengue typ 4

<400> 8
 atgtcttata cgatgtgttc aggcaagttc tctattgaca aagagatggc tgaaacacaa 60
 catggtacaa ccgtcggtta agtaaagtat gaaggagctg gtgcaccctg taagggtgcct 120
 attgaaattc gagatgttaa caaagagaag gttgtcggga gaatcatttc ccctactcca 180

tttgctgaga atactaatc agtcactaac atagaactag aacgtccatt ggactcatac 240
 atcgtaattg gtgtgggaga ttcagcactt actttacact ggtttagaaa aggaagtagt 300
 attggtaaa 309

<210> 9
 <211> 226
 <212> PRT
 <213> Virut viêm gan B

<400> 9

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

Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu
 20 25 30

Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly Ser Pro Val Cys
 35 40 45

Leu Gly Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser Asn His Ser Pro Thr Ser
 50 55 60

Cys Pro Pro Ile Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe
 65 70 75 80

Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu Leu Val
 85 90 95

Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly
 100 105 110

Ser Thr Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Thr Pro Ala
 115 120 125

Gln Gly Asn Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Thr Asp
 130 135 140

Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Lys
 145 150 155 160

Tyr Leu Trp Glu Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu
 165 170 175

Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu
180 185 190

Ser Ala Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Ser Ile
195 200 205

Val Ser Pro Phe Ile Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe Cys Leu Trp Val
210 215 220

Tyr Ile
225

<210> 10
<211> 678
<212> ADN
<213> Virut viêm gan B

<400> 10
atggaaaaca tcacttccgg tttcttgggt cctttgttgg tcttgcaggc tggattcttc 60
ttgttgacta gaatcttgac tatccacag tctttggact cttggtggac ttccttgaac 120
ttcttgggtg gttccccagt ttgtttgggt caaaactccc aatctccaac ttctaaccac 180
tccccactt catgtccacc aatctgtcca ggttacagat ggatgtgttt gagaagattc 240
atcattttct tgttcatctt gttgttgtgt ttgatottct tgttggtttt gttggactac 300
cagggtatgt tgccagtttg tccattgatt ccaggttcca ctactacttc cactgggtcca 360
tgtaagactt gtactactcc agctcagggt aactctatgt tccatcctg ttgttgtact 420
aagccaactg acggttaactg tacttgtatc ccaattcctt cctcttgggc tttcgctaag 480
tacttgtggg aatgggcttc tgttagattc tcctggttgt ccttgttggg tccattcggt 540
cagtggttcg ttggtttgtc tcctactggt tggttgtccg ctatctggat gatgtggtac 600
tggggtccaa gcttgtactc tatcgtttcc ccattcatcc ctttgttgcc aatottcttc 660
tgtttgtggg tttacatc 678

<210> 11
<211> 667
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Polypeptit tái tổ hợp theo sáng chế

<400> 11

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

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

Thr Asp Ala Pro Cys Lys Ile Pro Phe Ser Ser Gln Asp Glu Lys Gly
 35 40 45

Val Thr Gln Asn Gly Arg Leu Ile Thr Ala Asn Pro Ile Val Thr Asp
 50 55 60

Lys Glu Lys Pro Val Asn Ile Glu Ala Glu Pro Pro Phe Gly Glu Ser
 65 70 75 80

Tyr Ile Val Val Gly Ala Gly Glu Lys Ala Leu Lys Leu Ser Trp Phe
 85 90 95

Lys Lys Gly Ser Ser Ile Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Met Ser
 100 105 110

Tyr Ala Met Cys Leu Asn Thr Phe Val Leu Lys Lys Glu Val Ser Glu
 115 120 125

Thr Gln His Gly Thr Ile Leu Ile Lys Val Glu Tyr Lys Gly Glu Asp
 130 135 140

Ala Pro Cys Lys Ile Pro Phe Ser Thr Glu Asp Gly Gln Gly Lys Ala
 145 150 155 160

His Asn Gly Arg Leu Ile Thr Ala Asn Pro Val Val Thr Lys Lys Glu
 165 170 175

Glu Pro Val Asn Ile Glu Ala Glu Pro Pro Phe Gly Glu Ser Asn Ile
 180 185 190

Val Ile Gly Ile Gly Asp Lys Ala Leu Lys Ile Asn Trp Tyr Arg Lys
 195 200 205

Gly Ser Ser Ile Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Met Ser Tyr Thr
 210 215 220

Met Cys Ser Gly Lys Phe Ser Ile Asp Lys Glu Met Ala Glu Thr Gln
 225 230 235 240

 His Gly Thr Thr Val Val Lys Val Lys Tyr Glu Gly Ala Gly Ala Pro
 245 250 255

 Cys Lys Val Pro Ile Glu Ile Arg Asp Val Asn Lys Glu Lys Val Val
 260 265 270

 Gly Arg Ile Ile Ser Pro Thr Pro Phe Ala Glu Asn Thr Asn Ser Val
 275 280 285

 Thr Asn Ile Glu Leu Glu Arg Pro Leu Asp Ser Tyr Ile Val Ile Gly
 290 295 300

 Val Gly Asp Ser Ala Leu Thr Leu His Trp Phe Arg Lys Gly Ser Ser
 305 310 315 320

 Ile Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Gly Met Ser Tyr Ser Met Cys Thr
 325 330 335

 Gly Lys Phe Lys Val Val Lys Glu Ile Ala Glu Thr Gln His Gly Thr
 340 345 350

 Ile Val Ile Arg Val Gln Tyr Glu Gly Asp Gly Ser Pro Cys Lys Thr
 355 360 365

 Pro Phe Glu Ile Met Asp Leu Glu Lys Arg His Val Leu Gly Arg Leu
 370 375 380

 Thr Thr Val Asn Pro Ile Val Thr Glu Lys Asp Ser Pro Val Asn Ile
 385 390 395 400

 Glu Ala Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Ile Ile Gly Val Glu
 405 410 415

 Pro Gly Gln Leu Lys Leu Asp Trp Phe Lys Lys Gly Ser Ser Ile Gly
 420 425 430

 Gln Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Thr Met Glu Asn Ile Thr Ser Gly
 435 440 445

Phe Leu Gly Pro Leu Leu Val Leu Gln Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr
 450 455 460

Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu
 465 470 475 480

Asn Phe Leu Gly Gly Ser Pro Val Cys Leu Gly Gln Asn Ser Gln Ser
 485 490 495

Pro Thr Ser Asn His Ser Pro Thr Ser Cys Pro Pro Ile Cys Pro Gly
 500 505 510

Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu
 515 520 525

Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu Leu Val Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met
 530 535 540

Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Thr Thr Thr Ser Thr Gly
 545 550 555 560

Pro Cys Lys Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Asn Ser Met Phe Pro
 565 570 575

Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Thr Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro
 580 585 590

Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Lys Tyr Leu Trp Glu Trp Ala Ser
 595 600 605

Val Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp Phe
 610 615 620

Val Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu Ser Ala Ile Trp Met Met Trp
 625 630 635 640

Tyr Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Ser Ile Val Ser Pro Phe Ile Pro Leu
 645 650 655

Leu Pro Ile Phe Phe Cys Leu Trp Val Tyr Ile
 660 665

<210> 12

<211> 2004

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit nucleic của polypeptit tái tổ hợp theo sáng chế

<400> 12

atgtcttacg tcatgtgcac tggttctttc aaattggaga aggaggtagc tgaaactcaa	60
catggcactg tcttagttca agttaagtac gaaggaacag atgccccatg caaaatcccc	120
ttctcctccc aagatgaaaa ggggtgcact caaaatggta gattgataac agctaaccac	180
atcgttaccg acaaggagaa acccgtgaat atcgaggccg agcctccttt cggcgaaagt	240
tacatagtag ttggagccgg agaaaaagca ctgaaattgt cttggttcaa aaagggttcc	300
tctattggaa aaggcgggtg tggtagcgga atgagttacg ccatgtgtct gaatacgttt	360
gtgcttaaga aagaggtttc tgaaacgcaa cacggaacca ttcttatcaa ggtggaatac	420
aagggtgagg acgctccatg caagatccca ttttctaccg aagatgggca gggtaaagct	480
cataatggta gactgattac tgctaatcct gttgtaacaa agaaggaaga gccagtcaac	540
atcgaggcag aacctccctt tggcgaatca aacatagtca tagggatagg tgacaaggca	600
ctaaagatta actggtatcg taagggttca tctattggca agggtagggg aggaggagga	660
atgtcttata cgatgtgttc aggcaagttc tctattgaca aagagatggc tgaaacacaa	720
catggtacaa ccgctggtta agtaaagtat gaaggagctg gtgcaccctg taaggtgcct	780
attgaaattc gagatgttaa caaagagaag gttgtcggga gaatcatttc cctactcca	840
tttgctgaga atactaattc agtcactaac atagaactag aacgtccatt ggactcatac	900
atcgtaattg gtgtgggaga ttcagcactt actttacact ggtttagaaa aggaagtagt	960
attggtaaaag gtggcggagg tggtagtatg agttactcca tgtgcaccgg gaaattcaaa	1020
gtagttaaaag agattgccga gactcagcac ggtacaatcg ttattcgagt gcaatatgaa	1080
ggtagatggaa gtccatgtaa gacccattt gagataatgg acttggaata gaggcacgtt	1140
ctaggagggt tgaccactgt taaccgaatt gtgacagaga aagattctcc agtgaatac	1200
gaagctgaac caccttttgg tgattcttac atcattatcg gagttgaacc tggtcagctt	1260
aagttagatt ggttcaagaa gggctcctca ataggtcagg gaggtggggg tggaggagg	1320
accatggaaa acatcacttc cggtttcttg ggtcctttgt tggttctgca ggctggattc	1380
ttottgttga ctagaatctt gactatccca cagtcttttg actottggtg gacttccttg	1440
aacttcttgg gtggttcccc agtttgtttg ggtcaaaact cccaatctcc aacttctaac	1500

cactcccaa cttcatgtcc accaatctgt ccagggttaca gatggatgtg tttgagaaga	1560
ttcatcattt tcttgttcat cttgttggtg tgtttgatct tcttgttggt tttgttggac	1620
taccagggtg tgttgccagt ttgtccattg attccagggt ccactactac ttccactggt	1680
ccatgtaaga cttgtactac tccagctcag ggtaactcta tgttcccatc ctggtgttgt	1740
actaagccaa ctgacggtaa ctgtacttgt atcccaattc cttcctcttg ggctttcgt	1800
aagtacttgt gggaatgggc ttctgtaga ttctcctggt tgccttggt gggtccattc	1860
gttcagtggt tcgttggtt gtctcctact gtttggttgt ccgtatctg gatgatgtgg	1920
tactggggtc caagcttgta ctctatcgt tccccattca tcccttggt gccaatcttc	1980
ttctgttgtt ggggttacat ctag	2004

Fig. 1

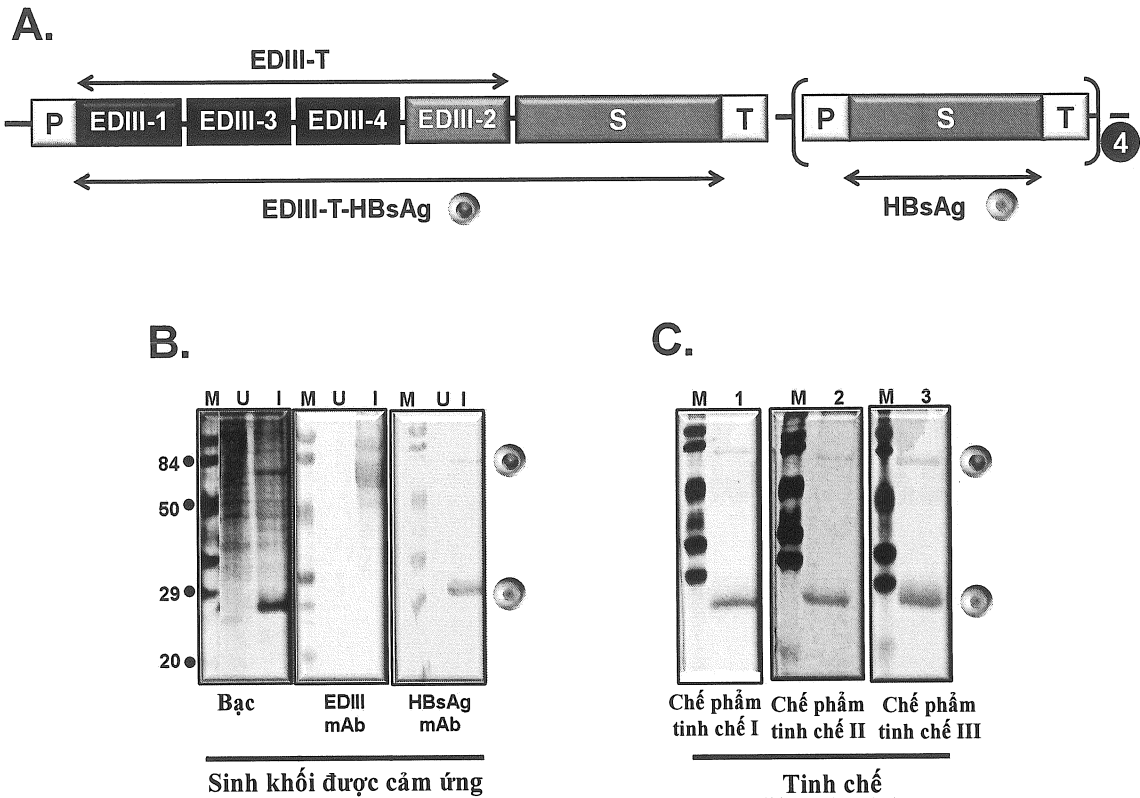


Fig. 2

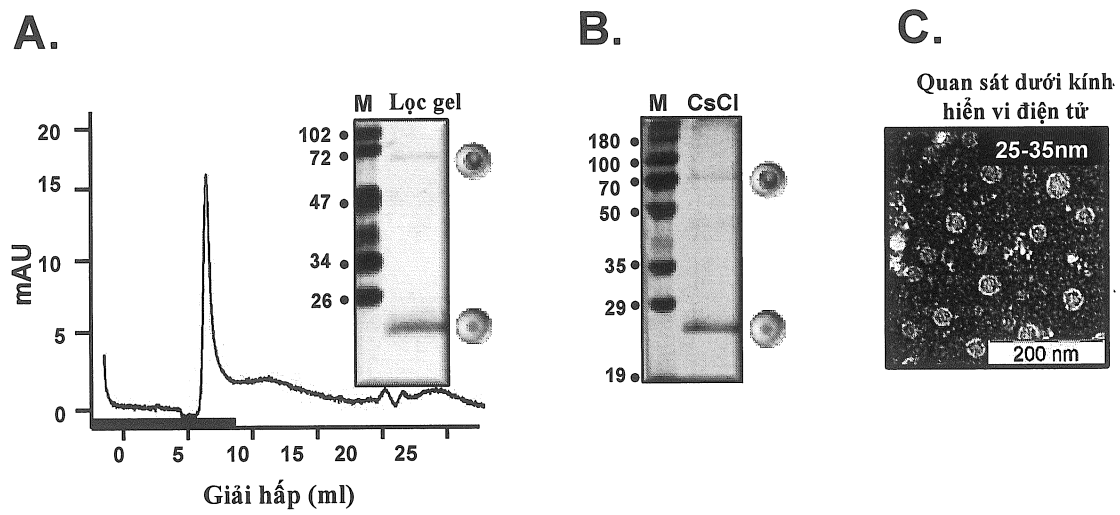


Fig. 3

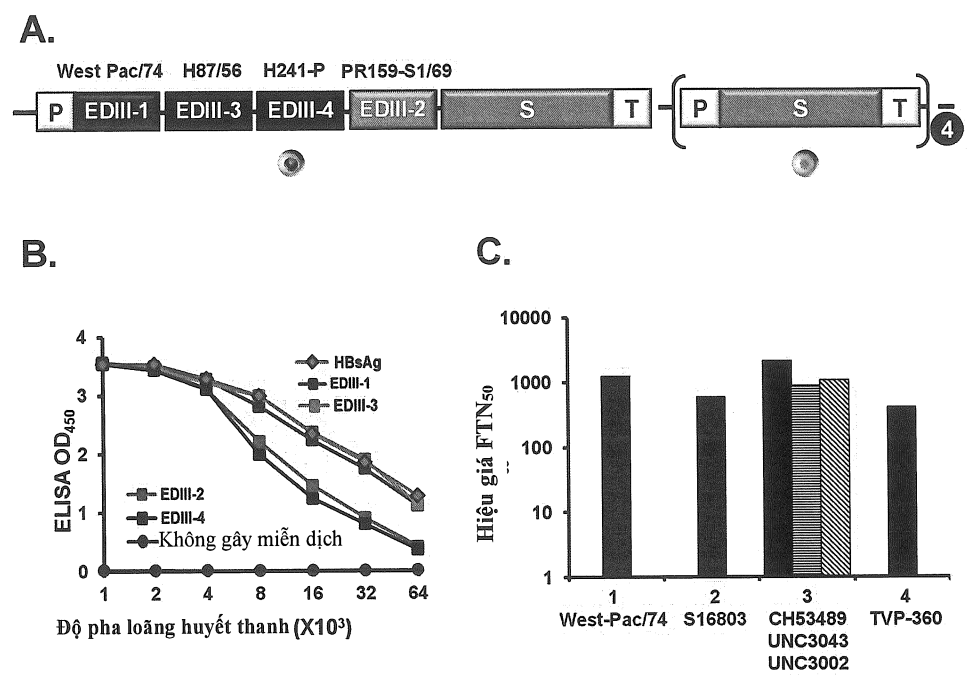
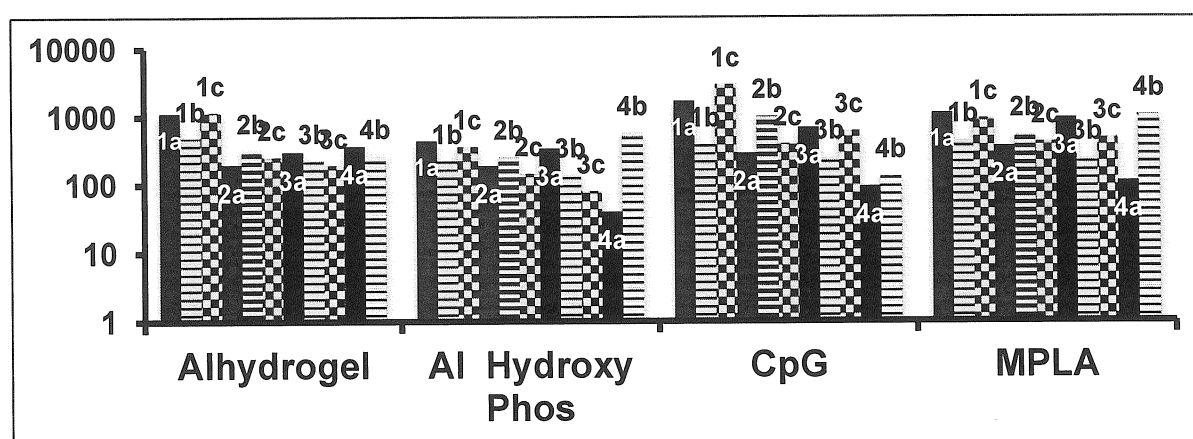


Fig. 3

D.



Kiểu huyết thanh	Ký hiệu	Kiểu gen	Tên chủng
1	1a	Châu Á	UNC 1036
	1b	Nam Thái Bình Dương	West Pac. 74*
	1c	Châu Mỹ/châu Phi	UNC 1017
2	2a	Châu Á	S-16803*
	2b	Châu Mỹ	IQT2133
	2c	Phân bố toàn cầu	UNC2037
3	3a	Đông Nam Á/Thái Bình Dương (I)	UNC 3043
	3b	Thái Lan (II)	CH53489*
	3c	Ấn Độ (III)	UNC 3001
4	4a	Đông Nam Á	TVP-360*
	4b	Indonesia	UNC 4019

* Các chủng tham chiếu của WHO đối với mỗi kiểu huyết thanh

Fig. 4
(a)

EDIII-1 (DENV1/Nauru/West Pac/1974) SEQ ID NO:1

M S Y V M C T G S F K L E K E V A E T Q H G T V L V Q V K Y E G T D
A P C K I P F S S Q D E K G V T Q N G R L I T A N P I V T D K E K P
V N I E A E P P F G E S Y I V V G A G E K A L K L S W F K K G S S I
G K

***Trình tự ADN EDIII-1* SEQ ID NO:5**

ATG TCT TAC GTC ATG TGC ACT GGT TCT TTC AAA TTG GAG AAG GAG GTA
GCT GAA ACT CAA CAT GGC ACT GTC TTA GTT CAA GTT AAG TAC GAA GGA
ACA GAT GCC CCA TGC AAA ATC CCC TTC TCC TCC CAA GAT GAA AAG GGT
GTC ACT CAA AAT GGT AGA TTG ATA ACA GCT AAC CCA ATC GTT ACC GAC AAG
GAG AAA CCC GTG AAT ATC GAG GCC GAG CCT CCT TTC GGC GAA AGT TAC ATA
GTA GTT GGA GCC GGA GAA AAA GCA CTG AAA TTG TCT TGG TTC AAA AAG GGT
TCC TCT ATT GGA AAA

Fig. 4
(b)

EDIII-2 (DENV2/Puerto Rico/PR159-S1/1969) SEQ ID NO:2

M S Y S M C T G K F K V V K E I A E T Q H G T I V I R V Q Y E G D G
S P C K T P F E I M D L E K R H V L G R L T T V N P I V T E K D S P
V N I E A E P P F G D S Y I I I G V E P G Q L K L D W F K K G S S I
G Q

Trình tự ADN EDIII-2 SEQ ID NO:6

ATG AGT TAC TCC ATG TGC ACC GGG AAA TTC AAA GTA GTT AAA GAG ATT GCC
GAG ACT CAG CAC GGT ACA ATC GTT ATT CGA GTG CAA TAT GAA GGT GAT GGA
AGT CCA TGT AAG ACC CCA TTT GAG ATA ATG GAC TTG GAA AAG AGG CAC GTT
CTA GGG AGG TTG ACC ACT GTT AAC CCA ATT GTG ACA GAG AAA GAT TCT CCA
GTG AAT ATC GAA GCT GAA CCA CCT TTT GGT GAT TCT TAC ATC ATT ATC GGA
GTT GAA CCT GGT CAG CTT AAG TTA GAT TGG TTC AAG AAG GGC TCC TCA ATA
GGT CAG

Fig. 4
(c)

EDIII-3 (DENV3/Philippine/H87/1956) SEQ ID NO:3

M S Y A M C L N T F V L K K E V S E T Q H G T I L I K V E Y K G E D
A P C K I P F S T E D G Q G K A H N G R L I T A N P V V T K K E E P
V N I E A E P P F G E S N I V I G I G D K A L K I N W Y R K G S S I
G K

Trình tự ADN EDIII-3 SEQ ID NO:7

ATG AGT TAC GCC ATG TGT CTG AAT ACG TTT GTG CTT AAG AAA GAG GTT TCT
GAA ACG CAA CAC GGA ACC ATT CTT ATC AAG GTG GAA TAC AAG GGT GAG GAC
GCT CCA TGC AAG ATC CCA TTT TCT ACC GAA GAT GGG CAG GGT AAA GCT CAT
AAT GGT AGA CTG ATT ACT GCT AAT CCT GTT GTA ACA AAG AAG GAA GAG CCA
GTC AAC ATC GAG GCA GAA CCT CCC TTT GGC GAA TCA AAC ATA GTC ATA GGG
ATA GGT GAC AAG GCA CTA AAG ATT AAC TGG TAT CGT AAG GGT TCA TCT ATT
GGC AAG

Fig. 4
(d)

EDIII-4 (DENV4/Philippine/H241/1956) SEQ ID NO: 4

M S Y T M C S G K F S I D K E M A E T Q H G T T V V K V K Y E G A G
A P C K V P I E I R D V N K E K V V G R I I S P T P F A E N T N S V
T N I E L E R P L D S Y I V I G V G D S A L T L H W F R K G S S I G
k

Trình tự ADN EDIII-4 SEQ ID NO:8

ATG TCT TAT ACG ATG TGT TCA GGC AAG TTC TCT ATT GAC AAA GAG ATG GCT
GAA ACA CAA CAT GGT ACA ACC GTC GTT AAA GTA AAG TAT GAA GGA GCT GGT
GCA CCC TGT AAG GTG CCT ATT GAA ATT CGA GAT GTT AAC AAA GAG AAG GTT
GTC GGG AGA ATC ATT TCC CCT ACT CCA TTT GCT GAG AAT ACT AAT TCA GTC
ACT AAC ATA GAA CTA GAA CGT CCA TTG GAC TCA TAC ATC GTA ATT GGT GTG
GGA GAT TCA GCA CTT ACT TTA CAC TGG TTT AGA AAA GGA AGT AGT ATT GGT
AAA

Fig. 4

I

HbsAg (kiểu phụ adw) SEQ ID NO: 9

M E N I T S G F L G P L L V L Q A G F F L L T R I L T I P Q S L D S
 W W T S L N F L G G S P V C L G Q N S Q S P T S N H S P T S C P P I
 C P G Y R W M C L R R F I I F L F I L L L C L I F L L V L L D Y Q G
 M L P V C P L I P G S T T T S T G P C K T C T T P A Q G N S M F P S
 C C C T K P T D G N C T C I P I P S S W A F A K Y L W E W A S V R F
 S W L S L L V P F V Q W F V G L S P T V W L S A I W M M W Y W G P S
 L Y S I V S P F I P L L P I F F C L W V Y I

Trình tự ADN HbsAg SEQ ID NO:10

ATG GAA AAC ATC ACT TCC GGT TTC TTG GGT CCT TTG TTG GTC TTG CAG GCT
 GGA TTC TTC TTG TTG ACT AGA ATC TTG ACT ATC CCA CAG TCT TTG GAC TCT
 TGG TGG ACT TCC TTG AAC TTC TTG GGT GGT TCC CCA GTT TGT TTG GGT CAA
 AAC TCC CAA TCT CCA ACT TCT AAC CAC TCC CCA ACT TCA TGT CCA CCA ATC
 TGT CCA GGT TAC AGA TGG ATG TGT TTG AGA AGA TTC ATC ATT TTC TTG TTC
 ATC TTG TTG TTG TGT TTG ATC TTC TTG TTG GTT TTG TTG GAC TAC CAG GGT
 ATG TTG CCA GTT TGT CCA TTG ATT CCA GGT TCC ACT ACT ACT TCC ACT GGT
 CCA TGT AAG ACT TGT ACT ACT CCA GCT CAG GGT AAC TCT ATG TTC CCA TCC
 TGT TGT TGT ACT AAG CCA ACT GAC GGT AAC TGT ACT TGT ATC CCA ATT CCT
 TCC TCT TGG GCT TTC GCT AAG TAC TTG TGG GAA TGG GCT TCT GTT AGA TTC
 TCC TGG TTG TCC TTG TTG GTT CCA TTC GTT CAG TGG TTC GTT GGT TTG TCT
 CCT ACT GTT TGG TTG TCC GCT ATC TGG ATG ATG TGG TAC TGG GGT CCA AGC
 TTG TAC TCT ATC GTT TCC CCA TTC ATC CCT TTG TTG CCA ATC TTC TTC TGT
 TTG TGG GTT TAC ATC

Fig. 4

(f)

ATG	TCT	TAC	GTC	ATG	TGC	ACT	GGT	TCT	TTC	AAA	TTG	GAG	AAG	GAG	GTA
M	S	Y	V	M	C	T	G	S	F	K	L	E	K	E	V
GCT	GAA	ACT	CAA	CAT	GGC	ACT	GTC	TTA	GTT	CAA	GTT	AAG	TAC	GAA	GGA
A	E	T	Q	H	G	T	V	L	V	Q	V	K	Y	E	G
ACA	GAT	GCC	CCA	TGC	AAA	ATC	CCC	TTC	TCC	TCC	CAA	GAT	GAA	AAG	GGT
T	D	A	P	C	K	I	P	F	S	S	Q	D	E	K	G
GTC	ACT	CAA	AAT	GGT	AGA	TTG	ATA	ACA	GCT	AAC	CCA	ATC	GTT	ACC	GAC
V	T	Q	N	G	R	L	I	T	A	N	P	I	V	T	D
AAG	GAG	AAA	CCC	GTG	AAT	ATC	GAG	GCC	GAG	CCT	CCT	TTC	GGC	GAA	AGT
K	E	K	P	V	N	I	E	A	E	P	P	F	G	E	S
TAC	ATA	GTA	GTT	GGA	GCC	GGA	GAA	AAA	GCA	CTG	AAA	TTG	TCT	TGG	TTC
Y	I	V	V	G	A	G	E	K	A	L	K	L	S	W	F
AAA	AAG	GGT	TCC	TCT	ATT	GGA	AAA	GGC	GGT	GGT	GGT	GGC	GGA	ATG	AGT
K	K	G	S	S	I	G	K	G	G	G	G	G	G	M	S
TAC	GCC	ATG	TGT	CTG	AAT	ACG	TTT	GTG	CTT	AAG	AAA	GAG	GTT	TCT	GAA
Y	A	M	C	L	N	T	F	V	L	K	K	E	V	S	E
ACG	CAA	CAC	GGA	ACC	ATT	CTT	ATC	AAG	GTG	GAA	TAC	AAG	GGT	GAG	GAC
T	Q	H	G	T	I	L	I	K	V	E	Y	K	G	E	D
GCT	CCA	TGC	AAG	ATC	CCA	TTT	TCT	ACC	GAA	GAT	GGG	CAG	GGT	AAA	GCT
A	P	C	K	I	P	F	S	T	E	D	G	Q	G	K	A
CAT	AAT	GGT	AGA	CTG	ATT	ACT	GCT	AAT	CCT	GTT	GTA	ACA	AAG	AAG	GAA
H	N	G	R	L	I	T	A	N	P	V	V	T	K	K	E
GAG	CCA	GTC	AAC	ATC	GAG	GCA	GAA	CCT	CCC	TTT	GGC	GAA	TCA	AAC	ATA
E	P	V	N	I	E	A	E	P	P	F	G	E	S	N	I
GTC	ATA	GGG	ATA	GGT	GAC	AAG	GCA	CTA	AAG	ATT	AAC	TGG	TAT	CGT	AAG
V	I	G	I	G	D	K	A	L	K	I	N	W	Y	R	K
GGT	TCA	TCT	ATT	GGC	AAG	GGT	GGG	GGA	GGA	GGA	GGA	ATG	TCT	TAT	ACG
G	S	S	I	G	K	G	G	G	G	G	G	M	S	Y	T
ATG	TGT	TCA	GGC	AAG	TTC	TCT	ATT	GAC	AAA	GAG	ATG	GCT	GAA	ACA	CAA
M	C	S	G	K	F	S	I	D	K	E	M	A	E	T	Q
CAT	GGT	ACA	ACC	GTC	GTT	AAA	GTA	AAG	TAT	GAA	GGA	GCT	GGT	GCA	CCC
H	G	T	T	V	V	K	V	K	Y	E	G	A	G	A	P
TGT	AAG	GTG	CCT	ATT	GAA	ATT	CGA	GAT	GTT	AAC	AAA	GAG	AAG	GTT	GTC
C	K	V	P	I	E	I	R	D	V	N	K	E	K	V	V
GGG	AGA	ATC	ATT	TCC	CCT	ACT	CCA	TTT	GCT	GAG	AAT	ACT	AAT	TCA	GTC
G	R	I	I	S	P	T	P	F	A	E	N	T	N	S	V
ACT	AAC	ATA	GAA	CTA	GAA	CGT	CCA	TTG	GAC	TCA	TAC	ATC	GTA	ATT	GGT
T	N	I	E	L	E	R	P	L	D	S	Y	I	V	I	G
GTG	GGA	GAT	TCA	GCA	CTT	ACT	TTA	CAC	TGG	TTT	AGA	AAA	GGA	AGT	AGT
V	G	D	S	A	L	T	L	H	W	F	R	K	G	S	S
ATT	GGT	AAA	GGT	GGC	GGA	GGT	GGT	GGT	ATG	AGT	TAC	TCC	ATG	TGC	ACC
I	G	K	G	G	G	G	G	G	M	S	Y	S	M	C	T
GGG	AAA	TTC	AAA	GTA	GTT	AAA	GAG	ATT	GCC	GAG	ACT	CAG	CAC	GGT	ACA
G	K	F	K	V	V	K	E	I	A	E	T	Q	H	G	T
ATC	GTT	ATT	CGA	GTG	CAA	TAT	GAA	GGT	GAT	GGA	AGT	CCA	TGT	AAG	ACC

I	V	I	R	V	Q	Y	E	G	D	G	S	P	C	K	T
CCA	TTT	GAG	ATA	ATG	GAC	TTG	GAA	AAG	AGG	CAC	GTT	CTA	GGG	AGG	TTG
P	F	E	I	M	D	L	E	K	R	H	V	L	G	R	L
ACC	ACT	GTT	AAC	CCA	ATT	GTG	ACA	GAG	AAA	GAT	TCT	CCA	GTG	AAT	ATC
T	T	V	N	P	I	V	T	E	K	D	S	P	V	N	I
GAA	GCT	GAA	CCA	CCT	TTT	GGT	GAT	TCT	TAC	ATC	ATT	ATC	GGA	GTT	GAA
E	A	E	P	P	F	G	D	S	Y	I	I	I	G	V	E

CCT	GGT	CAG	CTT	AAG	TTA	GAT	TGG	TTC	AAG	AAG	GGC	TCC	TCA	ATA	GGT
P	G	Q	L	K	L	D	W	F	K	K	G	S	S	I	G
CAG	GGA	GGT	GGG	GGT	GGA	GGA	GGT	ACC	ATG	GAA	AAC	ATC	ACT	TCC	GGT
Q	G	G	G	G	G	G	G	T	M	E	N	I	T	S	G
TTC	TTG	GGT	CCT	TTG	TTG	GTC	TTG	CAG	GCT	GGA	TTC	TTC	TTG	TTG	ACT
F	L	G	P	L	L	V	L	Q	A	G	F	F	L	L	T
AGA	ATC	TTG	ACT	ATC	CCA	CAG	TCT	TTG	GAC	TCT	TGG	TGG	ACT	TCC	TTG
R	I	L	T	I	P	Q	S	L	D	S	W	W	T	S	L
AAC	TTC	TTG	GGT	GGT	TCC	CCA	GTT	TGT	TTG	GGT	CAA	AAC	TCC	CAA	TCT
N	F	L	G	G	S	P	V	C	L	G	Q	N	S	Q	S
CCA	ACT	TCT	AAC	CAC	TCC	CCA	ACT	TCA	TGT	CCA	CCA	ATC	TGT	CCA	GGT
P	T	S	N	H	S	P	T	S	C	P	P	I	C	P	G
TAC	AGA	TGG	ATG	TGT	TTG	AGA	AGA	TTC	ATC	ATT	TTC	TTG	TTC	ATC	TTG
Y	R	W	M	C	L	R	R	F	I	I	F	L	F	I	L
TTG	TTG	TGT	TTG	ATC	TTC	TTG	TTG	GTT	TTG	TTG	GAC	TAC	CAG	GGT	ATG
L	L	C	L	I	F	L	L	V	L	L	D	Y	Q	G	M
TTG	CCA	GTT	TGT	CCA	TTG	ATT	CCA	GGT	TCC	ACT	ACT	ACT	TCC	ACT	GGT
L	P	V	C	P	L	I	P	G	S	T	T	T	S	T	G
CCA	TGT	AAG	ACT	TGT	ACT	ACT	CCA	GCT	CAG	GGT	AAC	TCT	ATG	TTC	CCA
P	C	K	T	C	T	T	P	A	Q	G	N	S	M	F	P
TCC	TGT	TGT	TGT	ACT	AAG	CCA	ACT	GAC	GGT	AAC	TGT	ACT	TGT	ATC	CCA
S	C	C	C	T	K	P	T	D	G	N	C	T	C	I	P
ATT	CCT	TCC	TCT	TGG	GCT	TTC	GCT	AAG	TAC	TTG	TGG	GAA	TGG	GCT	TCT
I	P	S	S	W	A	F	A	K	Y	L	W	E	W	A	S
GTT	AGA	TTC	TCC	TGG	TTG	TCC	TTG	TTG	GTT	CCA	TTC	GTT	CAG	TGG	TTC
V	R	F	S	W	L	S	L	L	V	P	F	V	Q	W	F
GTT	GGT	TTG	TCT	CCT	ACT	GTT	TGG	TTG	TCC	GCT	ATC	TGG	ATG	ATG	TGG
V	G	L	S	P	T	V	W	L	S	A	I	W	M	M	W
TAC	TGG	GGT	CCA	AGC	TTG	TAC	TCT	ATC	GTT	TCC	CCA	TTC	ATC	CCT	TTG
Y	W	G	P	S	L	Y	S	I	V	S	P	F	I	P	L
TTG	CCA	ATC	TTC	TTC	TGT	TTG	TGG	GTT	TAC	ATC	TAG	SEQ	ID	NO:12	
L	P	I	F	F	C	L	W	V	Y	I	-	SEQ	ID	NO:11	