



(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)



1-0042552

(51)^{2019.01} A61K 39/12; A61K 9/00; C12N 7/00; (13) B
A61P 31/14; C07K 14/005; A61K 39/00;
A61K 9/19

(21) 1-2020-00959

(22) 19/09/2018

(86) PCT/EP2018/075392 19/09/2018

(87) WO2019/057793 28/03/2019

(30) 17192374.1 21/09/2017 EP

(45) 27/01/2025 442

(43) 25/09/2020 390

(73) VALNEVA SE (FR)

6 Rue Alain Bombard, Saint-Herblain 44800 Nantes, France

(72) FRITZER, Andrea (AT); MEINKE, Andreas (AT); LUNDBERG, Urban (AT);
NEBENFUEHR, Mario (AT); HEINDL-WRUSS, Juergen (AT); SCHLEGL, Robert
(AT); LEON, Arnaud (FR).

(74) Công ty Luật TNHH WINCO (WINCO LAW FIRM)

(54) DƯỢC PHẨM CHỨA CÁC HẠT CHIKV-Δ5NSP3 VÀ QUY TRÌNH SẢN XUẤT
DƯỢC PHẨM NÀY

(21) 1-2020-00959

(57) Sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa các hạt CHIKV- Δ 5NSP3 và quy trình sản xuất virus Chikungunya sống đã giảm độc lực gây miễn dịch, cũng như là dược phẩm có chứa chúng.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất virus Chikungunya sống đã giảm độc lực gây miễn dịch, cũng như là được phẩm có chứa chúng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Virus Chikungunya (CHIKV) là virus ARN sợi đơn, có nghĩa dương tính từ chi Alphavirus, họ Togaviridae. Bệnh virus Chikungunya chủ yếu là bệnh bùng phát và đi kèm với tỉ lệ tấn công cao. Virus được truyền cho người thông qua vật truyền muỗi và gây ra sốt, phát ban, mệt mỏi và đau đa khớp nghiêm trọng. Sự lây nhiễm CHIKV thường tự tiêu tan và thường không gây tử vong, ngoại trừ trong các trường hợp hiếm gặp bao gồm sự lây nhiễm CNS, mà ở đó tỉ lệ tử vong nằm trong khoảng từ 10 đến 30 phần trăm. Đặc biệt có nguy cơ bị bệnh CHIKV CNS là trẻ sơ sinh dưới một năm tuổi và người trưởng thành trên 65 năm tuổi, với tỉ lệ lây nhiễm lần lượt cao gấp 25 lần và 6 lần so với quần thể chung. Tỉ lệ khuyết tật lâu dài ở trẻ em sau khi viêm não CHIKV được ước tính nằm trong khoảng từ 30 đến 45 phần trăm (Gerardin P, *et al.* Chikungunya virus-associated encephalitis A cohort study on La Réunion Island, 2005–2009 (2016) *Neurology* 86:1-9). Ngoài ra, khoảng 30 phần trăm trong số tất cả các bệnh nhân Chikungunya chịu đựng đau khớp trong khoảng thời gian từ vài tháng đến vài năm sau khi hồi phục. Trong một số trường hợp, có thể xảy ra các biến chứng ở thần kinh, thận, tim, hô hấp hoặc gan.

Hiện nay không có vắc xin hoặc thuốc sẵn có để phòng hoặc điều trị bệnh virus Chikungunya. Sự bùng phát trong quá khứ đã xảy ra chủ yếu ở Châu Phi, nhưng kiểu gen Đông-Trung Nam Phi (ECSA) gần đây đã mở rộng phạm vi địa lý, dẫn đến sự bùng phát ở Ấn Độ, Châu Á, và ở cả Châu Âu vùng ôn đới (Weaver, S., *Arrival of Chikungunya Virus in the New World: Prospects for Spread and Impact on Public Health* (2014) *PLOS Neglected Tropical Diseases* 8(6):e2921). Mặc dù CHIKV đã nhiều lần xâm nhập vào Châu Mỹ từ năm 1995, sự truyền bản địa không được báo cáo cho đến năm 2013 ở vùng Caribe. Vào năm 2015, dịch bệnh đã lan rộng đến lục địa và gây ra hơn một triệu trường hợp nghi ngờ ở 27 quốc gia Châu Mỹ (Pan-American Health Organization (2015) *Number of Cumulative Cases of Chikungunya Fever in the Americas*). Các dịch bệnh khác có thể phần nào được hỗ trợ do bởi sự lan rộng vật truyền muỗi CHIKV vào vùng không có dịch bệnh, cũng như là khả năng CHIKV thích ứng với các loài muỗi địa

phương (Vega-Rua A, *et al.*, Chikungunya Virus Transmission Potential by Local Aedes Mosquitoes in the Americas and Europe (2015) PLOS Neglected Tropical Diseases DOI:10.1371/journal.pntd.0003780). Tốc độ lây nhiễm cao của virus Chikungunya, sự lan rộng địa lý của nó, và tiềm năng đối với các biến chứng lâu dài nhấn mạnh nhu cầu về việc phát triển biện pháp ngăn ngừa, chẳng hạn như vắc xin.

Vắc xin kháng virus Chikungunya có thể có chứa các hạt CHIKV sống đã giảm độc lực; tức là, các hạt CHIKV sống đã được biến đổi để làm giảm độc lực, nhưng vẫn còn duy trì khả năng gây miễn dịch. Một ví dụ về CHIKV đã giảm độc lực chứa đột biến làm khuyết ở protein phi-cấu trúc 3 (CHIKV-Δ5nsP3; xem Fig.2). CHIKV-Δ5nsP3 đã được chứng minh là mang lại sự miễn dịch bảo vệ ở chuột (Hallengård D, *et al.* Novel attenuated Chikungunya vaccine candidates elicit protective immunity in C57Bl/6 mice (2014) J. Virol. 88:2858-2866) và động vật linh trưởng không phải người (Roques P, *et al.* Attenuated and vectored vaccines protect non-human primates against Chikungunya virus (2017) J. Clin. Invest. Insight 2(6):e83527). Các nghiên cứu *in vivo* sơ bộ ở chuột và động vật linh trưởng không phải người đã được thực hiện với virus CHIKV-Δ5nsP3 được tạo ra trên tế bào BHK-21—loại tế bào thường không được ưa thích để tạo ra vắc xin ở người. Do đó, điều cần thiết là, như được bộc lộ trong bản mô tả này, điều chỉnh sự tạo ra virus CHIKV-Δ5nsP3 thích ứng với nền tảng nuôi cấy tế bào phù hợp hơn. Sự thích ứng này không phải là quy trình bình thường; ví dụ, điều đã được chứng minh trong lĩnh vực là sự thích ứng của các virus với tế bào chủ cụ thể có thể dẫn đến sự đột biến làm thay đổi điện tích bề mặt của các hạt virus. Các đột biến thu được này có thể đáp ứng để làm giảm độc lực virus; trên thực tế, sự cấy chuyển liên tiếp đã được sử dụng để phát triển các hạt virus đã giảm độc lực được sử dụng trong nhiều vắc xin kháng virus. Về CHIKV, đã chứng minh được rằng sự truyền *in vitro* lặp lại nhiều lần của virus Chikungunya kiểu dại gây độc có thể dẫn đến các đột biến điểm nhất định, thu được sự giảm độc lực một phần hoặc hoàn toàn của virus (Gardner CL, *et al.*, Deliberate Attenuation of Chikungunya Virus by Adaptation to Heparan Sulfate-Dependent Infectivity: A Model for Rational Arboviral Vaccine Design (2014) PLOS Neglected Tropical Diseases 8(2): e2719).

Hiện nay đã bắt ngờ phát hiện ra rằng các đột biến điểm nhất định dẫn đến sự mất khả năng gây miễn dịch có thể xảy ra sớm trong quá trình thích ứng chất nền tế bào của CHIKV-Δ5nsP3 đã giảm độc lực, khiến cho sự kiểm soát hoặc sự làm giảm của các đột biến điểm này trở thành sự quan tâm thiết yếu để tạo ra ứng viên vắc xin thành công. Do

đó, sáng chế đề xuất quy trình có các tham số đã được xác định rõ để nhân giống ứng viên vắc xin CHIKV-Δ5nsP3, cho phép tạo ra các hạt virus gây miễn dịch mức độ cao, trong khi đồng thời đạt được hiệu giá sản xuất cao trong môi trường nuôi cấy tế bào phù hợp để ứng dụng trong công nghiệp.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến được phẩm có chứa lượng đủ của virus Chikungunya gây miễn dịch để gây ra đáp ứng miễn dịch trung hòa ở đối tượng; tức là, đáp ứng miễn dịch bảo vệ chống lại sự lây nhiễm virus Chikungunya và/hoặc bệnh do virus Chikungunya gây ra. Cụ thể là, sáng chế đề xuất được phẩm có chứa các hạt CHIKV-Δ5nsP3 sống đã giảm độc lực trong đó tỉ lệ phần trăm của các hạt virus này có đột biến làm giảm-khả năng gây miễn dịch, cụ thể là đột biến làm giảm-khả năng gây miễn dịch ở protein E2, được làm giảm thiểu. Sáng chế còn đề xuất quy trình sản xuất được phẩm có chứa CHIKV-Δ5nsP3 sống đã giảm độc lực, trong đó quy trình này làm giảm thiểu sự xuất hiện đột biến làm giảm-khả năng gây miễn dịch trong hệ gen virus, cụ thể là đột biến ở E168 của protein E2 ở virus và/hoặc gốc E2 khác và/hoặc các gốc ở các protein CHIKV cấu trúc hoặc phi-cấu trúc khác. Sáng chế đề xuất thêm được phẩm có chứa virus Chikungunya sống đã giảm độc lực gây miễn dịch có thể thu được bằng quy trình theo sáng chế.

Các nỗ lực để phát triển vắc xin kháng virus Chikungunya hiện nay đang được tiến hành. Một trong số các ứng viên vắc xin tiên tiến nhất cung cấp cấu trúc khảm trong nền virus sởi (xem <http://www.themisbio.com/#/news>). Vắc xin, hiện nay trong các thử nghiệm Pha 2, được phân phối ở hai liều lượng (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02861586?term=themis&recrs=a&rank=2>). Vắc xin một-liều thể hiện ưu điểm rõ rệt trong lĩnh vực.

Theo đó, theo một phương án, mục đích của sáng chế là đề xuất được phẩm ổn định, đã xác định rõ, an toàn và hữu hiệu chẳng hạn như, ví dụ vắc xin, kháng virus Chikungunya, tốt hơn là vắc xin được cải thiện mang lại sự bảo vệ chỉ với một liều chủng ngừa; tức là, vắc xin được gọi là “một-liều” ở quy mô công nghiệp bằng cách sử dụng các chất nền tế bào thông thường, đề xuất quy trình sản xuất vắc xin ổn định, đã xác định rõ, an toàn và hữu hiệu này và các phương pháp và việc sử dụng vắc xin ổn định, đã xác định rõ an toàn và hữu hiệu này.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các hình vẽ kèm theo không được dự định là được vẽ theo tỉ lệ. Các hình vẽ chỉ để minh họa và không cần thiết phải có trong phần bộc lộ. Để cho rõ ràng, không phải mọi thành phần có thể được đánh dấu trên mọi hình vẽ. Trên các hình vẽ này:

Fig.1 Bản đồ của plasmit pMX được sử dụng để lắp ghép đầy đủ hệ gen CHIKV- Δ 5nsP3 từ các mảnh được tổng hợp. Để lắp ghép đầy đủ trình tự CHIKV- Δ 5nsP3, plasmit pMX có băng kháng Ampixilin (pMA) được sử dụng. Dây vật truyền pMX được dựa trên vật truyền tách dòng giống như pUC, nhưng loại bỏ vùng khởi động không cần thiết (an toàn sinh học mức độ 1).

Fig.2 Minh họa bằng sơ đồ về cấu trúc hệ gen CHIKV- Δ 5nsP3. Hệ gen virut Chikungunya mã hóa hai polyprotein: protein phi-cấu trúc 1-4 (nsP1-4) và protein cấu trúc (C, E3, E2, 6K, E1). So sánh với trình tự hệ gen kiểu đại, trình tự CHIKV- Δ 5nsP3 chứa sự làm khuyết 183-bp ở phần 3' của trình tự mã hóa nsP3 (từ axit amin 1656 đến 1717 ở polyprotein nsP1-4), dẫn đến sự làm khuyết 60 axit amin ở protein nsP3 replicaza (được chỉ ra bởi Δ 60aa). SP, vùng khởi động hệ gen phụ; UTR, vùng không dịch mã. (Hình vẽ này được phỏng theo Hallengård D, *et al.*, 2014, ở trên.)

Fig.3 Chiến lược tách dòng để lắp ghép hệ gen CHIKV- Δ 5nsP3 ở pMA. (A) Sơ đồ thiết kế của các mảnh polynucleotit được tổng hợp gồm hệ gen CHIKV- Δ 5nsP3 đầy đủ. (B) Chiến lược tách dòng để lắp ghép hệ gen CHIKV- Δ 5nsP3 trong plasmit pMA. 1. Tách dòng mảnh CHIKV- Δ 5nsP3 2 vào pMA chứa mảnh 1 (mảnh pMA 1) thông qua *EcoRI* và *PacI*. 2. Lắp ghép mảnh 4 và mảnh 3 thông qua *ClaI* và *PacI*. 3. Điều chế mảnh 5 được phân cắt bằng *XhoI* và *PacI* trong pMA để lắp ghép đầy đủ cuối cùng. 4. Lắp ghép đầy đủ hệ gen CHIKV- Δ 5nsP3 trong pMA bằng cách dung hợp các mảnh 3 và 4 được phân cắt bởi *AgeI/XhoI* và mảnh 5 được phân cắt bởi *XhoI/PacI* với các mảnh pMA 1 và 2 được tạo mạch thẳng bởi *AgeI/PacI*. Lắp ghép hệ gen CHIKV- Δ 5nsP3 chính xác được xác minh thông qua sự giải trình tự Sanger.

Fig.4 Hiệu suất, kích thước mảng và khả năng gây miễn dịch của CHIKV- Δ 5nsP3 sau khi cấy chuyển ở các tế bào Vero. Virut được cấy chuyển ở ba bản sao song song (A, B và C) bắt đầu từ P0 thông thường (cứu sinh) như được nêu chi tiết trong **Bảng 2**. (A) Hiệu giá virut 24 giờ sau khi lây nhiễm tế bào Vero từ lần cấy chuyển 0 đến lần cấy chuyển 16. Hiệu giá trung bình của ba bản sao (A, B và C) được thể hiện. (B) Hiệu giá

tương đối của P0, P5 và P15 CHIKV- Δ 5nsP3 như được đánh giá bằng thử nghiệm mảng. Các tế bào Vero được cấy ở mật độ bằng 4×10^5 tế bào trên mỗi giếng trong đĩa 6-giếng trong MEM có bổ sung FBS 5%, L-Glutamin 2 mM và Kháng sinh-Kháng nấm 1% (Anti-Anti) và được ủ qua đêm ở nhiệt độ 35°C và CO_2 5%. Vào ngày tiếp theo, loại bỏ dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy khỏi các tế bào Vero và dịch pha loãng liên tiếp của CHIKV- Δ 5nsP3 được bổ sung lên các tế bào. Sau khi ủ trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ 35°C / CO_2 5%, bổ sung lớp phủ methylxenuloza có nồng độ cuối cùng bằng 2% và ủ các tế bào thêm 3 ngày ở nhiệt độ 35°C / CO_2 5%. Cuối cùng, các mảng được đếm sau khi nhuộm tím tinh thể (tím tinh thể 0,5% trong formaldehyt 5%) để đánh giá hiệu giá virut (pfu/ml) và hình thái mảng. (C) Khả năng gây miễn dịch của P0, P5B, P8B và P15C CHIKV- Δ 5nsP3 như được đánh giá bằng cách trung hòa CHIKV- Δ 5nsP3 (P0) trong PRNT trên các tế bào Vero. Các tế bào Vero được cấy trong đĩa 12-giếng ở mật độ bằng 3×10^5 và được ủ qua đêm ở nhiệt độ 35°C / CO_2 5%. Nhóm gồm năm con chuột C57Bl/6 được gây miễn dịch một lần dưới da với liều lượng bằng 10^5 TCID₅₀ của sự cấy chuyển CHIKV- Δ 5nsP3 tương ứng. CHIKV- Δ 5nsP3 ở P0 (cứu sinh virut), cũng bằng 10^5 TCID₅₀, được sử dụng làm đối chứng dương. Tập hợp huyết thanh ngày 21 tại dịch pha loãng liên tiếp 4-lần nằm trong khoảng từ 1:20 đến 1:327.680 được trộn với 560 pfu/ml CHIKV- Δ 5nsP3 (ở P0) và được ủ trong thời gian một giờ. CHIKV- Δ 5nsP3 /hỗn hợp trung hòa sau đó được bổ sung vào tế bào Vero và các đĩa được ủ trong thời gian 2 giờ ở nhiệt độ 35°C / CO_2 5%. Sau bước này là lớp phủ methylxenuloza 2% và các đĩa được ủ trong thời gian ~60 giờ ở nhiệt độ 35°C / CO_2 5%. Sau khi loại bỏ lớp phủ, nhuộm tế bào bằng tím tinh thể/formaldehyt 5% và đếm các mảng.

Fig.5 Ảnh hưởng của MOI được kiểm soát (0,01) trong quá trình cấy chuyển CHIKV- Δ 5nsP3 lên khả năng gây miễn dịch. (A) Minh họa bằng sơ đồ về việc cấy chuyển CHIKV- Δ 5nsP3 lên các tế bào Vero trong các điều kiện không được kiểm soát và được kiểm soát. CHIKV- Δ 5nsP3 P0 được cấy chuyển lên các tế bào Vero đến P3B trong các điều kiện không được kiểm soát với MOI thay đổi (như được phác họa trong **Bảng 2**; Bản sao B). Bằng cách sử dụng P3B làm nguyên liệu bắt đầu, quy trình lây nhiễm được kiểm soát được tiến hành cùng với tất cả các lây nhiễm sau đó tại MOI đã xác định bằng 0,01 để tạo ra một cấy chuyển P4, hai cấy chuyển P5 và một cấy chuyển P6 để phân tích khả năng gây miễn dịch ở chuột. (B) Khả năng gây miễn dịch của P0 (○), P2B (□), P5#1 (●), P5#2 (◆), P6 (■) và P15 (△) CHIKV- Δ 5nsP3 như được đánh giá bằng cách trung hòa CHIKV- Δ 5nsP3 (P2) trong PRNT trên tế bào Vero. Nhóm gồm mười con chuột C57Bl/6 được gây miễn dịch dưới da với liều lượng đơn lẻ của chế phẩm CHIKV- Δ 5nsP3 tương

ứng ở liều lượng được dự định bằng 10^5 TCID₅₀ và vào ngày 21 sau khi gây miễn dịch, huyết thanh đã được tập hợp được đánh giá về khả năng trung hòa CHIKV-Δ5nsP3 (560 pfu/ml) tại dịch pha loãng liên tiếp 4-lần nằm trong khoảng từ 1:20 đến 1:327.680 như được mô tả đối với Fig.4.

Fig.6 Khả năng gây miễn dịch và tính không đồng nhất về hệ gen được quan sát thấy của các thể phân lập mảng đơn lẻ của CHIKV-Δ5nsP3 từ P5B và P8B. Hai mẻ thu cứu sinh virus CHIKV-Δ5nsP3 (4399gr1 P0 (#1) và 4415gr1 P0 (#2)) và mẻ thu P15 CHIKV-Δ5nsP3 (P15C-DS) lần lượt có vai trò làm đối chứng gây miễn dịch và đối chứng không gây miễn dịch. (A) Khả năng gây miễn dịch của các thể phân lập mảng đơn lẻ CHIKV-Δ5nsP3 P5B-11, P5B-03 và P8B-05 như được đánh giá bằng cách trung hòa CHIKV-Δ5nsP3 (P2) trong PRNT trên tế bào Vero. Nhóm gồm mười con chuột C57Bl/6 được gây miễn dịch dưới da với liều lượng đơn lẻ của thể phân lập CHIKV-Δ5nsP3 tương ứng ở các liều lượng TCID₅₀ được chỉ ra và vào ngày 19 sau khi gây miễn dịch, huyết thanh đã được tập hợp được đánh giá về khả năng trung hòa CHIKV-Δ5nsP3 (560 pfu/ml) tại dịch pha loãng liên tiếp 4-lần nằm trong khoảng từ 1:20 đến 1:327.680 như được mô tả đối với Fig.4. (B) Hệ gen dưới dạng sơ đồ của các thể phân lập mảng đơn lẻ CHIKV-Δ5nsP3 P5B-11, P5B-03 và P8B-05 bắt nguồn từ sự giải trình tự Sanger gồm hệ gen CHIKV-Δ5nsP3 đầy đủ có đột biến điểm đã xác định được chỉ ra. (C) Khả năng gây miễn dịch của các thể phân lập mảng đơn lẻ CHIKV-Δ5nsP3 khác P5B-02, P5B-04, P5B-07 và P8B-01 được đánh giá như ở (A). (D) Hệ gen dưới dạng sơ đồ của các thể phân lập mảng đơn lẻ CHIKV-Δ5nsP3 P5B-02, P8B-01, P5B-04 và P5B-07 bắt nguồn từ sự giải trình tự Sanger gồm hệ gen CHIKV-Δ5nsP3 đầy đủ có đột biến điểm đã xác định được chỉ ra.

Fig.7 Sắc ký đồ từ sự giải trình tự Sanger của CHIKV-Δ5nsP3 ở cây chuyển 0 (P0) và bốn mẫu CHIKV-Δ5nsP3 được tạo ra độc lập ở cây chuyển 3 (P3 Ví dụ 1-4), biểu lộ tính không đồng nhất E168K và E247K ở protein E2 phát sinh ở cây chuyển 3. Bốn mẫu CHIKV-Δ5nsP3 được tạo ra độc lập ở P3 (P3 Ví dụ 1-4) tất cả đều bắt nguồn từ cùng MVSB (P1). Các vùng được thể hiện gồm các vùng ở hệ gen mã hóa các axit amin 168 và 247 của protein E2 và được giải trình tự bằng cặp mồi 16 và 17 như được chỉ ra. (Đối với các trình tự mồi, xem **Bảng 1**). Để so sánh, sắc ký đồ giải trình tự của CHIKV-Δ5nsP3 ở cây chuyển 0 (P0) được thể hiện. Các vị trí có tính không đồng nhất trình tự được chỉ ra bởi các khung.

Fig.8 Giải trình tự thế hệ kế tiếp (NGS) của Ngân Hàng Giống Virus Trường Thành (P1) và hai chế phẩm CHIKV-Δ5nsP3 cây chuyển ba (P3) được tạo ra độc lập: (A) P1-MVSB; (B) P3-Ví dụ 3; (C) P3-Ví dụ 4. Mức nền của tính không đồng nhất về hệ gen được đặt bằng 15% như được chỉ ra bởi đường chấm chấm. Tính không đồng nhất thường xảy ra hơn phát sinh lúc cây chuyển 3 bao gồm đột biến điểm ở các vị trí axit nucleic hệ gen 8882 và 9119, lần lượt tương ứng với các đột biến E168K và E247K, ở protein E2 như được chỉ ra ở (B) và (C).

Fig.9 Sự định vị các vị trí axit amin có tính không đồng nhất được quan sát thấy thường xuyên (G55R, G82R, E168K và E247K) ở glycoprotein E2 được đánh dấu trên các vị trí tương đương trên cấu trúc EM-lạnh sâu của CHIKV VLP của chủng Senegal 37997 (PDB 3J2W; Sun S, *et al.*, Structural analyses at pseudo atomic resolution of Chikungunya virus and antibodies show mechanisms of neutralization (2013) eLife 2:e00435. DOI: 10.7554/eLife.00435). G55R được chỉ ra bởi hình vuông, G82R được chỉ ra bởi hình tròn, E168K được chỉ ra bởi hình tam giác và E247K được chỉ ra bởi hình sao. Các hình vẽ thể hiện protein CHIKV bằng ô-đơn vị khi chúng được lắp ghép ở màng virut, được cấu thành bởi bốn bản sao của các đime E1/E2 với phần xuyên màng (TM) được chỉ ra bởi dấu ngoặc, và protein capsit (C) ở mặt trong (dưới) của màng. Ba tổ hợp-E1/E2/capsit cấu thành gai-q3 dạng trime gần trục 5-nếp cuộn gấp và tổ hợp thứ tư là một trong ba yếu tố của gai-i3 tại trục 3-nếp cuộn gấp, tất cả đều hiển thị bề mặt và được quan sát từ ba góc khác nhau: (A) hình chiếu cạnh ô-đơn vị CHIKV; điểm nhìn ở trên mặt phẳng màng. (B) hình chiếu cạnh ô-đơn vị CHIKV; điểm nhìn ở dưới mặt phẳng màng (C) ô-đơn vị CHIKV, hình chiếu bằng.

Fig.10 Nhóm để gây miễn dịch dưới da của chuột C57Bl/6 bằng các chế phẩm virut có các tỉ lệ P3:P5B-07 (E168K) khác nhau để xác định ngưỡng mà tại đó sự có mặt của đột biến điểm E168K dẫn đến sự mất khả năng gây miễn dịch CHIKV-Δ5nsP3 ở liều lượng bằng xấp xỉ 3×10^4 TCID₅₀. Tỉ lệ tạo chế phẩm của P3 và P5B-07 (thể đột biến E168K) đối với các nhóm 1, 3 và 5 lần lượt là 1:0,1, 1:1 và 1:10, với liều lượng được dự định bằng 3×10^4 TCID₅₀. Ngoài ra, nhóm 6 và nhóm 7 lần lượt thể hiện P3 một mình và P5B-07 (E168K) một mình. Trình tự tham chiếu (kiểu đại) ở vị trí không đồng nhất (tương ứng với nucleotit 8882) là G và phụ thuộc vào tỉ lệ là 1:0,1, 1:1 hoặc 1:10, sự chuyển đổi hướng về nucleotit A, tức là, từ G>A đến G=A hoặc G<A, căn cứ theo sắc ký đồ giải trình tự. Quần thể virut P3 hiển thị ~ 20% thể đột biến E168K. Quần thể virut P5B-07 (E168K) không thể hiện tính không đồng nhất (tức là, ~100% chứa đột biến E168K protein E2).

Fig.11 Ảnh hưởng lên khả năng gây miễn dịch của các tỉ lệ CHIKV-Δ5nsP3 P3 đối với thể đột biến-E168K khác nhau được đánh giá bằng thử nghiệm trung hòa dựa trên VRP. Các huyết thanh chuột đơn lẻ được tạo ra bằng cách gây miễn dịch dưới da của chuột C57Bl/6 với liều lượng được dự định bằng 3×10^4 TCID₅₀ của CHIKV-Δ5nsP3 P3:E168K ở các tỉ lệ 1:0,1, 1:1 và 1:10 như được phác họa trong Fig.10. Các huyết thanh đơn lẻ ngày 21 được phân tích về sự trung hòa của hạt sao chép virut (VRP) LR-CHIKV bằng cách sử dụng thử nghiệm Luxiferaza dựa trên tế bào BHK-21. VRP lắp ráp capsit hiển thị CHIKV kiểu đại không có-sự sao chép và protein vỏ của virut kiểu đại LR2006-OPY1. Tóm lại, 2×10^4 tế bào BHK-21 được cấy trong đĩa 96-giếng và được ủ qua đêm ở nhiệt độ 35°C/ CO₂ 5%. VRP CHIKV-Δ5nsP3 được ủ với dịch pha loãng liên tiếp (bắt đầu từ 1:20 đến 1:312.500) của huyết thanh chuột trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ 35°C. Hỗn hợp VRP CHIKV /huyết thanh được bổ sung vào tế bào BHK-21 tại MOI bằng 5 và được ủ trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ 35°C/CO₂ 5%. Rửa tế bào và bổ sung môi trường

mới. Đo hoạt tính luxiferaza trong dịch nổi bề mặt 24 giờ sau khi lây nhiễm bằng cách sử dụng Hệ Thống Thử Nghiệm Luxiferaza Renilla (Promega). Đối chứng dương P-MVSB (○), đối chứng âm P5B-07 (E168K) (□) và các huyết thanh chuột riêng lẻ được gây miễn dịch với tỉ lệ P3:E168K tương ứng (hình tròn đặc). **(A)** Khả năng gây miễn dịch của CHIKV-Δ5nsP3 P3:E168K ở tỉ lệ bằng 1:0,1 (Nhóm 1). **(B)** Khả năng gây miễn dịch của CHIKV-Δ5nsP3 P3:E168K ở tỉ lệ bằng 1:1 (Nhóm 3). **(C)** Khả năng gây miễn dịch của CHIKV-Δ5nsP3 P3:E168K ở tỉ lệ bằng 1:10 (Nhóm 5). **(D)** Tổng kết các kết quả khả năng gây miễn dịch được thể hiện ở A, B, và C: gây miễn dịch mạnh (++ dương tính), gây miễn dịch thấp (+dương tính thấp) và âm tính (-) khi so với P3.

Fig.12 Dòng nuôi cấy tế bào Vero từ khi rải đông đến khi lây nhiễm bằng **CHIKV-Δ5nsP3** trong các chai hình ống lăn 850 cm². P: Cây chuyển, M: Triệu, T75: Bình thót cổ-T 75 cm², T175: Bình thót cổ-T 175 cm², RB850: Chai Hình Ống Lăn CellBIND 850cm².

Fig.13 Ảnh hưởng lên hiệu giá virus của nhiệt độ sinh trưởng tế bào, bội số lây nhiễm và thời gian lây nhiễm sau cấy trong quá trình sản xuất CHIKV-Δ5nsP3 ở tế bào Vero. Các tế bào Vero được mở rộng ở nhiệt độ 35°C trong MEM, glutamin 2 mM và FBS 10% và được cấy trong các chai hình ống lăn 850 cm² để lây nhiễm tế bào. Để tạo ra virus, các nhiệt độ khác nhau (37°C, 35°C, 28°C), các MOI (0,1; 0,01; 0,001 TCID₅₀/tế bào) và thời gian lây nhiễm tế bào sau khi cấy tế bào Vero trong các ngày (D2, D4, D5) được thử nghiệm trong môi trường nuôi cấy thiếu FBS. Đã chứng minh được rằng sản lượng virus đo được trên tế bào Vero theo phương pháp Reed & Muench và được biểu diễn theo TCID₅₀/ml. **(A)** 37°C; **(B)** 35°C; **(C)** 28°C.

Fig.14 Tổng sản lượng virus CHIKV-Δ5nsP3 từ mỗi điều kiện được mô tả trong Fig.13.

Fig.15 Hiệu giá virus CHIKV-Δ5nsP3 tối đa: Mô hình bậc hai bề mặt đáp ứng. **(A)** Phân tích ANOVA của mô hình. Hàng màu xám: số hạng mô hình có ý nghĩa (Prob(F) < 0,05; các giá trị lớn hơn 0,1 biểu thị số hạng mô hình không có ý nghĩa). **(B)** Biểu Đồ Đường Quanh của mô hình.

Fig.16 Độ ổn định virus CHIKV-Δ5nsP3: Mô hình bậc hai bề mặt đáp ứng. **(A)** Phân tích ANOVA của mô hình. Hàng màu xám: số hạng mô hình có ý nghĩa (Prob(F) < 0,05; các giá trị lớn hơn 0,1 biểu thị số hạng mô hình không có ý nghĩa). **(B)** Biểu Đồ Đường Quanh của mô hình.

Fig.17 Tính không đồng nhất của protein virus E2 CHIKV-Δ5nsP3 ở các vị trí axit nucleic hệ gen 8882, 9112 và 9649, lần lượt tương ứng với các axit amin E2 168, 247 và 423: Phân tích mô hình từ các mẻ thu mẫu CHIKV-Δ5nsP3 Ngày 2. **(A)** Phân tích ANOVA của mô hình. Hàng màu xám: số hạng mô hình có ý nghĩa (Prob(F) < 0,05). **(B)** Biểu Đồ Đường Quanh của mô hình.

Fig.18 Tính không đồng nhất của protein virus E2 CHIKV-Δ5nsP3 ở các vị trí axit nucleic hệ gen 8882, 9112 và 9649; lần lượt tương ứng với các axit amin E2 168, 247 và 423: Phân tích mô hình từ các mẻ thu mẫu CHIKV-Δ5nsP3 Ngày 2 và Ngày 5 (28°C).

(A) Phân tích ANOVA của mô hình. Hàng màu xám: số hạng mô hình có ý nghĩa ($\text{Prob}(F) < 0,05$). (B) Biểu Đồ Đường Quanh của mô hình.

Mô tả chi tiết sáng chế

Trong quá trình công nghiệp hóa của ứng viên vắc xin virus đã giảm độc lực CHIKV- $\Delta 5\text{nsP3}$, đã quan sát thấy rằng sự cấy chuyển virus trên tế bào Vero dẫn đến hiệu giá virus cao hơn cùng với sự cấy chuyển tăng; tuy nhiên, sự tăng đồng thời về tính không đồng nhất trình tự của hệ gen virus CHIKV- $\Delta 5\text{nsP3}$ cũng được quan sát thấy. Đột biến điểm nhất định phát sinh trong quá trình cấy chuyển trên tế bào Vero được phát hiện có thể tái sinh từ mẻ này sang mẻ khác và đã xuất hiện ở các cấy chuyển sớm trên chất nền tế bào mới. Bất ngờ quan sát thấy rằng một số đột biến trong số các đột biến này có liên quan đến sự mất hoặc giảm đáng kể trong việc trung hòa khả năng gây miễn dịch do virus CHIKV- $\Delta 5\text{nsP3}$ mang lại. Các đột biến có thể tái sinh khác không làm giảm khả năng gây miễn dịch và/hoặc hoạt động như là đột biến “cứu sinh” đối với đột biến làm giảm-khả năng gây miễn dịch. Sự tương quan giữa bội số lây nhiễm (“MOI”) thấp và sự tạo ra của tính không đồng nhất trình tự tăng ở CHIKV- $\Delta 5\text{nsP3}$ đã được xác định; tuy nhiên, bởi vì cần có nguồn virus đơn lẻ qua vài năm sản xuất, các MOI cao thường không khả thi để sử dụng trong công nghiệp. Do đó không rõ là ở khởi đầu liệu điều kiện nuôi cấy có cho phép tạo ra các hạt CHIKV- $\Delta 5\text{nsP3}$ gây miễn dịch với sản lượng sản xuất đủ để sản xuất có thể tái tạo và đảm bảo có thể được phát hiện (vấn đề của sáng chế).

Sáng chế đề xuất trong bản mô tả này phương pháp kiểm soát và làm giảm thiểu đột biến làm giảm-khả năng gây miễn dịch được quan sát thấy ở đây trong khi vẫn cho phép sản lượng sản xuất cao. Cũng được đề xuất trong bản mô tả này là được phẩm có chứa lượng hữu hiệu của virus Chikungunya gây miễn dịch với lượng dư của biến thể không gây miễn dịch của virus Chikungunya. Theo phương án được ưu tiên, được phẩm được tạo ra bằng cách sử dụng MOI thấp chẳng hạn như MOI nhỏ hơn 0,1, ví dụ 0,01 hoặc 0,001, nhưng được tạo ra trong các điều kiện được kiểm soát (ví dụ, số lượng cấy chuyển giảm sau khi cứu sinh, nhiệt độ được tối ưu hóa và hợp lưu tế bào chủ) để làm giảm thiểu lượng của (các) biến thể không gây miễn dịch của virus Chikungunya như được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số phương án, hạt virus là virus sống, virus khảm, virus sống đã giảm độc lực, virus sống cải biến, hoặc virus sống tái tổ hợp. Theo một phương án, các hạt virus theo sáng chế có thể tùy ý bị bất hoạt. Theo một số phương án, hạt virus là dạng đã giảm độc lực của hạt virus. Ví dụ, virus có thể có khả năng lây

nhiễm, tính gây độc, và/hoặc sự sao chép giảm ở vật chủ, khi so sánh với virus kiểu đại. Theo một số phương án, virus là virus đã đột biến hoặc cải biến, ví dụ axit nucleic của virus có thể chứa ít nhất là một đột biến tương quan với virus kiểu đại, chẳng hạn như sự thể hoặc sự làm khuyết. Theo một số phương án, virus là virus sống tái tổ hợp, có nghĩa là virus được tạo ra bằng cách tái tổ hợp và có thể chứa trình tự axit nucleic từ các nguồn khác nhau. Theo một số khía cạnh, virus Chikungunya kiểu đại bị bất hoạt. Theo phương án được ưu tiên, virus bị bất hoạt bằng formaldehyt.

Theo một phương án, virus Chikungunya gây miễn dịch là virus sống đã giảm độc lực. Theo phương án được ưu tiên, virus Chikungunya sống đã giảm độc lực là CHIKV- Δ 5nsP3 bảo vệ như được mô tả bởi Hallengård D, *et al.* (ở trên), được đề cập trong bản mô tả này dưới dạng CHIKV- Δ 5nsP3 □ và được xác định bởi trình tự axit nucleic trong SEQ ID NO: 1. Tóm lại, hệ gen CHIKV kiểu đại mang hệ gen ARN sợi đơn có nghĩa dương tính có kích thước là 11 kb chứa hai khung đọc mở lần lượt mã hóa các protein phi cấu trúc (từ nsP1 đến nsP4) và protein cấu trúc (C, E3, E2, 6K, và E1). Virus CHIK đã giảm độc lực, CHIKV- Δ 5nsP3, dựa trên chủng CHIKV La Reunion LR2006-OPY1, được tạo cấu trúc bằng cách thể các gốc axit amin từ 1656 đến 1717 của polyprotein P1234 bằng cầu nối nhỏ (trình tự AA AYRAAAG) ở vùng siêu biến của protein nsP3 (xem Fig.2). CHIKV- Δ 5nsP3 đã cho thấy rằng có tính lây nhiễm, gây miễn dịch và bảo vệ mạnh chống lại thách thức của CHIKV kiểu đại (Hallengård D, *et al.*, ở trên và Hallengård D, *et al.*, Prime-Boost Immunization Strategies against Chikungunya Virus (2014) J. Virology, 88(22):13333-13343, và Roques P, *et al.* 2017, ở trên). Theo một phương án, virus Chikungunya sống đã giảm độc lực có thể là biến thể của virus đột biến đã giảm độc lực CHIKV- Δ 5nsP3. Theo phương án được ưu tiên, virus Chikungunya sống đã giảm độc lực như được đề xuất trong bản mô tả này có chứa CHIKV- Δ 5nsP3 khi được mã hóa bởi trình tự axit nucleic được xác định bởi SEQ ID NO: 1. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “CHIKV- Δ 5nsP3” được sử dụng thay thế lẫn nhau với “virus CHIKV- Δ 5nsP3”, “hạt CHIKV- Δ 5nsP3”, “hạt virus CHIKV- Δ 5nsP3” hoặc các phiên bản số nhiều của chúng.

Sáng chế đề xuất trong bản mô tả này được phẩm có chứa lượng hữu hiệu của CHIKV- Δ 5nsP3. Theo một khía cạnh, lượng hữu hiệu của virus CHIKV- Δ 5nsP3 gây miễn dịch được xác định là lượng đủ để gây ra kháng thể trung hòa đối với virus Chikungunya. Theo khía cạnh khác, lượng hữu hiệu của virus CHIKV- Δ 5nsP3 gây miễn

dịch được xác định là lượng gây ra đáp ứng miễn dịch ở đối tượng được chủng ngừa mang lại sự miễn dịch bảo vệ chống lại sự lây nhiễm virus Chikungunya. Theo khía cạnh được ưu tiên, lượng hữu hiệu của CHIKV- Δ 5nsP3 được xác định là ít nhất 10^2 , ít nhất 10^3 , ít nhất 10^4 , ít nhất 10^5 , ít nhất 10^6 , tốt hơn là ít nhất 10^3 hạt CHIKV- Δ 5nsP3 gây miễn dịch. Theo một khía cạnh, hạt CHIKV- Δ 5nsP3 gây miễn dịch được xác định là hạt CHIKV- Δ 5nsP3 mà biểu hiện protein cấu trúc E2 như được xác định bởi trình tự polypeptit trong SEQ ID NO: 2. Theo một khía cạnh, protein cấu trúc E2 chứa một hoặc nhiều đột biến điểm mà không ảnh hưởng đến khả năng gây miễn dịch của virus, tức là, không làm giảm khả năng gây miễn dịch. Theo một phương án, đột biến điểm không ảnh hưởng đến khả năng gây miễn dịch của virus có thể là ở các axit amin 232 và/hoặc 247 của protein E2, chẳng hạn như H232Y và/hoặc E247K. Theo một phương án, protein cấu trúc E2 của CHIKV- Δ 5nsP3 chứa không nhiều hơn khoảng mười đột biến điểm. Theo một phương án, protein cấu trúc E2 của CHIKV- Δ 5nsP3 chứa không nhiều hơn 9, 8, 7, 6, 5 hoặc 4 đột biến điểm. Theo phương án được ưu tiên, protein cấu trúc E2 của CHIKV- Δ 5nsP3 chứa ba hoặc ít hơn ba đột biến điểm, tốt nhất là chỉ một hoặc hai đột biến điểm.

Như được xác định trong bản mô tả này, CHIKV- Δ 5nsP3 gây miễn dịch là CHIKV- Δ 5nsP3 mà có khả năng kích thích đáp ứng miễn dịch hữu hiệu *in vivo* khi được phân phối ví dụ ở liều lượng bằng khoảng 3×10^4 TCID₅₀, tức là, đáp ứng miễn dịch mà ở đó kháng thể trung hòa được tạo ra đủ để làm giảm hoặc ngăn ngừa các dấu hiệu hoặc triệu chứng của bệnh virus Chikungunya. Theo phương án được ưu tiên, CHIKV- Δ 5nsP3 gây miễn dịch như được xác định trong bản mô tả này là CHIKV- Δ 5nsP3 biểu hiện protein cấu trúc E2 theo trình tự axit amin được cung cấp bởi SEQ ID NO: 2. Theo phương án được ưu tiên khác, CHIKV- Δ 5nsP3 gây miễn dịch như được xác định trong bản mô tả này được xác định bởi trình tự polynucleotit theo SEQ ID NO: 1. Theo định nghĩa thay thế hoặc bổ sung, CHIKV- Δ 5nsP3 gây miễn dịch theo sáng chế này kích thích tạo ra kháng thể có khả năng trung hòa ở đối tượng được gây miễn dịch, tức là, sự trung hòa virus Chikungunya trong thử nghiệm *in vitro* bằng ít nhất 50%, tốt hơn là ít nhất 60%, tốt hơn là ít nhất 70%, tốt hơn nữa là ít nhất 80%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 90%, tốt nhất là ít nhất 95% tại dịch pha loãng huyết thanh 1:80 hoặc cao hơn.

Như được xác định trong bản mô tả này, CHIKV- Δ 5nsP3 không gây miễn dịch là CHIKV- Δ 5nsP3 gây ra hàm lượng của kháng thể trung hòa ở đối tượng được chủng ngừa không đủ để ngăn ngừa các dấu hiệu hoặc triệu chứng của bệnh virus Chikungunya. Theo

phương án được ưu tiên, CHIKV- Δ 5nsP3 không gây miễn dịch là CHIKV- Δ 5nsP3 biểu hiện protein cấu trúc E2 có ít nhất là một sự thể axit amin, đặc biệt là sự thể axit amin ở protein cấu trúc E2, đặc biệt là sự thể E168K và/hoặc G55R, cụ thể là sự thể E168K. CHIKV- Δ 5nsP3 không gây miễn dịch còn được xác định là gây ra kháng thể ở đối tượng được gây miễn dịch mà thể hiện khả năng kém để trung hòa sự lây nhiễm tế bào bằng virus Chikungunya (kiểu đại hoặc đã giảm độc lực) trong thử nghiệm *in vitro*. Cụ thể là, CHIKV- Δ 5nsP3 không gây miễn dịch được xác định là gây ra hàm lượng của kháng thể trung hòa ở đối tượng được gây miễn dịch mà tạo ra ít hơn 60%, ít hơn 50%, ít hơn 40%, ít hơn 30%, ít hơn 20%, đặc biệt là ít hơn 10%, sự trung hòa virus Chikungunya trong thử nghiệm trung hòa *in vitro* tại dịch pha loãng huyết thanh 1:80 hoặc cao hơn.

Theo khía cạnh khác, lượng hữu hiệu của CHIKV- Δ 5nsP3 được xác định là lượng đủ để gây ra kháng thể trung hòa kháng virus Chikungunya kiểu đại. Theo một khía cạnh, được phẩm là được phẩm hai-liều. Theo khía cạnh được ưu tiên, được phẩm là được phẩm một-liều. Theo khía cạnh được ưu tiên, được phẩm có chứa ít nhất 10^2 , ít nhất 10^3 , ít nhất 10^4 , ít nhất 10^5 , ít nhất 10^6 , tốt hơn là trong khoảng từ khoảng 10^3 đến 10^5 hạt virus CHIKV- Δ 5nsP3 tổng số, đặc biệt là khoảng 10^3 hoặc 10^4 CHIKV- Δ 5nsP3 bao gồm toàn bộ tập hợp của các hạt có hoặc không có đột biến điểm, đặc biệt là đột biến điểm làm giảm-khả năng gây miễn dịch. Theo khía cạnh được ưu tiên, được phẩm có chứa lượng có thể phát hiện của CHIKV- Δ 5nsP3 không gây miễn dịch như được xác định trong bản mô tả này; tốt hơn là CHIKV- Δ 5nsP3 không gây miễn dịch có ít nhất là một đột biến điểm so với protein E2 kiểu đại như được xác định bởi SEQ ID NO: 2.

Theo phương án được ưu tiên, được phẩm có chứa CHIKV- Δ 5nsP3 và có chứa lượng tăng của (các) biến thể không gây miễn dịch của CHIKV- Δ 5nsP3, ví dụ so với hợp phần vắc xin có chứa CHIKV- Δ 5nsP3 được tạo ra trong tế bào BHK-21 như được sử dụng trong các nghiên cứu ở chuột được mô tả trong tài liệu Hallengård D, *et al.* 2014, ở trên, nhưng vẫn có chứa các hạt gây miễn dịch của CHIKV- Δ 5nsP3 đủ để tạo ra sự miễn dịch bảo vệ ở đối tượng được chủng ngừa. Ví dụ, được phẩm có thể có chứa (i) CHIKV- Δ 5nsP3 biểu hiện protein cấu trúc E2 như được xác định bởi trình tự polypeptit trong SEQ ID NO: 2 ở lượng đủ để tạo ra sự miễn dịch bảo vệ ở đối tượng được chủng ngừa; (ii) lượng tăng của CHIKV- Δ 5nsP3 có ít nhất một đột biến ở protein cấu trúc E2 này, ví dụ so với hợp phần vắc xin có chứa CHIKV- Δ 5nsP3 được tạo ra trong BHK-21 như được

sử dụng trong các nghiên cứu ở chuột được mô tả trong tài liệu Hallengård D, *et al.* 2014, ở trên; và (iii) tùy ý là tá được được dụng.

Đã chứng minh được trong bản mô tả này rằng sự tạo ra CHIKV-Δ5nsP3 bằng cách cấy chuyển liên tiếp năm hoặc hơn năm lần ở các tế bào Vero dẫn đến mức độ không đồng nhất trình tự cao, cụ thể là ở protein cấu trúc E2 (xem ví dụ Ví dụ 2 dưới đây). Ví dụ, các đột biến E168K và/hoặc G55R của protein E2 thường xuất hiện lúc cấy chuyển 5 (xem ví dụ **Bảng 3** dưới đây), và cả hai đều có liên quan đến sự giảm khả năng gây miễn dịch. Theo đó, sự tạo ra CHIKV-Δ5nsP3 bằng cách sử dụng năm hoặc hơn năm lần cấy chuyển ở các tế bào Vero như được mô tả trong tài liệu Hallengård D, *et al.* 2014 ở trên có thể dẫn đến một cách bất lợi hàm lượng cao của thể đột biến không gây miễn dịch của CHIKV-Δ5nsP3 (chẳng hạn như E168K[E2]) trong hợp phần vắc xin. Ngược lại, đã chứng minh được dưới đây rằng tính không đồng nhất trình tự ở protein cấu trúc E2 sau ít hơn năm lần cấy chuyển là thấp hơn nhiều (xem ví dụ Ví dụ 3 - mặc dù đột biến E168K có mặt sau ba lần cấy chuyển, tần suất của nó chỉ là 18%).

Theo đó, theo một khía cạnh được phẩm có chứa (i) CHIKV-Δ5nsP3; và (ii) tùy ý là tá được được dụng; trong đó ít nhất 30% hạt CHIKV-Δ5nsP3 có mặt trong được phẩm biểu hiện protein cấu trúc E2 như được xác định bởi trình tự polypeptit trong SEQ ID NO: 2. Theo phương án này, ít nhất 30% hạt CHIKV-Δ5nsP3 là các thể không đột biến đối với protein cấu trúc E2, tức là biểu hiện protein cấu trúc E2 trong SEQ ID NO: 2. Nói cách khác, tần suất của sự không đồng nhất trình tự (tức là hạt CHIKV-Δ5nsP3 đột biến biểu hiện ít nhất là một đột biến ở protein cấu trúc E2 trong SEQ ID NO: 2) là 70% hoặc ít hơn. Trừ khi có chỉ dẫn khác, khi đề cập đến “CHIKV-Δ5nsP3” hoặc “hạt CHIKV-Δ5nsP3” nói chung dự định rằng bao hàm cả dạng không đột biến và dạng đột biến của CHIKV-Δ5nsP3, tức là CHIKV-Δ5nsP3 biểu hiện protein cấu trúc E2 trong SEQ ID NO: 2 và CHIKV-Δ5nsP3 biểu hiện protein cấu trúc E2 có một hoặc nhiều đột biến trong SEQ ID NO: 2. Theo một phương án, protein cấu trúc E2 của CHIKV-Δ5nsP3 chứa không nhiều hơn khoảng mười đột biến điểm. Theo một phương án, protein cấu trúc E2 của CHIKV-Δ5nsP3 chứa không nhiều hơn 9, 8, 7, 6, 5 hoặc 4 đột biến điểm. Theo phương án được ưu tiên, protein cấu trúc E2 của CHIKV-Δ5nsP3 chứa ba hoặc ít hơn ba đột biến điểm, tốt nhất là chỉ một hoặc hai đột biến điểm.

Theo các phương án được ưu tiên, ít nhất 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% hạt CHIKV- Δ 5nsP3 có mặt trong dược phẩm là các thể không đột biến, tức là biểu hiện protein cấu trúc E2 như được xác định bởi trình tự polypeptit trong SEQ ID NO: 2.

Theo một khía cạnh, dược phẩm có chứa (i) CHIKV- Δ 5nsP3; và (ii) tùy ý là tá dược được dụng; trong đó ít hơn 70% hạt CHIKV- Δ 5nsP3 có mặt trong dược phẩm biểu hiện protein cấu trúc E2 có một hoặc nhiều đột biến đối với trình tự polypeptit trong SEQ ID NO: 2.

Theo một khía cạnh, dược phẩm có chứa (i) CHIKV- Δ 5nsP3; và (ii) tùy ý là tá dược được dụng; trong đó ít hơn 70% hạt CHIKV- Δ 5nsP3 có mặt trong dược phẩm biểu hiện protein cấu trúc E2 có đột biến E168K ở trình tự polypeptit trong SEQ ID NO: 2.

Theo phương án được ưu tiên, các đột biến (ví dụ đột biến E168K) ở protein cấu trúc E2 có mặt ở tần suất là 70% hoặc ít hơn, ví dụ, ít hơn 70% hạt CHIKV- Δ 5nsP3 tổng số có chứa một hoặc nhiều đột biến (hoặc đột biến E168K) và 30% hoặc lớn hơn của các hạt CHIKV- Δ 5nsP3 tổng số biểu hiện protein cấu trúc E2 không đột biến hoặc protein cấu trúc E2 không có chứa đột biến E168K.

Theo phương án được ưu tiên, ít hơn 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2% hoặc 1% hạt CHIKV- Δ 5nsP3 có mặt trong dược phẩm biểu hiện protein cấu trúc E2 có một hoặc nhiều đột biến (chẳng hạn như, ví dụ, E168K) đối với trình tự polypeptit trong SEQ ID NO: 2. Ví dụ, dược phẩm có thể có chứa 1-70%, 1-50%, 1-30%, 1-20%, 5-70%, 5-50%, 5-30%, 5-20%, 10-70%, 10-50%, 10-30% hoặc 10-20% hạt đột biến (tức là hạt CHIKV- Δ 5nsP3 biểu hiện protein cấu trúc E2 có một hoặc nhiều đột biến (chẳng hạn như, ví dụ, E168K) đối với trình tự polypeptit trong SEQ ID NO: 2), so với tổng số các hạt CHIKV- Δ 5nsP3 (đột biến và không đột biến) có mặt trong dược phẩm. Theo một phương án, các hạt CHIKV- Δ 5nsP3 biểu hiện protein cấu trúc E2 có đột biến E168K còn có chứa đột biến mà giảm thiểu sự mất khả năng gây miễn dịch do đột biến E168K mang lại. Theo một phương án, đột biến là ở protein nsP1, đặc biệt là ở gốc A38. Theo phương án được ưu tiên, các hạt CHIKV- Δ 5nsP3 biểu hiện protein cấu trúc E2 có đột biến E168K cũng biểu hiện nsP1 có đột biến A38S.

Cũng được đề xuất trong bản mô tả này là quy trình sản xuất được phẩm theo sáng chế, bao gồm các bước 1) nuôi cấy virus CHIKV- $\Delta 5nsP3$ trên dòng tế bào, và 2) làm giảm thiểu sự có mặt của đột biến làm giảm-khả năng gây miễn dịch của virus CHIKV- $\Delta 5nsP3$. Theo một phương án, virus CHIKV- $\Delta 5nsP3$ gây miễn dịch được nhân giống trong dòng tế bào được chọn từ nhóm gồm có dòng tế bào EB66, dòng tế bào Vero, dòng tế bào Vero- α His, dòng tế bào HeLa, dòng tế bào HeLa-S3, dòng tế bào 293, dòng tế bào PC12, dòng tế bào CHO, dòng tế bào 3T3, dòng tế bào PerC6, dòng tế bào MDSK, dòng tế bào nguyên bào sợi phôi gà, dòng tế bào vịt và dòng tế bào gia cầm lưỡng bội. Theo một số phương án, dòng tế bào này là dòng tế bào vịt. Theo một số phương án, dòng tế bào này là dòng tế bào gia cầm lưỡng bội. Theo một số phương án, dòng tế bào này là dòng tế bào EB66. Theo phương án được ưu tiên, dòng tế bào này là dòng tế bào Vero.

Theo một phương án, sự có mặt của đột biến làm giảm-khả năng gây miễn dịch được làm giảm thiểu bằng cách cấy chuyển CHIKV- $\Delta 5nsP3$ ít hơn 5 lần, tốt hơn là ít hơn 4 lần, tốt hơn là ít hơn 3 lần, tốt hơn là ít hơn 2 lần, tốt hơn nữa là chỉ một lần, tốt nhất là nhiều nhất 3 lần. Như được sử dụng trong bản mô tả này, số lượng cấy chuyển dùng để chỉ số lượng cấy chuyển *in vitro* sau khi cứu sinh virus (P0). Theo phương án được ưu tiên, virus được cấy chuyển trên tế bào Vero. Theo một khía cạnh, virus được sinh trưởng ở nhiệt độ tối ưu. Theo phương án được ưu tiên, nhiệt độ tối ưu này nằm trong khoảng từ khoảng 28°C đến 37°C, tốt hơn là khoảng 35°C.

Theo một phương án, môi trường nuôi cấy tế bào chủ được lây nhiễm bằng CHIKV- $\Delta 5nsP3$ tại MOI tối ưu. Theo một khía cạnh, MOI tối ưu được xác định là MOI đủ thấp để không cần lượng dư của dịch nuôi cấy ngân hàng giống virus hoạt động, nhưng đủ cao để làm giảm thiểu đột biến làm giảm-khả năng gây miễn dịch như được mô tả trong bản mô tả này. Theo khía cạnh được ưu tiên, MOI tối ưu hóa là MOI nhỏ hơn 0,1, tốt hơn là MOI nằm trong khoảng từ khoảng 0,1 đến 0,001, tốt hơn nữa là MOI nằm trong khoảng từ khoảng 0,09 đến 0,0011, thậm chí tốt hơn nữa là MOI nằm trong khoảng từ khoảng 0,05 đến 0,005, tốt nhất là MOI bằng khoảng 0,01. Theo một khía cạnh, hợp lưu tế bào chủ được đánh giá trước khi lây nhiễm. Theo một khía cạnh, hợp lưu tế bào chủ nằm trong khoảng từ khoảng 20 đến 90%, tốt hơn là trong khoảng từ khoảng 30 đến 75%, tốt hơn nữa là trong khoảng từ khoảng 40 đến 60%, đặc biệt là trong khoảng từ khoảng 50 đến 60%. Theo một khía cạnh, môi trường nuôi cấy tế bào được lây nhiễm ở thời điểm tối ưu sau khi cấy tế bào chủ; tức là, trong khoảng từ ngày 2 đến ngày 5 sau khi

cây tế bào chủ, tốt hơn là trong khoảng 4 ngày sau khi cây tế bào chủ. Theo một khía cạnh, các hạt virus được thu hoạch trong khoảng từ ngày một đến ngày 6 sau khi lây nhiễm tế bào, tốt hơn là trong khoảng từ ngày một đến ngày 4, tốt hơn là vào ngày một hoặc ngày 2 sau khi lây nhiễm tế bào, tốt hơn là vào cả hai ngày một và ngày 2 sau khi lây nhiễm tế bào.

Theo một khía cạnh, đột biến làm giảm-khả năng gây miễn dịch là đột biến điểm ở vị trí bất kỳ trong hệ gen của CHIKV- $\Delta 5nsP3$ như được xác định bởi trình tự polynucleotit trong SEQ ID NO: 1. Theo một phương án, đột biến làm giảm-khả năng gây miễn dịch có mặt trong hệ gen ở vị trí không phải protein E2. Theo phương án được ưu tiên, đột biến làm giảm-khả năng gây miễn dịch được định vị ở protein E2, tốt hơn là ở gốc axit amin 55 và/hoặc 168, ví dụ, đột biến G55R và/hoặc E168K, đặc biệt là E168K. Theo một số phương án, đột biến làm giảm-khả năng gây miễn dịch như được mô tả trong bản mô tả này được giảm thiểu hoặc “cứu sinh” bằng các đột biến khác trong hệ gen. Theo một phương án, đột biến làm giảm thiểu E168K là đột biến A38S của protein phi cấu trúc 1 (nsP1).

Theo một khía cạnh, tần suất của đột biến E168K của protein E2 của CHIKV- $\Delta 5nsP3$ là ít hơn 90%, ít hơn 80%, ít hơn 70%, ít hơn 60%, ít hơn 50%, ít hơn 40%, ít hơn 30%, ít hơn 20%, ít hơn 10%, tốt hơn là ít hơn 50% trong toàn bộ tập hợp CHIKV- $\Delta 5nsP3$ thu hoạch được.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất CHIKV- $\Delta 5nsP3$ gây miễn dịch có thể thu được bằng quy trình được đề xuất trong bản mô tả này. Theo một khía cạnh khác, sáng chế này đề xuất được phẩm có chứa CHIKV- $\Delta 5nsP3$ gây miễn dịch có thể thu được bằng quy trình được đề xuất trong bản mô tả này.

Các khía cạnh của sáng chế đề xuất việc sử dụng quy trình được mô tả trong bản mô tả này để sản xuất hợp phần để gây miễn dịch chống lại sự lây nhiễm virus Chikungunya. Theo phương án được ưu tiên, hợp phần là vắc xin. Theo một phương án, vắc xin được dùng cho đối tượng một lần, hai lần hoặc ba lần hoặc nhiều hơn. Theo một khía cạnh, hạt virus CHIKV- $\Delta 5nsP3$ được phân lập từ đối tượng được gây miễn dịch có biên dạng đột biến điểm tương tự với hợp phần vắc xin được dùng, cụ thể là đối với đột biến điểm ở protein cấu trúc E2. Theo một phương án, vắc xin được dùng một lần hoặc hai lần. Theo phương án được ưu tiên, vắc xin được dùng chỉ một lần; ví dụ, vắc xin một-

liều. Theo một khía cạnh, chủng ngừa tăng cường được dùng tùy ý. Theo các khía cạnh được ưu tiên nhất định, được phẩm được đề xuất ở dạng khô lạnh.

Các khía cạnh khác đề xuất hợp phần có chứa các hạt virus có thể thu được bằng quy trình được mô tả trong bản mô tả này để điều trị và/hoặc ngăn ngừa sự lây nhiễm virus Chikungunya. Theo một khía cạnh, các hợp phần là để sử dụng trong phương pháp kích thích đáp ứng miễn dịch ở đối tượng và/hoặc trong phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa sự lây nhiễm virus Chikungunya. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “ngăn ngừa” cũng có nghĩa là “bảo vệ khỏi”. Sự lây nhiễm virus Chikungunya theo một khía cạnh có thể là do kiểu gen ở Tây Phi, Đông/Trung/Nam Phi (ECSA) và/hoặc Châu Á của virus Chikungunya gây ra.

Chế phẩm virus được tạo ra bằng cách sử dụng quy trình bất kỳ trong số các quy trình được mô tả trong bản mô tả này có thể còn được đưa vào các bước xử lý bổ sung, bao gồm bước lọc bổ sung và/hoặc sự làm khô lạnh. Chế phẩm virus có thể được đưa vào phân tích độ tinh sạch của chế phẩm. Ví dụ, chế phẩm virus có thể được đánh giá về sự có mặt của tạp chất và chất gây ô nhiễm, chẳng hạn như, ví dụ, ADN hệ gen tế bào chủ, và/hoặc protein tế bào chủ. Có thể đánh giá độ tinh sạch của chế phẩm virus bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực, chẳng hạn như sắc ký loại trừ kích thước (SEC), mật độ quang ở các bước sóng khác nhau, điện di gel protein (ví dụ, SDS-PAGE), Thẩm tách Western, ELISA, PCR, và/hoặc qPCR.

Theo một số phương án, chế phẩm virus được đánh giá về tạp chất hoặc chất gây ô nhiễm còn lại. Theo một số phương án, lượng tạp chất hoặc chất gây ô nhiễm còn lại được so với lượng tạp chất hoặc chất gây ô nhiễm ở giai đoạn đầu trong quy trình tinh chế, chẳng hạn như, ví dụ, ngay sau khi thu hoạch virus. Theo một số phương án, sự giảm tương đối của tạp chất trong chế phẩm virus cuối cùng là trong khoảng từ 60 đến 95% tương quan với sự có mặt của tạp chất ở giai đoạn đầu trong quy trình tinh chế. Theo một số phương án, sự giảm tương đối của tạp chất trong chế phẩm virus cuối cùng xấp xỉ 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, hoặc 95%. Theo một số phương án, chế phẩm virus cuối cùng chứa ít hơn 5% tạp chất hoặc chất gây ô nhiễm. Theo một số phương án, chế phẩm virus cuối cùng chứa ít hơn 5, 4, 3, 2, 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, hoặc ít

hơn 0,1% tạp chất. Theo phương án được ưu tiên, chế phẩm virus cuối cùng chứa ít hơn 1% tạp chất.

Quy trình bất kỳ trong số các quy trình được mô tả trong bản mô tả này có thể được sử dụng trong việc sản xuất hợp phần có chứa virus đã tinh chế để dùng cho đối tượng. Theo một số phương án, đối tượng là đối tượng thuộc động vật có vú, chẳng hạn như người hoặc động vật không phải người, bao gồm gia súc, thú cưng hoặc động vật làm bạn. Theo một số phương án, hợp phần được dùng cho đối tượng cần gây miễn dịch kháng virus hoặc virus tương tự như virus của chế phẩm virus. Theo một số phương án, các chế phẩm virus hoặc hợp phần có chứa các virus đã tinh chế bằng cách sử dụng quy trình được mô tả trong bản mô tả này là để điều trị hoặc ngăn ngừa sự lây nhiễm bằng virus hoặc virus tương tự như virus của chế phẩm virus. Theo phương án được ưu tiên, các chế phẩm virus hoặc hợp phần có chứa các virus đã tinh chế bằng cách sử dụng quy trình được mô tả trong bản mô tả này là để điều trị hoặc ngăn ngừa sự lây nhiễm virus Chikungunya, cụ thể là sự lây nhiễm virus Chikungunya là do kiểu gen ở Tây Phi, Đông/Trung/Nam Phi (ECSA) và/hoặc Châu Á của virus Chikungunya gây ra.

Dược phẩm CHIKV-Δ5nsP3 hoặc virus CHIKV-Δ5nsP3 đã tinh chế bằng cách sử dụng quy trình được mô tả trong bản mô tả này có thể được dùng cho đối tượng bằng đường dùng bất kỳ đã biết trong lĩnh vực. Theo một số phương án, các chế phẩm hoặc hợp phần có thể được dùng thông qua đường dùng thông thường, chẳng hạn như ngoài đường tiêu hóa hoặc qua đường miệng. Như được sử dụng trong bản mô tả này, việc dùng “ngoài đường tiêu hóa” bao gồm, mà không giới hạn ở, dưới da, trong da, nội bì, trong tĩnh mạch, trong cơ, trong khớp, trong màng bụng, nội tủy mạc hoặc bằng cách truyền.

Trừ khi được định nghĩa theo cách khác trong bản mô tả này, các thuật ngữ về khoa học và kỹ thuật được sử dụng liên quan đến sáng chế sẽ có nghĩa như thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Ngoài ra, trừ khi ngữ cảnh đòi hỏi có nghĩa khác, các thuật ngữ số ít bao gồm nghĩa số nhiều và các thuật ngữ số nhiều bao gồm nghĩa số ít. Các phương pháp và kỹ thuật trong sáng chế thường được tiến hành theo phương pháp thông thường đã biết rõ trong lĩnh vực. Thường là, các danh pháp được sử dụng liên quan đến, và các kỹ thuật về hóa sinh, enzym học, sinh học phân tử và sinh học tế bào, vi sinh vật học, virus học, nuôi cấy tế bào hoặc nuôi cấy mô, di truyền học và hóa

học protein và hóa học nucleic được mô tả trong bản mô tả này là các danh pháp và kỹ thuật đã biết rõ và thường được sử dụng trong lĩnh vực. Các phương pháp và kỹ thuật trong sáng chế thường được tiến hành theo phương pháp thông thường đã biết rõ trong lĩnh vực và như được mô tả trong các tài liệu tham khảo chung và tài liệu tham khảo cụ thể hơn khác nhau được viện dẫn và thảo luận trong toàn bộ bản mô tả này trừ khi có chỉ dẫn khác.

Bảng A-1. Các chữ viết tắt

Chữ viết tắt	Định nghĩa	Chữ viết tắt	Định nghĩa
CHIKV	Virus Chikungunya	MVSB hoặc P1-MVSB	Ngân hàng giống virus trưởng thành (Cây chuyển 1 sau cứu sinh)
CHIKV-Δ5nsP3	CHIKV có đột biến làm khuyết đã xác định ở nsP3 (SEQ ID NO: 1)	WVSB hoặc P2-WVSB	Ngân hàng giống virus hoạt động (Cây chuyển 2 sau cứu sinh)
ECSA	Đông-trung nam Phi	VRP	Hạt sao chép virus
Protein E (1, 2, 3)	Protein vỏ	TCID ₅₀	Liều lượng lây nhiễm nuôi cấy mô
Protein C	Protein capsit	LR-VRP	VRP dựa trên thể phân lập CHIKV La Reunion
Protein 6K	Protein 6 kilodalton	BHK(-21)	Tế bào thận chuột đồng con
nsP	Protein phi-cấu trúc	MOI	Bội số lây nhiễm
MEM	Môi trường thiết yếu tối thiểu	M	Triệu
EMEM	MEM của Eagle	T75, T150, T175	Bình thót cổ T 75, 150, 175 cm ²
FBS	Huyết thanh thai bò	RB850	Chai hình ống lăn 850 cm ²
PBS	Nước muối đệm photphat	Prob.F	Xác suất như được xác định bằng kiểm định F trong phân tích biến thiên một-chiều
Pfu	Đơn vị tạo mảng	ANOVA	Phân tích biến thiên
PRNT	Thử nghiệm trung hòa sự giảm mảng	DS	Chất thuốc
NGS	Giải trình tự thế hệ kế tiếp	GLuc	Gaussia luxiferaza
h	giờ	GMP	Thực hành sản xuất tốt
d	Ngày	R&D	Nghiên cứu và phát triển
AA	Axit amin	SEC	Sắc ký loại trừ kích thước
PCR	Phản ứng chuỗi polymeraza	SDS-PAGE	Điện di trên gel polyacrylamit-natri dodecyl sulfat

qPCR	PCR định lượng	ELISA	Thử Nghiệm Hấp Thụ Miễn Dịch Liên Kết Enzym
s.c.	Dưới da	w/w	Khối lượng/khối lượng
TSE	Bệnh Não Thở Bọt Biển Có Thở Truyền Nhiễm	ml	Mili lít
p.i.	Sau khi lây nhiễm	CPE	Tác dụng gây bệnh tế bào
PP	Polypropylen	V	Vôn
μ F	Micro-Fara	mM	mili mol
μ m	micro mét	TBS	Nước muối đậm Tris
kDa	kilodalton	NaCl	Natri clorua
mg	mili gam	LR2006-OPY1	Thở phân lập CHIKV La Reunion
ARN	Axit ribonucleic	D-PBS	Nước muối đậm photphat Dulbecco
Anti-anti	Kháng sinh-Kháng nấm	RPM	Vòng trên phút
SINV	Virut Sindbis	RRV	Virut Ross River
SFV	Virut Semliki Forest	MCB	Ngân hàng tế bào trưởng thành
WHO	Tổ Chức Y Tế Thế Giới	ATCC	Bảo Tàng Giống Chuẩn Hoa Kỳ

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Các thử nghiệm ban đầu để sản xuất Chất Thuốc (DS) CHIKV- Δ 5nsP3

Lắp ghép hệ gen CHIKV- Δ 5nsP3 được tổng hợp

Hệ gen virut CHIKV- Δ 5nsP3 được tổng hợp trong năm mảnh ở MWG Eurofins (Đức) và được lắp ghép đầy đủ trong plasmit pMA (vật truyền pMX có tính kháng ampicilin), vật truyền tách dòng tiêu chuẩn. Khung vật truyền pMX được thể hiện trong Fig.1. Tất cả quy trình tách dòng và quy trình điều chế plasmit được tiến hành trong các điều kiện không có TSE bằng cách sử dụng tế bào *E. coli* NEB10 β điện-khả nạp. Chiến lược tách dòng được sử dụng để lắp ghép đầy đủ hệ gen CHIKV- Δ 5nsP3 trong pMA được phác họa trong Fig.3B. Tóm lại, plasmit pMA chứa mảnh 1, gồm nsP1 và một phần của nsP2 (như được thể hiện trong Fig.3A), được tạo mạch thẳng thông qua sự cắt giới hạn *EcoRI/PacI* và mảnh 2 gồm các phần của nsP2 và nsP3 được dung hợp với mảnh 1. Song song với đó, mảnh 3 (gồm nsP4 và C) được dung hợp với mảnh 4 (gồm C và E2) thông qua việc tách dòng *ClaI/PacI*. Trong bước tách dòng thứ ba, các mảnh 3 và 4 được tách dòng thông qua *AgeI/XhoI* và mảnh 5 thông qua *XhoI/PacI* vào pMA được *AgeI/PacI* - tạo mạch thẳng đã chứa các mảnh 1 và 2. Việc tách dòng tạo ra vật truyền

pMA_CHIKV- Δ 5nsP3 mã hóa CHIKV- Δ 5nsP3, như được xác minh bằng cách giải trình tự.

Cứu sinh CHIKV- Δ 5nsP3 từ các tế bào Vero (“cứu sinh virus”)

Để tạo ra hạt virus CHIKV- Δ 5nsP3 từ vật truyền pMA_CHIKV- Δ 5nsP3 được thiết kế trên tế bào Vero (cứu sinh virus), plasmit pMA_CHIKV- Δ 5nsP3 được tạo mạch thẳng bằng cách cắt giới hạn *NotI* và được đưa đi phiên mã *in vitro* bằng cách sử dụng Bộ Kit Ambion's mMessage mMachine SP6 (AM130). Xác nhận tính nguyên vẹn ARN thông qua điện di gel (không được thể hiện). Song song với đó, điều chế các tế bào Vero để xung điện với ARN virus. Tóm lại, các tế bào Vero được tách ra khỏi bình thót cổ nuôi cấy tế bào bằng cách sử dụng TrypLESelect (Gibco) và được rửa hai lần bằng PBS. Tất cả các bước ly tâm được tiến hành ở 300g ở nhiệt độ trong phòng. ARN virus được trộn với 8×10^6 tế bào Vero trong 800 μ l PBS và hỗn hợp tế bào Vero/ ARN được chuyển vào cuvet xung điện 0,4 cm. Tiến hành hai xung ở 850 V, 25 μ F, 200 Ω . Sau khi xung điện, tế bào Vero được giữ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 10 phút và cuối cùng được tái tạo huyền phù trong MEM/ FCS 5%/ Kháng sinh-Kháng nấm (Anti-Anti) 1%/ L-Glutamin 2 mM và được ủ trong bình thót cổ T75 trong thời gian 48 giờ ở nhiệt độ 35°C/CO₂ 5%. Dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy tế bào chứa CHIKV- Δ 5nsP3 cứu sinh (cấy chuyển 0; P0) được thu hoạch và ly tâm ở 3.000g trong thời gian 10 phút ở nhiệt độ 4°C. Hiệu giá virus được xác định bằng mảng và thử nghiệm TCID₅₀ trên tế bào Vero. CHIKV- Δ 5nsP3 cứu sinh (P0) được lưu trữ ở nhiệt độ -80°C. Cấu trúc hệ gen của ứng viên vắc xin virus CHIKV- Δ 5nsP3 thu được theo đó, cũng được gọi là VLA1553, được thể hiện trong Fig.2.

Sự xác minh trình tự hệ gen virus CHIKV- Δ 5nsP3

Để xác minh trình tự hệ gen virus, axit nucleic virus được tách chiết khỏi dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy tế bào thu được bằng cách sử dụng Bộ Kit Quay Virus QIAamp MinElute (QIAGEN #57704) và thực hiện tổng hợp cADN bằng cách sử dụng Hệ Thống Tổng Hợp Sợi-Thứ Nhất SuperScript III (Life Technologies, Catalog# 18080-051) bằng cách sử dụng các hexamer ngẫu nhiên. PCR có Polymeraza Độ Tin Cậy Cao Phusion được tiến hành với các môi khuếch đại các vùng chồng lên nhau của hệ gen CHIKV- Δ 5nsP3, và sản phẩm PCR được đưa vào giải trình tự Sanger ở MWG Eurofins, Đức. Các trình tự của cặp môi được sử dụng để PCR và giải trình tự được thể hiện trong Bảng 1.

Bảng 1. Cặp môi được sử dụng để giải trình tự hệ gen CHIKV- Δ 5nsP3.

Cặp Môi	Vị trí giới hạn trình tự môi xuôi (5'-3') (chữ thường)	SEQ ID NO:	Vị trí giới hạn trình tự môi ngược (5'-3') (chữ thường)	SEQ ID NO:
1	ttaggatccGATGGCTGCGTG AGACAC	8	taactcgagCCGTCAGGTCTG TTGAACAT	9
2	ttaggatccTACCACCAGGCG	10	taactcgagCTTTGCCCACTT	11

Cấp Mỗi	Vị trí giới hạn trình tự mỗi xuôi (5'-3') (chữ thường)	SEQ ID NO:	Vị trí giới hạn trình tự mỗi ngược (5'-3') (chữ thường)	SEQ ID NO:
	ATTAAAG		ACTGAAGG	
3	ttaggatccTGCTACAGAAGT CACGCC	12	taactcgagGCCAAAGCGTG AATCAG	13
4	ttaggatccAACAGCTTGAGG ACAGAGCG	14	taactcgagCTCTGTCTCATC ACGTCGG	15
5	ttaggatccAAATTGCAGTCA TAGGAGTCTTC	16	taactcgagAGTACGTTGACG TGCTCTGA	17
6	ttaggatccGTGGGTAAACA ACTGCAA	18	taactcgagGGTTAAAGTCTT CTATCCTCCTGG	19
7	ttaggatccGGATAACCACTG GGATAATAGG	20	taactcgagAGTTGTGAAATT CCTTCTGCC	21
8	ttaggatccCGCAGATAGAAC CAGTGAAC	22	taactcgagCAGCAGCTCTAC TTGGGTC	23
9	ttaggatccAGGAGGGAAAG ACAGGCT	24	taactcgagCCCTCGCCTTCT TCTG	25
10	ttaggatccCAAATAGAAG GAGTGCAAAAAG	26	taactcgagCCTGGAGTTTCT TAAGTAATAGTTGC	27
11	ttaggatccACCGGTCCAGGT CATTTA	28	taactcgagGCAGCAAATTCT TCCCAG	29
12	ttaggatccCCATTCCAGAAC ACACTACAG	30	taactcgagATACCTGATTTC ATCATGGC	31
13	ttaggatccCCTTTGATAAGA GCCAAGATG	32	taactcgagTACAAAGTTATG ACGGGTCCT	33
14	ttaggatccCAACGAACAGG GCTAATTG	34	taactcgagGACCGCTTAAAG GCCAG	35
15	ttaggatccGTGCATGAAAAT CGAAAATG	36	taactcgagTGGTCTTGTGGC TTTATAGACA	37
16	ttaggatccAACCGGAGGAA ACCCTAC	38	taactcgagGTACCGCACCGT CTGG	39
17	ttaggatccAGCTACCTTGCA GCACGT	40	taactcgagCCCACCATCGAC AGG	41
18	ttaggatccCGAGCCGTATAA GTATTGGC	42	taactcgagCGCCGGTGAAG ACCTTAC	43
19	ttaggatccACTACTGTCAGT CACTTTGGAGC	44	taactcgagTACCGGGTTTGT TGCTATTT	45
20	ttaggatccCACAACCTGGTAC TGCAGAGAC	46	taactcgagGCGTAGCCCTTT GATCTATAG	47
21	ttaggatccGGTGCTATGCGT GTCGT	48	taactcgagATCTCCTACGTC CCTGTGGG	49

Sự cấy chuyển CHIKV-Δ5nsP3 trên tế bào Vero

Sau khi cứu sinh CHIKV-Δ5nsP3, các tế bào Vero được lây nhiễm và virus được cấy chuyển liên tiếp trong ba bản sao (xem **Bảng 2**). Để cấy chuyển, các tế bào Vero được cấy trong bình thót cổ T150 và được sinh trưởng đến hợp lưu (1-3 ngày) được rửa hai lần bằng 1x DPBS trước khi bổ sung 20 ml môi trường lây nhiễm (EMEM không có

huyết thanh). Chất để chủng được bổ sung trực tiếp vào bình thót cổ ở thể tích được chỉ định và tế bào được ủ trong thời gian 24 giờ ở nhiệt độ 35°C, CO₂ 5%. Thực hiện cấy chuyển trong ba bản sao (A, B và C) với sự lây nhiễm tế bào Vero tại MOI bằng 0,01 đối với cấy chuyển lần thứ nhất từ cứu sinh virus (P0). Mẻ thu 20 ml được chuyển vào ống PP 50 ml 24 giờ sau lây nhiễm, mảnh vỡ tế bào được loại bỏ bằng cách ly tâm (3000g, 10 phút) và dịch nổi bề mặt được chuyển vào ống PP 50 ml mới. Bổ sung dung dịch sucroza 49% (khối lượng/khối lượng) đến nồng độ cuối cùng bằng 10% (khối lượng/khối lượng) và các phần phân ước 1 ml của mẻ thu đã làm ổn định được lưu trữ ở nhiệt độ ≤ -70°C.

Các lần lây nhiễm tiếp được thực hiện bằng mẻ thu không có sucroza. Tiến hành lây nhiễm bằng cách sử dụng các thể tích khác nhau của mẻ thu được tính đại khái dựa trên tác dụng gây bệnh tế bào được quan sát thấy trong cấy chuyển trước đó và trong các bản sao song song. Thể tích mẻ thu được sử dụng để lây nhiễm thay đổi trong khoảng từ 5 µl đến 1 ml. Tiếp theo sự lây nhiễm là mẻ thu đơn lẻ sau 24 giờ. Lưu ý rằng MOI được sử dụng để tạo ra các cấy chuyển 2-16 được xác định theo cách hồi cứu sau khi có các kết quả TCID₅₀, thu được khoảng giới hạn rộng (“không được kiểm soát”) của các MOI trong suốt thí nghiệm (Xem **Bảng 2**). Quy trình này được tiến hành lên đến 16 cấy chuyển trong ba bản sao song song (các bản sao A, B và C) cho phép quan sát có hệ thống các tham số khác nhau trong quá trình thích ứng của CHIKV-Δ5nsP3 với sự cấy chuyển tế bào Vero. Trong quá trình thí nghiệm này, sản lượng (TCID₅₀/ml), thể tích lây nhiễm, số lượng tế bào Vero trên mỗi bình thót cổ, số cấy chuyển tế bào Vero và tác dụng gây bệnh tế bào (CPE) được ghi lại. Bội số lây nhiễm (MOI) được xác định theo cách hồi cứu dựa trên TCID₅₀ đã đo và cũng được ghi lại. Cấy chuyển CHIKV-Δ5nsP3 được đánh giá đồng thời về kích thước mảng trong tất cả ba bản sao.

Bảng 2. Sự cấy chuyển liên tiếp CHIKV-Δ5nsP3 trên tế bào Vero sau khi cứu sinh virus, được tiến hành trong ba bản sao. Dữ liệu được thể hiện bao gồm sản lượng thu hoạch (24 giờ; TCID₅₀), thể tích lây nhiễm (ml), số lượng tế bào/bình thót cổ, số cấy chuyển tế bào Vero, bội số lây nhiễm (MOI) và tác dụng gây bệnh tế bào (CPE) được quan sát thấy lúc 24 giờ sau khi lây nhiễm.

Bản sao A						
Cấy chuyển	TCID ₅₀ /ml	Lây nhiễm (ml)	Tế bào @T150	Cấy chuyển Vero	MOI (TCID ₅₀)	CPE @ 24 giờ
P0	9,77E+06					không có

P1A	2,59E+07	0,02	2,00E+07	149	0,010	50
P2A	1,90E+07	1	2,90E+07	149	0,893	50
P3A	2,92E+07	0,1	2,80E+07	149	0,068	20
P4A	2,14E+08	0,37	2,00E+07	150	0,540	90
P5A	1,01E+08	0,1	2,70E+07	150	0,792	60
P6A	3,50E+08	0,1	2,60E+07	150	0,390	60
P7A	7,43E+08	0,037	1,30E+07	151	0,997	50
P8A	8,02E+08	0,05	1,60E+07	151	2,323	90
P9A	1,51E+09	0,01	2,40E+07	151	0,334	60
P10A	3,60E+09	0,005	1,98E+07	152	0,381	80
P11A	1,88E+09	0,005	1,84E+07	152	0,982	90
P12A	6,94E+08	0,005	1,30E+07	152	0,724	90
P13A	4,22E+09	0,01	1,44E+07	153	0,482	60
P14A	3,05E+09	0,01	1,90E+07	153	2,219	90
P15A	3,03E+09	0,01	2,20E+07	153	1,384	90
P16A	2,91E+09	0,01	1,70E+07	154	1,781	90

Bản sao B

Cấy chuyển	TCID ₅₀ /ml	Lây nhiễm (ml)	Tế bào @T150	Cấy chuyển Vero	MOI (TCID ₅₀)	CPE @ 24 giờ
P0	9,77E+06					không có
P1b	6,47E+07	0,02	2,00E+07	149	0,010	50
P2B	5,32E+07	1	2,90E+07	149	2,232	50
P3B	2,27E+07	0,1	2,80E+07	149	0,190	20
P4B	1,65E+08	0,08	2,00E+07	150	0,091	80
P5B	1,65E+08	0,1	2,70E+07	150	0,613	60
P6B	4,06E+08	0,1	2,60E+07	150	0,636	60
P7B	9,19E+08	0,092	1,30E+07	151	2,875	60
P8B	7,43E+08	0,1	1,60E+07	151	5,744	90
P9B	2,14E+09	0,025	2,40E+07	151	0,774	75
P10B	4,06E+09	0,01	1,98E+07	152	1,080	90
P11B	2,09E+09	0,01	1,84E+07	152	2,214	90
P12B	8,76E+08	0,01	1,30E+07	152	1,608	90
P13B	2,91E+09	0,01	1,44E+07	153	0,609	60
P14B	4,22E+09	0,01	1,90E+07	153	1,530	90
P15B	3,79E+09	0,01	2,20E+07	153	1,917	95
P16B	3,79E+09	0,01	1,70E+07	154	2,232	90

Bản sao C

Cấy chuyển	TCID ₅₀ /ml	Lây nhiễm (ml)	Tế bào @T150	Cấy chuyển Vero	MOI (TCID ₅₀)	CPE @ 24 giờ
P0	9,77E+06					không có
P1C	3,24E+07	0,02	2,00E+07	149	0,010	50
P2C	3,29E+07	1	2,90E+07	149	1,117	50
P3C	2,54E+07	0,1	2,80E+07	149	0,118	20
P4C	1,29E+08	0,15	2,00E+07	150	0,191	90

P5C	4,13E+08	0,1	2,70E+07	150	0,477	60
P6C	5,91E+08	0,1	2,60E+07	150	1,587	60
P7C	1,85E+09	0,185	1,30E+07	151	8,415	70
P8C	4,83E+08	0,2	1,60E+07	151	23,073	90
P9C	1,03E+09	0,1	2,40E+07	151	2,013	90
P10C	5,14E+09	0,015	1,98E+07	152	0,783	90
P11C	1,51E+09	0,015	1,84E+07	152	4,205	90
P12C	1,15E+09	0,015	1,30E+07	152	1,738	90
P13C	4,22E+09	0,01	1,44E+07	153	0,802	65
P14C	3,81E+09	0,01	1,90E+07	153	2,219	90
P15C	1,07E+09	0,01	2,20E+07	153	1,730	90
P16C	2,48E+09	0,01	1,70E+07	154	0,631	90

Xu hướng được quan sát thấy trong quá trình cấy chuyển liên tiếp trong điều kiện MOI “không được kiểm soát”

Trong quá trình CHIKV- Δ 5nsP3 thích ứng với sự cấy chuyển tế bào Vero, đã quan sát thấy rằng tổng sản lượng virus CHIKV- Δ 5nsP3 về cơ bản là tăng cùng với số cấy chuyển tăng trên tế bào Vero như được thể hiện trong **Bảng 2**. Như được thể hiện trong Fig.4A, các cấy chuyển 6 và trở lên thu được hiệu giá tăng xấp xỉ 100-lần so với cứu sinh virus (P0) và các cấy chuyển đầu. Cũng được quan sát thấy sự giảm đồng thời về kích thước mảng CHIKV- Δ 5nsP3 (Fig.4B). Ảnh hưởng của sự cấy chuyển *in vitro* virus Chikungunya kiểu đại lên kích thước mảng ở các dòng tế bào khác đã được mô tả trước đó bởi Gardner CL, và cộng sự (Gardner CL, *et al.*, 2014, ở trên). Sản lượng virus cao là điều được mong muốn cao để tạo ra virus đã bất hoạt trong công nghiệp; tuy nhiên, cũng được quan sát thấy trong bản mô tả này CHIKV- Δ 5nsP3 trở nên ít gây miễn dịch hơn cùng với sự cấy chuyển tăng như được thể hiện trong Fig.4C. Tóm lại, để xác định khả năng gây miễn dịch trong các cấy chuyển khác nhau của CHIKV- Δ 5nsP3 như được tạo ra trong **Bảng 2**, ở trên, nhóm gồm năm con chuột C57Bl/6 được gây miễn dịch một lần dưới da với liều lượng bằng 10^5 TCID₅₀ CHIKV- Δ 5nsP3 cấy chuyển 5 (P5B), cấy chuyển 8 (P8B) hoặc P15 (P15C). CHIKV- Δ 5nsP3 ở P0 (cứu sinh virus), cũng tại 10^5 TCID₅₀, được sử dụng làm đối chứng dương. Tập hợp huyết thanh ngày 21 được đánh giá về khả năng trung hòa CHIKV- Δ 5nsP3 (P0) của chúng trong thử nghiệm PRNT trên tế bào Vero, bằng cách thử nghiệm dịch pha loãng huyết thanh liên tiếp 4-lần nằm trong khoảng từ 1:20 đến 1:327.680. Như được thể hiện trong Fig.4C, khả năng gây miễn dịch ở chuột có CHIKV- Δ 5nsP3 P5B thể hiện khả năng gây miễn dịch dịch chuyển nhỏ so với CHIKV- Δ 5nsP3 (P0) không được cấy chuyển, trong khi đó virus P8B thể hiện khả năng gây miễn dịch về cơ bản là giảm tương đương với virus P15C. (Vì virus P15C không gây miễn dịch, nó có vai trò làm đối chứng âm trong thử nghiệm PRNT sau đó.)

Cuối cùng, sự cấy chuyển CHIKV- Δ 5nsP3 đã chọn được thử nghiệm về độ ổn định di truyền bằng cách giải trình tự Sanger. Khi cấy chuyển CHIKV- Δ 5nsP3 trên tế bào Vero lên đến 16 lần, đã xác minh rằng sự làm khuyết 60 axit amin ở gen nsP3 chịu trách nhiệm về sự giảm độc lực của virus ổn định về mặt di truyền, chỉ ra rằng virus không

quay trở lại kiểu đại, cân nhắc về tính an toàn quan trọng đối với vắc xin sống đã giảm độc lập.

Xu hướng được quan sát thấy trong quá trình cấy chuyển liên tiếp trong điều kiện MOI được kiểm soát

Việc sử dụng MOI cao (ví dụ, cao hơn 0,1) không có lợi cho quy trình có quy mô công nghiệp vì cần quá nhiều nguyên liệu bắt đầu. Trong vấn đề này, việc sử dụng MOI thấp hơn (0,01) qua ba cấy chuyển được thử nghiệm và khả năng gây miễn dịch của các cấy chuyển thu được được xác định. Như được thể hiện trong Fig.5A, ba cấy chuyển từ Bản sao B trong **Bảng 2**, được cấy chuyển trong các điều kiện không được kiểm soát, với các MOI nằm trong khoảng giới hạn từ 0,01 đến 2,23. Từ cấy chuyển 3 (P3B) thu được theo đó, thực hiện các cấy chuyển khác lên đến P6 bằng cách sử dụng MOI bằng 0,01 đối với mỗi cấy chuyển và được thể hiện là “các điều kiện được kiểm soát tại MOI 0,01” trong Fig.5A. Trong điều kiện sử dụng MOI bằng 0,01, khả năng gây miễn dịch của virus thu được bị mất rất nhanh như được thể hiện trong Fig.5B. Lúc cấy chuyển 5, CHIKV-Δ5nsP3 đã được biểu hiện không gây miễn dịch. Kết quả này trái ngược với các kết quả được thấy ở P5B trong Fig.4C, được tạo ra có MOI cao hơn nhiều (xem **Bảng 2**, Bản sao B) và vẫn gây miễn dịch. Sự quan sát thấy này dường như chỉ ra rằng MOI thấp hơn dẫn đến sự chọn lựa nhanh hơn trong quá trình cấy chuyển tế bào Vero đối với các đột biến ảnh hưởng khả năng gây miễn dịch của CHIKV-Δ5nsP3.

Ví dụ 2. Xác định tính không đồng nhất trình tự của CHIKV-Δ5nsP3 mà ảnh hưởng đến khả năng gây miễn dịch

Do sự giảm/sự mất khả năng gây miễn dịch được quan sát thấy (hiệu giá kháng thể trung hòa) và kích thước mảng giảm ở các cấy chuyển CHIKV-Δ5nsP3 cao hơn, điều quan tâm đến là phân tích tính không đồng nhất trình tự có thể xảy ra trong các quần thể virus ở các số cấy chuyển khác nhau. Ngoài ra, điều quan tâm đến là phân tích trình tự của các mảng riêng lẻ của quần thể virus. CHIKV-Δ5nsP3 (P0) không được cấy chuyển không thể hiện tính không đồng nhất trình tự dựa trên sự giải trình tự Sanger. Nhìn chung, với số cấy chuyển tăng sự tăng lên của tính không đồng nhất trình tự đối với tất cả 3 bản sao được quan sát thấy (các Bản sao A, B và C; **Bảng 3**). Trong trường hợp cấy chuyển bản sao C ở cấy chuyển 8 (P8C), quần thể virus vẫn không đồng nhất (tính không đồng nhất trình tự được thể hiện trong **Bảng 3**), trong khi đó cấy chuyển P15C thể hiện quần thể virus đồng nhất hơn với đột biến điểm được xác định (được chỉ ra bằng *). Dữ liệu khả năng gây miễn dịch được thể hiện trong Fig.4C (Ví dụ 1, ở trên) tập trung vào P5B và P8B, thể hiện tính không đồng nhất trình tự ở protein phi-cấu trúc (nsP) CHIKV-Δ5nsP3 và protein vỏ E2 như được thể hiện trong **Bảng 3** dưới đây.

Bảng 3. Tính không đồng nhất trình tự ở CHIKV-Δ5nsP3 ở các cấy chuyển P5, P8 và P15 (các Bản sao A, B và C như được tạo ra trong Bảng 2).

Tính không đồng nhất trình tự được xác định bằng cách giải trình tự Sanger. Để đạt mục đích đó, axit nucleic virus được tách chiết khỏi dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy tế bào thu được bằng cách sử dụng Bộ Kit Quay Virus QIAamp MinElute (Qiagen).

cADN được tổng hợp bằng cách sử dụng Hệ Thống Tổng Hợp Sợi-Thứ Nhất SuperScript III (ThermoFischer) bằng cách sử dụng các hexame ngẫu nhiên. PCR với Polymeraza Độ Tin Cậy Cao Phusion được tiến hành bằng mỗi khuếch đại các vùng chồng lên nhau của hệ gen CHIKV-Δ5nsP3 (**Bảng 1**), được giải trình tự bằng cách giải trình tự Sanger ở MWG Eurofins, Đức. Kết quả đọc cho thấy các kết quả của việc kêu gọi bazơ tự động (>20%) cũng như là tính không đồng nhất được phát hiện bởi các phân tích trực quan của sắc ký đồ giải trình tự. * Đột biến đầy đủ (tức là, 100%) được chỉ ra bằng dấu hoa thị.

	Bản sao A			Bản sao B			Bản sao C		
Gen	P5A	P8A	P15A	P5B	P8B	P15B	P5C	P8C	P15C
	Tính Không Đồng Nhất Trình Tự								
nsP2						L494I			
		G577W	G577W		G577W	G577W		G577W	G577W*
						G621R			
nsP3					R470S	R470S			
nsP4					V113I				
E2		G55R	G55R		G55R	G55R	G55R	G55R	G55R*
					H99Y	H99Y			
	E168K			E168K	E168K	E168K			
			M171V						
		T230I	T230I		T230I	T230I		T230I	T230I*
		H232Y	H232Y						
	E247K						E247K		
		E247D			E247D			E247D	
	A423A			A423A					

Sự mở rộng và giải trình tự các mảng CHIKV-Δ5nsP3 đơn lẻ

Để hiểu rõ ảnh hưởng của các đột biến riêng lẻ lên khả năng gây miễn dịch và do đó phát triển quy trình sản xuất được kiểm soát và có thể tái tạo đối với vắc xin CHIKV-Δ5nsP3 gây miễn dịch cao, các mảng riêng lẻ từ các thể phân lập CHIKV-Δ5nsP3 P5B và P8B được tinh chọn. Tóm lại, dịch pha loãng liên tiếp của CHIKV-Δ5nsP3 P5B và P8B được sử dụng để lây nhiễm tế bào Vero trong thử nghiệm mảng (được mô tả dưới Fig.4) và sau khi ủ 72 giờ, các mảng đơn lẻ có các hình thái khác nhau được tinh chọn (các mảng nhỏ ưu tiên được tinh chọn, bởi vì chúng bắt đầu xuất hiện sau một vài cấy chuyển trên tế bào Vero) và mở rộng thông qua sự tái lây nhiễm tế bào Vero (5×10^5) trong đĩa 6-giếng. Các mẫu CHIKV-Δ5nsP3 khác nhau bắt nguồn từ các mảng đơn lẻ được chọn dựa trên đột biến trong trình tự gen E2 trước khi mở rộng thêm trên tế bào Vero. Các dòng P5B-02, P5B-03, P5B-04, P5B-07, P5B-11, P8B-01 và P8B-05 được mở rộng và tinh chế để thí nghiệm khả năng gây miễn dịch *in vivo*. Các mảng riêng lẻ được mở rộng trên tế bào Vero sinh trưởng trong các Chai Hình Ống Lăn bằng cách sử dụng Chai Hình Ống Lăn 850cm² đơn lẻ có bề mặt CellBIND đối với mỗi thể phân lập. Khi đạt đến hợp lưu, tế bào được rửa hai lần bằng 100ml D-PBS + Ca²⁺ Mg trước khi 100 ml môi trường lây nhiễm (EMEM không có huyết thanh) chứa chất để chủng tại MOI bằng 0,01 được bổ sung và tế bào được ủ trong thời gian 24 giờ ở nhiệt độ 35°C, CO₂ 5%. 100 ml mẻ thu được chuyển vào ống PP 50 ml 24 giờ sau lây nhiễm và mảnh vỡ tế bào được loại

bỏ bằng cách ly tâm, theo sau là lọc 0,2 μ m bằng cách sử dụng thiết bị lọc chân không Steriflip® (Merck). Các mẻ thu virus đã làm sạch riêng lẻ được cô đặc lần thứ nhất bằng cách sử dụng thiết bị Lọc Ly Tâm Amicon®, được lọc pha loãng với đệm TBS và tinh chế bằng protamin sulphat và xử lý Capto™ Core700. Các dòng CHIKV- Δ 5nsP3 đã tinh chế sau đó được sử dụng cho các nghiên cứu khác.

Trình tự hệ gen đầy đủ của các mẫu CHIKV- Δ 5nsP3 được mở rộng, P5B+1 và P8B+1; cụ thể là P5B-02, P5B-03, P5B-04, P5B-07, P5B-11, P8B-01 và P8B-05 như được mô tả ở trên, bắt nguồn từ các mảng đơn lẻ, P5B và P8B, lần lượt, được đánh giá bằng cách giải trình tự Sanger. Các đột biến điểm được quan sát thấy của các mảng riêng lẻ được tóm tắt trong **Bảng 4** và trình tự gen bằng sơ đồ được thể hiện trong Fig.6B và Fig.6D.

Để đánh giá ảnh hưởng của các đột biến điểm cụ thể lên khả năng gây miễn dịch của CHIKV- Δ 5nsP3, huyết thanh chuột ngày 19 từ các con chuột được gây miễn dịch bởi virus bắt nguồn từ mảng riêng lẻ được tạo ra và phân tích trong PRNT. Tóm lại, liều lượng đơn lẻ của CHIKV- Δ 5nsP3 tại liều lượng TCID₅₀ được dự định bằng 10⁵ được dùng dưới da cho chuột C57Bl/6 (10 trong mỗi nhóm điều trị) và tập hợp huyết thanh ngày 19 được phân tích trong thử nghiệm PRNT ở dịch pha loãng liên tiếp 4-lần nằm trong khoảng từ 1:20 đến 1:327.680 về khả năng trung hòa virus của chúng. Virus được trung hòa trong PRNT tương ứng với cây chuyển 2 CHIKV- Δ 5nsP3 (P2, 560 pfu/ml) không thể hiện tính không đồng nhất trình tự và do đó giống về trình tự với CHIKV- Δ 5nsP3 không được cấy chuyển (P0). Hỗn hợp trung hòa (560 pfu/ml CHIKV- Δ 5nsP3 P2 và dịch pha loãng huyết thanh liên tiếp) được ủ trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng và được bổ sung trên tế bào Vero, tiếp theo là ủ trong thời gian 2 giờ. Cuối cùng, lớp phủ methylxenluloza (0,8%) được bổ sung sau đó là ủ trong thời gian 72 giờ. Sự hiển thị mảng được thực hiện sau khi nhuộm tím tinh thể (tím tinh thể 0,5% trong Formaldehyt 5%).

Bảng 4. Đột biến ở các mảng được tinh chọn đơn lẻ của cây chuyển CHIKV- Δ 5nsP3 P5 và P8. Giải trình tự hệ gen CHIKV- Δ 5nsP3 đầy đủ được tiến hành ở MWG Eurofins, Đức, bằng cách sử dụng môi trường trong **Bảng 1**. Tất cả các dòng P5B và P8B lần lượt tương ứng với CHIKV- Δ 5nsP3 P6 (P5B+1) và P9 (P8+1), mở rộng trên tế bào Vero. Hiệu giá PRNT₅₀ được tính trong GraphPad Prism bằng cách sử dụng sự làm khớp phi-tuyến tính – phép tính 3 tham số. Protein virus mà đột biến điểm tương ứng được xác định trong đó được thể hiện trong dấu ngoặc. Giá trị PRNT₅₀ đối với các thể phân lập không gây miễn dịch không thể đo được như được chỉ ra.

Thí nghiệm #	Thẻ phân lập	Cây chuyển	(Các) đột biến điểm	Tính gây miễn dịch	PRN T ₅₀
4399gr1	P0 #1	0	Không có	Đối chứng dương	386
4415gr1	P0 #2	0	Không có	Đối chứng dương	4215
4415gr2	P5B-02	5+1	E168K[E2]+A38S[nsP1]	được giữ lại	373

4415gr3	P5B-03	5+1	H232Y[E2]	được giữ lại	112
4415gr4	P5B-04	5+1	E168K[E2]	bị mất	-
4415gr5	P5B-07	5+1	E168K[E2]	bị mất	-
4415gr6	P5B-11	5+1	E247K[E2]	được giữ lại	219
4415gr7	P8B-01	8+1	H99Y/E168K[E2]+R470S[nsP3]	bị mất	-
4415gr8	P8B-05	8+1	G55R/H232Y[E2]+G577W[nsP2]	bị mất	-
4399gr2	P15C-DS	15	G55R/T230I[E2]+G577W[nsP2]	Đối chứng âm	-

- = không thể đo được

Như có thể được nhìn thấy trong Fig.6A, khả năng gây miễn dịch của CHIKV-Δ5nsP3 P5B-11 và P5B-03, cả hai có đột biến điểm đơn lẻ ở protein E2, E247K và H232Y (Fig.6B), lần lượt, không bị ảnh hưởng khi so với khả năng gây miễn dịch của CHIKV-Δ5nsP3 P0. Khả năng trung hòa của huyết thanh P0 được thể hiện từ hai thí nghiệm ở chuột độc lập (4415; P0 #2 và 4399; P0 #1) phác họa khoảng giới hạn có thể chấp nhận của khả năng gây miễn dịch. Mặt khác, P8B-05, được đặc trưng bởi 3 đột biến điểm, G577W, G55R và H232Y ở nsP2 và E2, lần lượt, không gây miễn dịch ở chuột. Đột biến G55R đã được mô tả trong tài liệu bởi Gardner CL, và cộng sự, dưới dạng là kết quả của cây chuyển CHIKV *in vitro*. Hạt virus bị ảnh hưởng bởi sự phụ thuộc vào liên kết heparan sulfat *in vitro* tăng dẫn đến sự giảm độc lực *in vivo* (Gardner CL, *et al.*, 2014, ở trên).

Như có thể thấy trong Fig.6C, chỉ một trong bốn mẫu CHIKV-Δ5nsP3 bắt nguồn từ các mảng đơn lẻ (P5B-02) vẫn còn gây miễn dịch và được đặc trưng bởi hai đột biến điểm, A38S và E168K ở nsP1 và E2 (Fig.6D), lần lượt. Ngoài ra, P8B-01 có ba đột biến điểm, R470S ở nsP3 và H99Y và E168K ở protein E2, không gây miễn dịch ở chuột và tương đương với đối chứng âm P15C. Mỗi P5B-04 và P5B-07 có đột biến điểm đơn lẻ ở E2, tức là, axit Glutamic 168 bị đột biến thành Lysin (E168K), cũng được thể hiện là có ảnh hưởng trực tiếp lên khả năng gây miễn dịch, bởi vì khả năng trung hòa CHIKV-Δ5nsP3 đã bị mất.

Tóm lại, đã quan sát thấy rằng nhiều đột biến phát sinh trong quá trình cây chuyển trên tế bào Vero được định vị ở protein E2. Một số đột biến điểm trong số các đột biến điểm đã xác định ở protein E2 và/hoặc các phần khác của hệ gen về cơ bản là không ảnh hưởng đến khả năng gây miễn dịch của virus; cụ thể là đột biến H232Y[E2] và đột biến E247K[E2]. Tuy nhiên, một số đột biến trong số các đột biến đã xác định khác ở CHIKV-Δ5nsP3 dẫn đến sự mất khả năng gây miễn dịch; cụ thể là đột biến E168K[E2] thường xuyên xảy ra, một mình hoặc ở dạng kết hợp với các đột biến khác. Điều ngoại trừ đáng chú ý là thể đột biến có cả hai đột biến E168K[E2] và đột biến A38S[nsP1], duy trì khả năng gây miễn dịch. Quan sát này cho thấy rằng đột biến A38S[nsP1] có ảnh hưởng làm giảm thiểu lên khả năng gây miễn dịch giảm do đột biến E168K[E2] mang lại. Ngoài ra, thể phân lập có đột biến G55R/H232Y[E2] và đột biến G577W[nsP2] cũng chứng tỏ khả năng gây miễn dịch kém, có lẽ chủ yếu là do đột biến G55R ở E2, bởi vì một mình đột biến H232Y có ảnh hưởng ít (xem P5B-03).

Đột biến E168K và đột biến G55R ở protein E2 virus Chikungunya được mô tả trước đó là làm điện tích bề mặt dương tăng lên, dẫn đến sự tương tác với heparan sulfat và/hoặc các Glycosaminoglycan (GAG) khác tăng, cuối cùng là thu được khả năng lây nhiễm cụ thể tăng. Trên nền tảng của CHIKV kiểu dại, các đột biến được cho thấy là gây ra kích thước mảng nhỏ hơn, do mở rộng kém hơn trên các đĩa qua trung gian bởi sự liên kết với heparan sulfat. Ngoài ra, các đột biến dẫn đến sự giảm độc lực của CHIKV ở mô hình chuột bị bệnh cơ xương (MSD), có sự lan rộng ở chuột đến các cơ quan giảm đi và do đó mức độ virus xâm nhập vào máu thấp hơn (Gardner CL, *et al.*, 2014, *ở trên*; Silva LA, *et al.*, A single-amino-acid polymorphism in Chikungunya virus E2 glycoprotein influences glycosaminoglycan utilization (2014) J Virol.; 88(5):2385-97). Thực tế là sự có mặt của đột biến E168K và đột biến G55R ở CHIKV kiểu dại khác dẫn đến sự giảm độc lực trung gian phù hợp với sáng chế về mặt kích thước mảng giảm hoặc khả năng gây miễn dịch *in vivo* giảm. Tuy nhiên, điều không mong đợi là hai đột biến này trên nền tảng của CHIKV-Δ5nsP3 đã giảm độc lực dẫn đến mất khả năng gây miễn dịch ở chuột như được báo cáo trong bản mô tả này.

Cũng được báo cáo là hiện tượng thông thường đối với môi trường nuôi cấy tế bào khác được cấy chuyển các alphavirus chẳng hạn như virus Sindbis (SINV; Klimstra WB, *et al.*, Infection of neonatal mice with Sindbis virus results in a systemic inflammatory response syndrome (1999) J. Virol.; 73(12):10387-98; Klimstra WB, *et al.*, The furin protease cleavage recognition sequence of Sindbis virus PE2 can mediate virion attachment to cell surface heparan sulfate (1999) J. Virol.; 73(8):6299-306; Byrnes and Griffin, Binding of Sindbis virus to cell surface heparan sulfate (1998) J. Virol.; 72(9):7349-56), virus Ross River (RRV; Heil ML, *et al.*, An amino acid substitution in the coding region of the E2 glycoprotein adapts Ross River virus to utilize heparan sulfate as an attachment moiety (2001) J. Virol.; 75(14):6303-9) và virus Semliki Forest (SFV; Smit JM, *et al.*, Adaptation of alphaviruses to heparan sulfate: interaction of Sindbis and Semliki forest viruses with liposomes containing lipid-conjugated heparin (2002) J. Virol.; 76(20):10128-37) là sự thể đối với các gốc tích điện-dương ở E2 mang lại khả năng lây nhiễm phụ thuộc heparan-sulfat *in vitro* tăng và các đột biến này có thể được chọn lọc trong cấy chuyển *in vitro* ít dầy. Ngoài ra, đã thấy rằng các đột biến này dẫn đến sự giảm độc lực virus *in vivo* (Byrnes AP and DE Griffin, Large-plaque mutants of Sindbis virus show reduced binding to heparan sulfate, heightened viremia, and slower clearance from the circulation (2000) J. Virol.; 74(2):644-51; Klimstra WB, *et al.* 1999, *ở trên*).

Bởi vì tính không đồng nhất trình tự, cùng với sự giảm đồng thời về khả năng gây miễn dịch, đã rõ ràng ở cấy chuyển P5 và P8 của CHIKV-Δ5nsP3, tính không đồng nhất trình tự ở các cấy chuyển sớm hơn, cũng như là các ảnh hưởng của chúng lên khả năng gây miễn dịch, được thử nghiệm kỹ lưỡng hơn như được phác họa dưới đây.

Ví dụ 3. Xác định tính không đồng nhất trình tự và khả năng gây miễn dịch của CHIKV-Δ5nsP3 ở cấy chuyển P3

Sự xuất hiện ở các cây chuyển sau của tính không đồng nhất trình tự với các ảnh hưởng bất lợi lên khả năng gây miễn dịch của CHIKV- $\Delta 5nsP3$ như đo được bằng hiệu giá kháng thể trung hòa xác đáng phát hiện cây chuyển tối ưu đặc trưng bởi cả khả năng gây miễn dịch cao cũng như là hiệu giá virus đủ để tạo ra vắc xin hữu hiệu.

Để xác định độ ổn định di truyền của CHIKV- $\Delta 5nsP3$ trong quá trình tạo ra MVSB (P1), WVSb (P2) và chất thuốc CHIKV- $\Delta 5nsP3$ ("VLA1553") (P3), các cây chuyển 1, 2 và 3 được tạo ra độc lập được giải trình tự. Như được xác định bằng cách giải trình tự Sanger, P0 (cứu sinh virus), P1 (MVSB) và P2 (WVSb) không thể hiện tính không đồng nhất trình tự rõ ràng bất kỳ. Bước tiếp theo là để chứng tỏ khả năng tái tạo có độ ổn định di truyền của chất thuốc (DS) đã tinh chế bắt nguồn từ P3 bằng cách sử dụng P2 (WVSb) để lây nhiễm. Tổng cộng, bốn mẻ thu P3 độc lập, gồm có các mẻ thu ngày 1 và ngày 2 kết hợp, được tạo ra trong hai bình thốt cổ-T T150 bằng cách sử dụng P2 (WVSb) để lây nhiễm (MOI 0,01). Đối với mỗi bản sao, các mẻ thu riêng lẻ vào ngày 1 và ngày 2 được tập hợp (tổng thể tích ~50 ml) và cô đặc xấp xỉ gấp 10-lần (thiết bị siêu lọc 100 kDa Amicon). Thực hiện lọc pha loãng dựa trên 25 mM Tris/150 mM NaCl, độ pH 7,4, tiếp theo là xử lý protamin sulfat (nồng độ cuối cùng 2 mg/ml) để kết tủa ADN tế bào chủ. Sau đó dịch nổi bề mặt sạch được tinh chế thêm bằng sắc ký hấp thụ theo mẻ bằng cách sử dụng nhựa CaptoCore 700 (bổ sung ~1 ml bột nhão 50% trong đệm Tris/NaCl). Loại bỏ nhựa bằng cách ly tâm và bổ sung sucroza đến nồng độ cuối cùng bằng 10% để cho phép kết đông và rã đông CHIKV- $\Delta 5nsP3$. Sau đó chế phẩm cuối cùng được lọc tiệt trùng 0,2 μ m và lưu trữ đông lạnh ($< -65^{\circ}\text{C}$) đến khi xử lý tiếp.

Ở cây chuyển 3 (P3), không có tính không đồng nhất bởi việc kêu gọi bazơ tự động được phát hiện (Eurofins – tất cả $< 20\%$). Tuy nhiên, bằng cách kiểm tra bằng mắt, phân đoạn nhỏ của quần thể virus thể hiện sự tăng phù hợp về tính không đồng nhất trình tự E168K và E247K ở gen đối với CHIKV glycoprotein E2, không có trong CHIKV- $\Delta 5nsP3$ (P0) cứu sinh cũng như là các mẫu MVSB và WVSb. Fig.7 thể hiện sắc ký đồ giải trình tự đối với bốn mẫu P3 DS được tạo ra độc lập (các Ví dụ 1-4) so với virus lúc cây chuyển 0 (P0). Như được chỉ ra bằng bộ cục khối, tính không đồng nhất G/A ở bộ ba mã hóa đối với axit amin 168 (vị trí axit nucleic hệ gen 8882) có thể phát hiện được trong cả bốn bản sao và được xác minh bằng phản ứng giải trình tự ngược, mà phát hiện thấy tính không đồng nhất như nhau. Cùng vị trí ở mẫu P0 thể hiện đỉnh nhọn đối với G ở phản ứng giải trình tự xuôi (và C ở phản ứng giải trình tự ngược). Mặt khác, tính không đồng nhất E247K (vị trí axit nucleic hệ gen 9119) có mặt nhưng có thể phát hiện vừa đủ trong sắc ký đồ giải trình tự.

Ngoài ra, sự giải trình tự thế hệ tiếp theo của P3 được tiến hành và so sánh với việc giải trình tự cây chuyển 1 (P1-MVSB) để định lượng lượng của E168K và E247K trong quần thể virus. Như có thể được nhìn thấy trong Fig.8, ở giai đoạn P1-MVSB, chỉ mức độ không đồng nhất trình tự rất thấp có thể phát hiện được (tất cả ở dưới mức nền; giới hạn 15% được chỉ ra bởi đường chấm chấm). Tuy nhiên, hai mẫu P3 tiêu biểu thể hiện sự tăng tổng thể về tính không đồng nhất trình tự, có hai đột biến ở gen E2 mà đạt

đến hoặc tăng lên trên mức nền (E168K ở 18% và 15% của quần thể virus – vị trí axit nucleic hệ gen 8882 và, đến mức độ thấp hơn, E247K – vị trí axit nucleic hệ gen 9119).

Tóm lại, sự có mặt của đột biến E168K ở protein E2 của CHIKV- Δ 5nsP3 đã được xác định bằng cách giải trình tự Sanger và NGS ở tám mẫu P3 được tạo ra độc lập, chứng tỏ khả năng tái tạo của kết quả này. Các ví dụ giải trình tự tiêu biểu được thể hiện trong Fig.7 và Fig.8. Các dữ liệu này chứng tỏ rằng sự xuất hiện đột biến E168K ở protein E2 của virus CHIKV- Δ 5nsP3 có khả năng tái tạo cao khi cấy chuyển trong tế bào Vero và nó làm giảm bớt khả năng gây miễn dịch của virus CHIKV- Δ 5nsP3 đã giảm độc lực như được thể hiện trong Ví dụ 2 mà ở đó các virus bắt nguồn từ mảng P5B(P5B-04 và P5B-07 trong Fig.6) không gây miễn dịch. Hai đột biến bổ sung, G55R và G82R, được quan sát thấy trong quá trình cấy chuyển CHIKV- Δ 5nsP3 trên tế bào Vero, giống như E168K đã được báo cáo là ảnh hưởng đến tính gây độc của CHIKV (Gardner CL, *et al.*, 2014, *ở trên*, Silva LA, *et al.*, 2014, *ở trên* và Gorchakov R, *et al.*, Attenuation of Chikungunya virus vaccine strain 181/clone 25 is determined by two amino acid substitutions in the E2 envelope glycoprotein (2012) J. Virol.; 86(11):6084-96; Epub 2012/03/30), dẫn đến sự giảm độc lực của virus. Vì hai đột biến này cũng tác động tiêu cực lên khả năng gây miễn dịch của CHIKV- Δ 5nsP3, nên sự xuất hiện của chúng để tạo ra ứng viên vắc xin CHIKV- Δ 5nsP3 gây miễn dịch cao.

Các vị trí của axit amin dễ xảy ra đột biến trong đime E1/E2 được thể hiện trong Fig.9. Ba axit amin E2 G55, G82 và E168 đều có thể tiếp cận được trên bề mặt và do đó đột biến của chúng có thể có khả năng ảnh hưởng đến sự tương tác của CHIKV với thụ thể tế bào của nó. Ngược lại, E247[E2] dễ bị che lấp trong cấu trúc protein và do đó có thể không phải được bộc lộ trên bề mặt đến cùng mức độ. Vị trí của E247 có thể là một lý do tại sao đột biến E247K không ảnh hưởng đáng kể đến khả năng gây miễn dịch của CHIKV- Δ 5nsP3 như được thể hiện ở trên.

Ví dụ 4. Xác định ngưỡng của đột biến E168K để làm mất khả năng gây miễn dịch của quần thể virus CHIKV- Δ 5nsP3 không đồng nhất

Các quan sát ở trên cho thấy rằng đột biến E168K[E2] xuất hiện sớm và thường xuyên trong quá trình cấy chuyển CHIKV- Δ 5nsP3 trên tế bào Vero và có liên quan đến sự mất khả năng gây miễn dịch. Để phát triển quy trình sản xuất đảm bảo của vắc xin virus Chikungunya sống-đã giảm độc lực gây miễn dịch, hữu hiệu, sự dung chịu đối với đột biến này ở mẫu vắc xin CHIKV- Δ 5nsP3 được thử nghiệm bằng cách điều chế các tỉ lệ khác nhau của chất thuốc P3 và virus P5B-07 (thể đột biến đơn lẻ E168K; xem **Bảng 3**).

Chất thuốc cấy chuyển 3 (P3), mà thể hiện khoảng 20% tính không đồng nhất E168K (dữ liệu không được thể hiện), được trộn với chế phẩm của CHIKV- Δ 5nsP3 từ thể phân lập P5B-07 (thể đột biến E168K) ở các tỉ lệ bằng 1:0,1, 1:1 và 1:10. Hỗn hợp được giải trình tự để xác minh tần suất xấp xỉ của đột biến E168K ở mỗi chế phẩm virus. Như được thể hiện trong Fig.10 (xem hàng được gắn nhãn tính không đồng nhất), lượng tương đối của nucleotit A, so với nucleotit G kiểu đại, được thể hiện là tăng lên cùng với

hàm lượng tăng của thể phân lập P5B-07 được bổ sung (lên đến 100% A trong nhóm đối chứng E168K 7).

Để xác định ảnh hưởng của đột biến E168K lên khả năng gây miễn dịch, chuột C57Bl/6 được gây miễn dịch dưới da bằng các mẫu CHIKV- Δ 5nsP3 khác nhau được định rõ trong Fig.10 với liều lượng được dự định bằng 3×10^4 TCID₅₀ (liều lượng thực sự được thể hiện trong Fig.11D). Huyết thanh chuột ngày 21 được thu lấy và huyết thanh riêng lẻ từ các nhóm 1:0,1, 1:1 và 1:10 được thử nghiệm và so sánh với huyết thanh được tập hợp từ hai nhóm đối chứng, P3 (Nhóm 6) và P5B-07 (E168K; Nhóm 7) bằng cách sử dụng thử nghiệm trung hòa dựa trên – hạt sao chép virus (VRP) (Fig.11). VRP giống như CHIKV kiểu dại thiếu khả năng sao chép thể hiện protein capsit và protein vỏ của virus LR2006-OPY1. Thực hiện phương pháp này về cơ bản như được mô tả bởi Gläsker S, và cộng sự. (Virus replicon particle based Chikungunya virus neutralization assay using Gaussia luciferase as readout (2013) Virol. J.; 10:235). VRP được tạo ra bằng cách đồng biến nạp tế bào BHK-21 với bản sao CHIKV biểu hiện Gaussia luxiferaza (GLuc) và hai ARN trợ giúp lần lượt biểu hiện protein capsit CHIKV kiểu dại và các protein cấu trúc còn lại (E3, E2, 6K và E1). Hạt lây nhiễm một chu kỳ thu được được sử dụng trong thử nghiệm trung hòa CHIKV bằng cách sử dụng GLuc được tiết ra dưới dạng kết quả đọc. Khi trung hòa VRP trong thử nghiệm Luxiferaza, có thể đo sự giảm biểu hiện GLuc bởi tế bào BHK-21. Đã quan sát thấy rằng khả năng gây ra sự miễn dịch trung hòa giảm đi theo lượng thể đột biến E168K cao hơn (lần lượt các Fig.11A, B và C). Số lượng chuột riêng lẻ thể hiện đáp ứng miễn dịch dương tính, dương tính thấp hoặc âm tính với virus Chikungunya được thể hiện trong Fig.11D.

Phát hiện này xác nhận rằng, vì tỉ lệ của thể đột biến E168K với các hạt virus kiểu dại trong quần thể virus tăng, khả năng gây miễn dịch của CHIKV- Δ 5nsP3 ở chuột giảm bớt. Do đó điều thiết yếu là giám sát kỹ lưỡng vị trí E168 ở E2 để đảm bảo khả năng gây miễn dịch cao của vắc xin CHIKV- Δ 5nsP3. Dựa trên các quy trình cấy chuyển trước đó và sự định lượng E168K trong quần thể virus ở cấy chuyển 8, đã quan sát thấy rằng ở tỉ lệ bằng khoảng 70% của đột biến E168K trong quần thể CHIKV- Δ 5nsP3, khả năng gây miễn dịch bị mất đi khi phân tích tập hợp huyết thanh chuột trong PRNT.

Ví dụ 5. Quy trình ngược dòng để làm giảm đột biến E168K ở CHIKV- Δ 5nsP3

Mục đích của ví dụ này là để xác định đặc điểm quy trình dựa trên nuôi cấy tế bào Vero được tối ưu hóa để tạo ra CHIKV- Δ 5nsP3 trong các chai hình ống lăn. Ảnh hưởng của một vài tham số quy trình ngược dòng (MOI, ngày lây nhiễm tế bào Vero sau khi lắng ra đĩa và nhiệt độ ủ) lên sản lượng virus và tính không đồng nhất trình tự của protein E2 được thử nghiệm bằng cách sử dụng Ngân Hàng Giống Virus Hoạt Động GMP (GMP WWSB B3005044; cấy chuyển 2, cũng được đề cập trong bản mô tả này dưới dạng “CHIKV- Δ 5nsP3 P2”) và ngân hàng tế bào hoạt động Vero R&D để tạo ra chất thuốc (DS; cấy chuyển 3, tức là cũng được đề cập trong bản mô tả này dưới dạng “CHIKV- Δ 5nsP3 P3”).

Điều chế GMP WWSB B3005044

Ngân Hàng Giống Virut Tiên-Trưởng Thành đã xác định đặc điểm (PMVSB, Ngân Hàng Giống Virut Tiên-Trưởng Thành AFR886/197579 từ cứu sinh virut từ các tế bào Vero) được thiếp lập trong điều kiện R&D và Ngân Hàng Giống Virut Tiên-Trưởng Thành được sử dụng để tạo ra Ngân Hàng Giống Trưởng Thành của CHIKV- $\Delta 5nsP3$ trong điều kiện GMP. Ngân Hàng Giống Virut Hoạt Động GMP, VLA78-1553-WVSB-2016, mẻ B3005044 được tạo ra ở Halix B.V. trong cùng điều kiện GMP và phương pháp tạo ra như được mô tả đối với VLA78-1553-MVSB-2016, mẻ #B3005567. Tóm lại, Ngân Hàng Tế Bào Hoạt Động VERO (ký hiệu nội bộ: ICB 2014/002) được mở rộng trong bốn giai đoạn ở chủng giống bằng cách sử dụng bình thốt cổ $T75cm^2$ (1X), sau đó bình thốt cổ $T175cm^2$ (3X) và trong giai đoạn cuối 6xchai hình ống lăn $850cm^2$ như được thể hiện trong Fig.12. Bốn trong sáu chai hình ống lăn được sử dụng để tạo ra ngân hàng giống CHIKV- $\Delta 5nsP3$. Tổng lượng tế bào trong bốn chai hình ống lăn được xác định. Ngân Hàng Giống Virut Tiên-Trưởng Thành được sử dụng để tạo ra Ngân Hàng Giống Virut Trưởng Thành CHIKV- $\Delta 5nsP3$. Sau đó, Ngân Hàng Giống Virut Trưởng Thành CHIKV- $\Delta 5nsP3$ được sử dụng để tạo ra Ngân Hàng Giống Virut Hoạt Động CHIKV- $\Delta 5nsP3$. Thực hiện lây nhiễm ở tất cả giai đoạn tại MOI bằng 0,01. Sau 24 giờ lây nhiễm ($35^{\circ}C$; CO_2 5%; 0,5 VÒNG/PHÚT) thu hoạch CHIKV- $\Delta 5nsP3$. Bổ sung dung dịch dự trữ Tris và sucroza đến nồng độ cuối cùng bằng 5% Sucroza và 25 mM Tris trong tập hợp thu hoạch. Sau khi tạo chế phẩm, tập hợp được lọc qua thiết bị lọc $0,22 \mu m$ được tiệt trùng bằng hơi nước vào vật chứa xử lý sinh học 500 ml tiệt trùng bằng cách sử dụng bơm nhu động. Việc nạp vào các lọ được thực hiện từng lọ một với 0,7 ml mẻ thu được lọc và tạo chế phẩm bằng cách sử dụng bơm nạp nhu động. Sử dụng thiết bị đóng nắp / mở nắp ThermoFisher để mở và đóng các lọ Lạnh Sâu Chết Nền 2 D. Các lọ đã nạp ngân hàng giống GMP được lưu trữ ở nhiệt độ $<-65^{\circ}C$.

Nuôi cấy tế bào Vero

Nuôi cấy tế bào Vero được tiến hành ở nhiệt độ $35^{\circ}C$ và CO_2 5% trong các Bình thốt cổ-T $T75 cm^2$ (T75), $T175 cm^2$ (T175) và chai hình ống lăn $850cm^2$ (850RB). Các tế bào Vero được sử dụng trong các thí nghiệm khác nhau bắt nguồn từ ngân hàng tế bào trưởng thành GMP MCB ICB/2014/001. Ký hiệu nội bộ của ngân hàng tế bào hoạt động nghiên cứu này là Bk5685. Ngân hàng tế bào trưởng thành GMP bắt nguồn từ ngân hàng tế bào Vero WHO 10-87 P134 có nguồn gốc từ ngân hàng Institut Merieux (Aventis Pasteur) P129 và cuối cùng là từ ngân hàng ATCC CCL 81 P113 gốc. Chi tiết hơn về dòng nuôi cấy tế bào được thể hiện trong Fig.12. Duy trì tế bào trong môi trường MEM có bổ sung FBS 10% và L-glutamin 2 mM.

Sự Tạo Ra Virut Trong Các Chai Hình Ống Lăn $850cm^2$

Sau hai, bốn hoặc năm ngày mở rộng tế bào ở nhiệt độ $35^{\circ}C$ trong 850RB, tế bào được rửa bằng PBS và được lây nhiễm bằng CHIKV- $\Delta 5nsP3$ (WVSB B3005044) tại các MOI bằng 0,1, 0,01 hoặc 0,001 TCID₅₀/tế bào. Để tạo ra virut, tế bào đã lây nhiễm được ủ ở nhiệt độ $37^{\circ}C$, $35^{\circ}C$ hoặc $28^{\circ}C$ trong 100 ml môi trường MEM có bổ sung glutamin 2 mM.

Chuẩn độ virus

Xác định hiệu giá virus trên tế bào Vero bằng cách sử dụng thử nghiệm TCID₅₀. Tế bào được cấy trong vi đĩa và được lây nhiễm bằng các mẫu virus pha loãng liên tiếp gấp 10-lần trong EMEM có bổ sung FBS 0,5% và glutamin 2 mM. Sau một tuần ủ ở nhiệt độ 35°C / CO₂ 5%, giám sát tác dụng gây bệnh tế bào do virus gây ra và tính toán hiệu giá virus theo phương pháp Reed và Muench (Reed, L.J.; Muench, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints (1938) The American Journal of Hygiene 27:493–497).

Tách chiết hệ gen virus và giải trình tự

Axit nucleic virus được tách chiết và tinh chế từ dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy tế bào Vero tại các thời điểm được chỉ định bằng cách sử dụng Bộ Kit Quay Virus QIAamp MinElute (Qiagen) và tiến hành tổng hợp cADN bằng cách sử dụng Hệ Thống Tổng Hợp Sợi-Thứ Nhất SuperScript III (ThermoFischer) bằng cách sử dụng các hexamer ngẫu nhiên. Để giải trình tự vùng gen E2, trước hết, PCR với Polymeraza Độ Tin Cậy Cao Phusion (ThermoFischer) được thực hiện bằng cách sử dụng các mồi 16F, 16R, 17F, 17R, 18F và 18R (đối với các trình tự mồi xem Bảng 1) để khuếch đại các vùng chồng lên nhau của gen E2 CHIKV. Sau khi tinh chế sản phẩm khuếch đại PCR, tiến hành giải trình tự Sanger ở MWG Eurofins, Đức. Ngoài việc phân tích tính không đồng nhất trình tự được phát hiện bằng cách kêu gọi bazơ tự động (>20%), tất cả sắc ký đồ giải trình tự được đọc thủ công cũng để phát hiện tính không đồng nhất dưới giới hạn phát hiện (< 20%).

Sự tối ưu hóa quy trình sản xuất Chất Thuốc CHIKV-Δ5nsP3 P3 gây miễn dịch

Để tối ưu hóa quy trình sản xuất CHIKV-Δ5nsP3 cấy chuyển 3 trên tế bào Vero, các MOI khác nhau, thời gian lây nhiễm tế bào Vero sau khi cấy và nhiệt độ ủ được thử nghiệm ở tất cả các dạng kết hợp như được thể hiện trong **Bảng 5**. Ngoài ra, phân tích sản lượng vào các ngày khác nhau sau khi lây nhiễm. Ba khía cạnh của virus đã thu hoạch được giám sát: sản lượng virus, tính ổn định của hiệu giá cũng như là mức độ của tính không đồng nhất trình tự của protein cấu trúc E2.

Bảng 5. Tham số thử nghiệm về việc tạo ra CHIKV-Δ5nsP3 trên tế bào Vero trong các chai hình ống lần 850cm² và tham số của quy trình đã tối ưu hóa được chỉ ra.

	Được Thử Nghiệm*	Quy Trình Được Tối Ưu Hóa
MOI (TCID₅₀/tế bào)	0,1, 0,01, 0,001	0,01
Thời gian lây nhiễm tế bào (sau khi cấy tế bào)	D2, D4, D5	D4
Nhiệt độ (°C)	37, 35, 28	35

* tất cả các kết hợp được tiến hành.

Sự Tạo Ra Virus

Động lực của sự tạo ra CHIKV- $\Delta 5nsP3$ đạt được đối với tất cả các điều kiện được thử nghiệm được thể hiện trong Fig.13. Quy trình tối ưu hiện nay được sử dụng để tạo ra CHIKV- $\Delta 5nsP3$ (35°C, MOI 0,01, lây nhiễm vào ngày 4 sau khi cấy tế bào Vero) cũng được bao gồm trong thí nghiệm, thể hiện sản lượng virus ở mức độ được mong đợi bằng $10^{8,0-8,5}$ /ml 24 giờ sau khi lây nhiễm (Fig.13B).

So với MOI và thời gian lây nhiễm, nhiệt độ có tác động nhiều nhất lên động lực của sự tạo ra virus. Ở nhiệt độ 37°C và 35°C (lần lượt Fig.13A và 13B), đạt được sản lượng tối đa vào ngày một sau khi lây nhiễm. Khả năng lây nhiễm **CHIKV- $\Delta 5nsP3$** giảm đáng kể trong suốt 24 giờ sau đó, cùng với hiệu giá virus ít rõ rệt một chút bị mất ở nhiệt độ 35°C. Sự giảm nhiệt độ đến 28°C dẫn đến sự thay đổi đáng chú ý về động học virus. Sản lượng virus tối đa bị trì hoãn từ một đến bốn ngày phụ thuộc vào MOI được sử dụng; và tính ổn định hiệu giá virus cải thiện đáng kể được quan sát thấy (Fig.13C). Tổng sản lượng virus được tạo ra từ tất cả các mẻ thu được thể hiện trong Fig.14. Đối với điều kiện 28°C như được thể hiện trong Fig.13A, sản lượng của hai mẻ thu được kết hợp (ngày 1 và ngày 2 sau khi lây nhiễm); đối với điều kiện 35°C (Fig.13B), sản lượng của tất cả ba mẻ thu được kết hợp (ngày 1-3) và đối với điều kiện 37°C (Fig.13C), sản lượng của năm mẻ thu (ngày 1-5) được kết hợp.

Để hoàn thiện các quan sát ban đầu, sản lượng virus và dữ liệu tính ổn định hiệu giá được phân tích bằng cách sử dụng mô hình bậc hai bề mặt đáp ứng (các Fig.15 và 16). Đối với sản lượng virus, sử dụng giá trị hiệu giá virus tối đa. Đối với tính ổn định hiệu giá virus, giá trị delta là kết quả từ phép trừ của hiệu giá tối đa từ hiệu giá đo được một ngày sau trong quy trình sản xuất được tính toán và sử dụng. Đối với tổng sản lượng virus, bổ sung các hiệu giá riêng lẻ tại mỗi thời điểm.

Với phân tích ANOVA của cả hai mô hình, có thể chỉ ra các yếu tố ảnh hưởng đáng kể về mặt thống kê (các Fig.15A và 16A). Xác nhận các quan sát trước đó, nhiệt độ là yếu tố ảnh hưởng nhiều nhất đến sản lượng virus và tính ổn định. Cụ thể là, nhiệt độ thấp (28°C) cho phép hiệu giá virus cao hơn trong khi đó vẫn giữ hiệu giá virus khá ổn định theo thời gian. Tuy nhiên, không có toàn bộ tổng sản lượng virus cao hơn đáng kể ở nhiệt độ này so với 35°C (cụ thể xem Fig.14).

Thời gian lây nhiễm sau khi cấy tế bào Vero cũng ảnh hưởng đến sự đáp ứng, nhưng đến mức độ thấp hơn. MOI không có ảnh hưởng đáng kể. Đối với cả hai mô hình, sự lây nhiễm lúc 72 giờ sau khi cấy tế bào là thời gian phù hợp để lây nhiễm tế bào. Ngược lại, nhiệt độ đơn lẻ không cho phép kết hợp sự tạo ra virus tối ưu và tính ổn định hiệu giá bởi vì sản lượng virus cao nhất được phát hiện ở nhiệt độ 35°C và hàm lượng ổn định nhất được quan sát thấy ở nhiệt độ 28°C (các Fig.15B và 16B). Tổng sản lượng virus tối đa trong thời gian ngắn nhất sau khi lây nhiễm đạt được ở nhiệt độ 35°C (xem Fig.14).

Phân tích trình tự gen protein E2

Các mẫu virus được thu vào ngày 2 hoặc ngày 5 sau khi lây nhiễm tế bào Vero (lây nhiễm vào ngày 4 sau khi cấy) được chọn để thực hiện phân tích trình tự ARN hệ gen của protein cấu trúc E2 virus. Các mẫu này là tiêu biểu nhất để hợp lưu tế bào Vero

trên các chai hình ống lăn. Bảng 6 và Bảng 7 dưới đây tóm tắt tỉ lệ phần trăm của tính không đồng nhất được ước tính đối với bốn vị trí axit amin (AA) dựa trên trình tự axit nucleic được xác định bằng cách giải trình tự Sanger. Bảng 6 thể hiện dữ liệu đối với CHIKV-Δ5nsP3 sinh trưởng ở ba nhiệt độ khác nhau và thu hoạch hai ngày sau khi lây nhiễm và Bảng 7 thể hiện dữ liệu đối với CHIKV-Δ5nsP3 sinh trưởng ở nhiệt độ 28°C và thu hoạch 5 ngày sau khi lây nhiễm.

Bảng 6. Phân tích trình tự hệ gen ARN đối với protein virus E2 từ mẫu thu mẫu D2 sau khi lây nhiễm. Đã thấy rằng tỉ lệ phần trăm của độ không đồng nhất axit nucleic được ước tính tương ứng với bốn vị trí AA (được chỉ ra trong dấu ngoặc), như được xác định bằng cách giải trình tự Sanger. Tính không đồng nhất ở vị trí axit nucleic 9649 là đột biến câm.

Thời gian sau cấy trong các chai hình ống lăn	D4								
Nhiệt độ	28°C			35°C			37°C		
MOI (TCID ₅₀ /tế bào)	0,1	0,01	0,001	0,1	0,01	0,001	0,1	0,01	0,001
Vị trí 8543 (G55R)	0	0	0	0-5	0-5	0-5	0	0	0
Vị trí 8882 (E168K)	30	30	40-50	25	25	30-50	25	25	30-50
Vị trí 9119 (E247K)	0-5	0-5	0-5	5-10	10	10-20	10-20	10-20	10-20
Vị trí 9649 (A423, Câm)	0-5	5-10	10-20	5	5	5-10	0-5	0-5	5-10

Bảng 7. Phân tích trình tự hệ gen ARN đối với protein virus E2 từ mẫu thu mẫu D5 sau khi lây nhiễm. Đã thấy rằng tỉ lệ phần trăm của độ không đồng nhất axit nucleic được ước tính tương ứng với bốn vị trí AA (được chỉ ra trong dấu ngoặc), như được xác định bằng cách giải trình tự Sanger. Tính không đồng nhất ở vị trí axit nucleic 9649 là đột biến câm.

Thời gian sau cấy trong các chai hình ống lăn	D4		
Nhiệt độ	28°C		
MOI (TCID ₅₀ /tế bào)	0,1	0,01	0,001
Vị trí 8543 (G55R)	0	0	0
Vị trí 8882 (E168K)	30-40	40-50	50
Vị trí 9119 (E247K)	0-5	0-10	10
Vị trí 9649 (A423, Câm)	0-5	0-5	10-20

MOI, nhiệt độ, ngày lây nhiễm sau khi cấy tế bào Vero và ngày thu hoạch mẫu đều ảnh hưởng đến sản lượng và chất lượng của CHIKV- Δ 5nsP3 khi được tạo ra ở các tế bào Vero. Tuy nhiên, độ mạnh của mỗi tham số có tầm quan trọng khác nhau. Ví dụ, các kết quả cho thấy sự tương quan giữa MOI và mức độ không đồng nhất; tức là, đầu vào virus lúc lây nhiễm càng thấp, mức độ không đồng nhất được quan sát thấy lúc thu hoạch càng cao. Nhiệt độ ủ dường như không ảnh hưởng đến tính ổn định của trình tự nucleotit, ngoại trừ Vị trí 9119 (E247K) mà tại đó mức độ cao hơn của tính không đồng nhất được quan sát thấy ở nhiệt độ 37°C (**Bảng 6**). Ngoài ra, mẻ thu mẫu được thu lấy sau đó trong động học virus kích hoạt mức độ cao hơn một chút của tính không đồng nhất đối với cùng vị trí AA.

Để hoàn thiện phân tích thứ nhất này, việc lập mô hình toán học dữ liệu thô cũng được tiến hành (**các Fig.17 và 18**). Chỉ ba vị trí axit nucleic (Vị trí 8882, 9119, 9649) có thể được phân tích vì không có mô hình đáng kể được tính đối với vị trí 8543. Như được chỉ ra trong Fig.17, nhiệt độ và MOI có ảnh hưởng khác nhau tùy thuộc vào vị trí axit nucleic được xem xét. MOI ảnh hưởng đáng kể đến tính không đồng nhất được quan sát thấy đối với vị trí axit nucleic 8882 và 9649, nhưng không có ảnh hưởng đối với 9112. Nhiệt độ ảnh hưởng đến các vị trí 9112 và 9649, nhưng không có ảnh hưởng đối với 8882 (Fig.17). MOI được cho thấy là có ảnh hưởng nhất quán đến mức độ không đồng nhất khi các mẫu thu D2 và D5 sau khi lây nhiễm từ virus được tạo ra ở 28°C được so sánh—làm giảm thiểu mức độ của tính không đồng nhất AA được quan sát thấy khi tế bào được cấy truyền với lượng virus cao (MOI 0,1 TCID₅₀/tế bào). Quan sát này có thể gợi ý sự thiết lập của các cài đặt tham số quy trình mới với MOI cao hơn nhằm để đạt được sự tạo ra virus tối đa/tính ổn định hiệu giá trong khi đảm bảo mức độ không đồng nhất thấp trong protein E2. Tuy nhiên, MOI bằng 0,1 dẫn đến sự tiêu thụ ngân hàng giống virus hoạt động GMP cao hơn đáng kể, do đó làm giới hạn khả năng ứng dụng trong công nghiệp thực tế.

Ngày thu hoạch sau khi lây nhiễm chỉ ảnh hưởng đến sự biến đổi của vị trí axit nucleic 9119 (Fig.18).

CÁC TRÌNH TỰ

SEQ ID NO: 1

Trình tự nucleotit của CHIKV-Δ5nsP3

GATGGCTGCGTGAGACACACGTAGCCTACCAGTTTCTTACTGCTCTACTCTGCAAAGCAAGAGATTAA
TAACCCATCATGGATCCTGTGTACGTGGACATAGACGCTGACAGCGCCTTTTTGAAGGCCCTGCAACG
TGCGTACCCCATGTTTGAGGTGGAACCAAGGCAGGTACACCGAATGACCATGCTAATGCTAGAGCGT
TCTCGCATCTAGCTATAAACTAATAGAGCAGGAAATTGACCCCGACTCAACCATCCTGGATATCGGC
AGTGCGCCAGCAAGGAGGATGATGTGCGACAGGAAGTACCACTGCGTCTGCCCCGATGCGCAGTGCGG
AAGATCCCGAGAGACTCGCCAATTATGCGAGAAAGCTAGCATCTGCCGCAGGAAAAGTCCTGGACAG
AAACATCTCTGGAAAGATCGGGGACTTACAAGCAGTAATGGCCGTGCCAGACACGGAGACGCCAACA
TTCTGCTTACACACAGACGTCTCATGTAGACAGAGAGCAGACGTCGCTATATACCAAGACGTCTATGC
TGTACACGCACCCACGTGCTATACCACCAGGCGATTAAAGGGGTCCGAGTGGCGTACTGGGTTGGGT
TCGACACAACCCCGTTCATGTACAATGCCATGGCGGGTGCCTACCCCTCATACTCGACAAACTGGGCA
GATGAGCAGGTACTGAAGGCTAAGAACATAGGATTATGTTCAACAGACCTGACGGAAGGTAGACGAG
GCAAGTTGTCTATTATGAGAGGGAAAAAGCTAAAACCGTGCGACCGTGTGCTGTTCTCAGTAGGGTCA
ACGCTCTACCCGGAAGCCGCAAGCTACTTAAGAGCTGGCACCTGCCATCGGTGTTCCATTTAAAGGG
CAAACCTCAGCTTCACATGCCGCTGTGATACAGTGGTTTCGTGTGAGGGCTACGTCGTTAAGAGAATAA
CGATGAGCCCAGGCCTTTATGGAAAAACACAGGGTATGCGGTAACCCACCACGCAGACGGATTCTCT
GATGTGCAAGACTACCGACACGGTTGACGGCGAAAGAATGTCAATCTCGGTGTGCACATACGTGCCGG
CGACCATTTGTGATCAAATGACCGGCATCCTTGCTACAGAAGTCACGCCGGAGGATGCACAGAAGCTG
TTGGTGGGGCTGAACCAGAGAATAGTGGTTAACGGCAGAACGCAACGGAATACGAACACCATGAAAA
ATTATCTGCTTCCCGTGGTTCGCCCAAGCCTTCAGTAAGTGGGCAAAGGAGTGCCGGAAGACATGGAA
GATGAAAAACTCCTGGGGGTGAGAGAAAGAACACTGACCTGCTGCTGTCTATGGGCATTCAAGAAGC
AGAAAAACACACACGGTCTACAAGAGGCCTGATACCCAGTCAATTCAGAAGGTTTCAGGCCGAGTTTGA
CAGCTTTGTGGTACCGAGTCTGTGGTTCGTCGGGTTGTCAATCCCTTTGAGGACTAGAATCAAATGGTT
GTTAAGCAAGGTGCCAAAAACCGACCTGATCCCATACAGCGGAGACGCCCGAGAAGCCCGGGACGCA
GAAAAAGAAGCAGAGGAAGAACGAGAAGCAGAAGTACTCGCGAAGCCCTACCACCTCTACAGGCA
GCACAGGAAGATGTTTCAGGTGCAAAATCGACGTGGAACAGCTTGAGGACAGAGCGGGCGCAGGAATAA
TAGAGACTCCGAGAGGAGCTATCAAAGTTACTGCCCAACCAACAGACCACGTCTGTTGGGAGAGTACCT
GGTACTCTCCCCGCAGACCGTACTACGTAGCCAGAAGCTCAGTCTGATTACGCTTTGGCGGAGCAAG
TGAAGACGTGCACGCACAACGGACGAGCAGGGAGGTATGCGGTGCAAGCGTACGACGGCCGAGTCCT
AGTGCCCTCAGGCTATGCAATCTCGCTGAAGACTTCCAGAGTCTAAGCGAAAGCGCAACGATGGTGT
ATAACGAAAGAGAGTTCGTAAACAGAAAGCTACACCATATTGCGATGCACGGACCAGCCCTGAACAC
CGACGAAGAGTCGTATGAGCTGGTGAGGGCAGAGAGGACAGAACACGAGTACGTCTACGACGTGGAT
CAGAGAAGATGCTGTAAGAAGGAAGAAGCCGCAGGACTGGTACTGGTGGGCGACTTGACTAATCCGC
CCTACCACGAATTTCGCATATGAAGGGCTAAAAATCCGCCCTGCCTGCCCATACAAAATTGCAGTCATA
GGAGTCTTCGGAGTACCGGGATCTGGCAAGTCAGCTATTATCAAGAACCTAGTTACCAGGCAGGACCT
GGTGACTAGCGGAAAGAAAGAAAAGTCCCAAGAAATCACCACCGACGTGATGAGACAGAGAGGTCT
AGAGATATCTGCACGTACGGTTGACTCGCTGCTCTTGAATGGATGCAACAGACCAGTCGACGTGTTGT
ACGTAGACGAGGCGTTTGCGTGCCACTCTGGAACGCTACTTGCTTTGATCGCCTTGGTGAGACCAAGG
CAGAAAGTTGTACTTTGTGGTGACCCGAAGCAGTGCGGCTTCTTCAATATGATGCAGATGAAAGTCAA
CTATAATCACAACATCTGCACCCAAGTGTACCACAAAAGTATCTCCAGGCGGTGTACACTGCCTGTGA
CCGCCATTGTGTCATCGTTGCATTACGAAGGCAAAATGCGCACTACGAATGAGTACAACAAGCCGATT
GTAGTGGACACTACAGGCTCAACAAAACCTGACCCTGGAGACCTCGTGTTAACGTGCTTCAGAGGGTG
GGTTAAACAACCTGCAAATTGACTATCGTGGATACGAGGTATGACAGCAGCCGCATCCCAAGGGTTAA
CCAGAAAAGGAGTTTACGCAGTTAGACAAAAAGTTAATGAAAACCCGCTCTATGCATCAACGTCAGA
GCACGTCAACGTACTCCTAACGCGTACGGAAGGTAACTGGTATGGAAGACACTTTCCGGCGACCCGT
GGATAAAGACGCTGCAGAACCCACCGAAAGGAACTTCAAAGCAACTATTAAGGAGTGGGAGGTGGA
GCATGCATCAATAATGGCGGGCATCTGCAGTCACCAAATGACCTTCGATACATTCCAAAATAAAGCCA
ACGTTTGTGGGCTAAGAGCTTGGTCCCTATCCTCGAAACAGCGGGGATAAACTAAATGATAGGCAG

TGGTCTCAGATAATTCAAGCCTTCAAAGAAGACAAAGCATACTCACCTGAAGTAGCCCTGAATGAAAT
ATGTACGCGCATGTATGGGGTGGATCTAGACAGCGGGCTATTTTCTAAACCGTTGGTGTCTGTGTATTA
CGCGGATAACCACTGGGATAATAGGCCTGGAGGGAAAATGTTTCGGATTAAACCCCGAGGCAGCATCC
ATTCTAGAAAGAAAGTATCCATTACAAAAGGGGAAGTGGAACATCAACAAGCAGATCTGCGTGACTA
CCAGGAGGATAGAAGACTTTAACCCTACCACCAACATCATACCGGCCAACAGGAGACTACCACACTC
ATTAGTGGCCGAACACCGCCAGTAAAAGGGGAAAGAATGGAATGGCTGGTTAAACAAGATAAACGGC
CACCACGTGCTCCTGGTCAGTGGCTATAACCTTGCACTGCCTACTAAGAGAGTCACTTGGGTAGCGCC
GTTAGGTGTCCGCGGAGCGGACTACACATAACAACCTAGAGTTGGGTCTGCCAGCAACGCTTGGTAGGT
ATGACCTAGTGGTCATAAACATCCACACACCTTTTCGCATACACCATTACCAACAGTGCGTCGACCAC
GCAATGAAACTGCAAATGCTCGGGGGTGACTCATTGAGACTGCTCAAACCGGGCGGCTCTCTATTGAT
CAGAGCATATGGTTACGCAGATAGAACCAGTGAACGAGTCATCTGCGTATTGGGACGCAAGTTTAGAT
CGTCTAGAGCGTTGAAACCACCATGTGTACCAGCAACACTGAGATGTTTTTCCTATTACGCAACTTTG
ACAATGGCAGAAGGAATTTCACTCATGTGCATGAACAATCAACTGAATGCAGCCTTCGTAGGACAG
GTCACCCGAGCAGGATGTGCACCGTCGTACCGGGTAAACGCATGGACATCGCGAAGAACGATGAAG
AGTGCGTAGTCAACGCCGCTAACCCTCGCGGGTTACCGGGTGGCGGTGTTTGAAGGCAGTATACAAA
AAATGGCCGGAGTCTTTAAGAACAGTGCAACACCAGTGGGAACCGCAAAAACAGTTATGTGCGGTA
CGTATCCAGTAATCCACGCTGTTGGACCAAACCTTCTCTAATTATTCGGAGTCTGAAGGGGACCGGGAA
TTGGCAGCTGCCTATCGAGAAGTCGCAAAGGAAGTAAGTGGCTGGGAGTAAATAGTGTAGCTATAC
CTCTCCTCTCCACAGGTGTATACTCAGGAGGGAAAGACAGGCTGACCCAGTCACTGAACCACCTCTTT
ACAGCCATGGACTCGACGGATGCAGACGTGGTCATCTACTGCCGCGACAAAGAATGGGAGAAGAAAA
TATCTGAGGCCATACAGATGCGGACCCAAGTAGAGCTGCTGGATGAGCACATCTCCATAGACTGCGAT
ATTGTTTCGCGTGCACCTGACAGCAGCTTGGCAGGCAGAAAAGGATACAGCACCACGGAAGGCGCAC
TGTACTCATATCTAGAAGGGACCCGTTTTTCATCAGACGGCTGTGGATATGGCGGAGATACATACTATG
TGGCCAAAGCAAACAGAGGCCAATGAGCAAGTCTGCCTATATGCCCTGGGGGAAAGTATTGAATCGA
TCAGGCAGAAATGCCCGGTGGATGATGCAGACGCATCATCTCCCCCAAAACTGTCCCGTGCCTTTGC
CGTTACGCTATGACTCCAGAACGCGTCACCCGGCTTCGCATGAACCACGTCACAAGCATAATTGTGTG
TTCTTCGTTTCCCCTCCCAAAGTACAAAATAGAAGGAGTGCAAAAAGTCAAATGCTCTAAGGTAATGC
TATTTGACCACAACGTGCCATCGCGCGTAAGTCCAAGGGCTTATAGAGGTGCCGCTGCCGGTAACCTT
GCGGCCGTGTCTGATTGGGTAATGAGCACCGTACCTGTGCGCGCCGCCAGAAGAAGGCGAGGGAGAA
ACCTGACTGTGACATGTGACGAGAGAGAAGGGAATATAACACCCATGGCTAGCGTCCGATTCTTTAGG
GCAGAGCTGTGTCCGGTCGTACAAGAAACAGCGGAGACGCGTGACACAGCAATGTCTCTTCAGGCAC
CACCGAGTACCGCCACGGAACCGAATCATCCGCCGATCTCCTTCGGAGCATCAAGCGAGACGTTCCCC
ATTACATTTGGGGACTTCAACGAAGGAGAAATCGAAAGCTTGTCTTCTGAGCTACTAACTTTTCGGAGA
CTTCTTACCAGGAGAAGTGGATGACTTGACAGACAGCGACTGGTCCACGTGCTCAGACACGGACGAC
GAGTTAAGACTAGACAGGGCAGGTGGGTATATATTCTCGTCGGACACCGGTCCAGGTCATTTACAACA
GAAGTCAGTACGCCAGTCAGTGCTGCCGGTGAACACCCTGGAGGAAGTCCACGAGGAGAAGTGTTAC
CCACCTAAGCTGGATGAAGCAAAGGAGCAACTATTACTTAAGAAACTCCAGGAGAGTGCATCCATGG
CCAACAGAAGCAGGTATCAGTCGCGCAAAGTAGAAAACATGAAAGCAGCAATCATCCAGAGACTAAA
GAGAGGCTGTAGACTATACTTAATGTGAGAGACCCCAAAAGTCCCTACTTACCGGACTACATATCCGG
CGCTGTGTACTCGCCTCCGATCAACGTCCGATTGTCCAATCCCGAGTCCGAGTGGCAGCATGCAAT
GAGTTCTTAGCTAGAAACTATCCAACGTCTCATCATACCAAATTACCGACGAGTATGATGCATATCTA
GACATGGTGGACGGGTCCGAGAGTTGCCTGGACCGAGCGACATTCAATCCGTCAAAACTCAGGAGCT
ACCCGAAACAGCACGCTTACCACGCGCCCTCCATCAGAAGCGCTGTACCGTCCCCATTCCAGAACACA
CTACAGAATGTACTGGCAGCAGCCACGAAAAGAAACTGCAACGTACACAGATGAGGGAATTACCCA
CTTTGGACTCAGCAGTATTCAACGTGGAGTGTTTCAAAAAATTTCGCATGCAACCAAGAATACTGGGAA
GAATTTGCTGCCAGCCCTATTAGGATAACAACCTGAGAATTTAGCAACCTATGTTACTAACTAAAAGG
GCCAAAAGCAGCAGCGCTATTCGCAAAAACCCATAATCTACTGCCACTACAGGAAGTACCAATGGAT
AGGTTACAGTAGATATGAAAAGGGACGTAAAGGTGACTCCTGGTACAAAGCATAACAGAGGAAAGAC
CTAAGGTGCAGGTTATACAGGCGGCTGAACCCTTGCGACAGCATACCTATGTGGGATTCACAGAGAG
CTGGTTAGGAGGCTGAACGCCGCTCCTCTACCCAATGTACATACACTATTTGACATGTCTGCCGAGGA
TTTCGATGCCATCATAGCCGCACACTTTAAGCCAGGAGACACTGTTTTGGAAACGGACATAGCCTCCT
TTGATAAGAGCCAAGATGATTCACCTTGCCTTACTGCTTTGATGCTGTTAGAGGATTTAGGGGTGGATC

ACTCCCTGCTGGACTTGATAGAGGCTGCTTTTCGGAGAGATTTCCAGCTGTACCTACCGACAGGTACG
CGTTCAAGTTCGGCGCCATGATGAAATCAGGTATGTTCTAACTCTGTTTCGTCAACACATTGTAAAC
ATCACCATCGCCAGCCGAGTGCTGGAAGATCGTCTGACAAAATCCGCGTGCGCGGCCCTTCATCGGCCA
CGACAACATAATACATGGAGTCGTCTCCGATGAATTGATGGCAGCCAGATGTGCCACTTGGATGAACA
TGGAAGTGAAGATCATAGATGCAGTTGTATCCTTGAAAGCCCCCTACTTTTGTGGAGGGTTTATACTGC
ACGATACTGTGACAGGAACAGCTTGCAGAGTGGCAGACCCGCTAAAAAGGCTTTTTTAACTGGGCAA
ACCGCTAGCGGCAGGTGACGAACAAGATGAAGATAGAAGACGAGCGCTGGCTGACGAAGTGATCAG
ATGGCAACGAACAGGGCTAATTGATGAGCTGGAGAAAGCGGTATACTCTAGGTACGAAGTGACAGGT
ATATCAGTTGTGGTAATGTCCATGGCCACCTTTGCAAGCTCCAGATCCAACCTTCGAGAAGCTCAGAGG
ACCCGTCATAACTTTGTACGGCGGTCTAAATAGGTACGCACTACAGCTACCTATTTTGCAGAAGCCG
ACAGCAAGTATCTAAACACTAATCAGCTACAATGGAGTTCATCCCAACCCAACTTTTTACAATAGGA
GGTACCAGCCTCGACCCTGGACTCCGCGCCCTACTATCCAAGTCATCAGGCCCAGACCGCGCCCTCAG
AGGCAAGCTGGGCAACTTGCCAGCTGATCTCAGCAGTTAATAAACTGACAATGCGCGCGGTACCACA
ACAGAAGCCACGCAGGAATCGGAAGAATAAGAAGCAAAAAGCAAAAACAACAGGCGCCACAAAACAA
CACAAATCAAAAAGAAGCAGCCACCTAAAAAGAAACCGGCTCAAAAGAAAAAGAAGCCGGGCGCAG
AGAGAGGATGTGCATGAAAATCGAAAATGATTGTATTTTCGAAGTCAAGCACGAAGGTAAGGTAACA
GGTTACGCGTGCTGGTGGGGGACAAAGTAATGAAACCAGCACACGTAAAGGGGACCATCGATAACG
CGGACCTGGCCAACTGGCCTTTAAGCGGTCTCTAAGTATGACCTTGAATGCGCGCAGATACCCGTG
CACATGAAGTCCGACGCTTCGAAGTTCACCCATGAGAAACCGGAGGGGTACTACAACCTGGCACCACG
GAGCAGTACAGTACTCAGGAGGCCGGTTCACCATCCCTACAGGTGCTGGCAAACAGGGGACAGCGG
CAGACCGATCTTCGACAACAAGGGACGCGTGGTGGCCATAGTCTTAGGAGGAGCTAATGAAGGAGCC
CGTACAGCCCTCTCGGTGGTGACCTGGAATAAAGACATTGTCACTAAAATCACCCCGAGGGGGCCGA
AGAGTGGAGTCTTGCCATCCCAGTTATGTGCCTGTTGGCAAACACCACGTTCCTTGTCTCCAGCCCC
TTGCACGCCCTGCTGCTACGAAAAGGAACCGGAGGAAACCTACGCATGCTTGAGGACAACGTCATG
AGACCTGGGTACTATCAGCTGCTACAAGCATCCTTAACATGTTCTCCCCACCGCCAGCGACGCAGCAC
CAAGGACAACCTCAATGTCTATAAAGCCACAAGACCATACTTAGCTCACTGTCCCGACTGTGGAGAAG
GGCACTCGTGCCATAGTCCCGTAGCACTAGAACGCATCAGAAATGAAGCGACAGACGGGACGCTGAA
AATCCAGGTCTCCTTGCAAATCGGAATAAAGACGGATGACAGCCACGATTGGACCAAGCTGCGTTATA
TGGACAACCACATGCCAGCAGACGCAGAGAGGGCGGGGCTATTTGTAAGAACATCAGCACCGTGTAC
GATTACTGGAACAATGGGACACTTCATCCTGGCCCGATGTCCAAAAGGGGAACTCTGACGGTGGGAT
TCACTGACAGTAGGAAGATTAGTCACTCATGTACGCACCCATTTACCACGACCCCTCCTGTGATAGGT
CGGGAAAAATTCCATTCCCGACCGCAGCACGGTAAAGAGCTACCTTGCAGCACGTACGTGCAGAGCA
CCGCCGCAACTACCGAGGAGATAGAGGTACACATGCCCCCAGACACCCCTGATCGCACATTAATGTCA
CAACAGTCCGGCAACGTAAAGATCACAGTCAATGGCCAGACGGTGCGGTACAAGTGTAATTGCGGTG
GCTCAAATGAAGGACTAACAACCTACAGACAAAGTGATTAATAACTGCAAGGTTGATCAATGTCATGCC
GCGGTCACCAATCACAAAAAGTGGCAGTATAACTCCCCTCTGGTCCCGCGTAATGCTGAACTTGGGGA
CCGAAAAGGAAAAATTACATCCCGTTTCCGCTGGCAAATGTAACATGCAGGGTGCCTAAAGCAAGG
AACCCACCGTGACGTACGGGAAAAACCAAGTCATCATGCTACTGTATCCTGACCACCCAACACTCCT
GTCCTACCGGAATATGGGAGAAGAACCAAACTATCAAGAAGAGTGGGTGATGCATAAGAAGGAAGTC
GTGCTAACCGTGCCGACTGAAGGGCTCGAGGTACGTGGGGCAACAACGAGCCGTATAAGTATTGGC
CGCAGTTATCTACAAACGGTACAGCCCATGGCCACCCGCATGAGATAATTCTGTATTATTATGAGCTG
TACCCCACTATGACTGTAGTAGTTGTGTCAGTGGCCACGTTCACTCCTGTGATGGTGGGTATGGCA
GCGGGGATGTGCATGTGTGCACGACGCAGATGCATCACACCGTATGAACTGACACCAGGAGCTACCG
TCCCTTTCTGCTTAGCCTAATATGCTGCATCAGAACAGCTAAAGCGGCCACATACCAAGAGGCTGCG
ATATACCTGTGGAACGAGCAGCAACCTTTGTTTTGGCTACAAGCCCTTATTCGCTGGCAGCCCTGATT
GTTCTATGCAACTGTCTGAGACTCTTACCATGCTGCTGTAAAACGTTGGCTTTTTTAGCCGTAATGAGC
GTCGGTGGCCCACTGTGAGCGCGTACGAACACGTAACAGTGATCCCGAACACGGTGGGAGTACCGT
ATAAGACTCTAGTCAATAGACCTGGCTACAGCCCCATGGTATTGGAGATGGAACACTGTGAGTCACT
TTGGAGCCAACACTATCGCTTGATTACATCACGTGCGAGTACAAAACCGTCATCCCGTCTCCGTACGT
GAAGTGCTGCGGTACAGCAGAGTGCAAGGACAAAAACCTACCTGACTACAGCTGTAAGGTCTTACC
GGCGTCTACCCATTTATGTGGGGCGGCGCCTACTGCTTCTGCGACGCTGAAAACACGCAGTTGAGCGA
AGCACACGTGGAGAAGTCCGAATCATGCAAAACAGAATTTGCATCAGCATAACAGGGCTCATACCGCA

TCTGCATCAGCTAAGCTCCGCGTCCTTTACCAAGGAAATAACATCACTGTAAGTGCCTATGCAAACGG
 CGACCATGCCGTCACAGTTAAGGACGCCAAATTCATTGTGGGGCCAATGTCTTCAGCCTGGACACCTT
 TCGACAACAAAATTGTGGTGTACAAAGGTGACGTCTATAACATGGACTACCCGCCCTTTGGCGCAGGA
 AGACCAGGACAATTTGGCGATATCCAAAGTCGCACACCTGAGAGTAAAGACGTCTATGCTAATACAC
 AACTGGTACTGCAGAGACCGGCTGTGGGTACGGTACACGTGCCATACTCTCAGGCACCATCTGGCTTT
 AAGTATTGGCTAAAAGAACGCGGGGCGTCGCTGCAGCACACAGCACCATTGTGGCTGCCAAATAGCAA
 CAAACCCGGTAAGAGCGGTGAAGTGCGCCGTAGGGAACATGCCCATCTCCATCGACATACCGGAAGC
 GGCCTTCACTAGGGTTCGTCGACGCGCCCTCTTTAACGGACATGTCGTGCGAGGTACCAGCCTGCACCC
 ATTCCTCAGACTTTGGGGGCGTCGCCATTATTAATATGCAGCCAGCAAGAAAGGCAAGTGTGCGGTG
 CATTCGATGACTAACGCCGTCATTCGCGGAAGCTGAGATAGAAGTTGAAGGGAATTCTCAGCTGCA
 AATCTCTTTCTCGACGGCCTTAGCCAGCGCCGAATTCGCGGTACAAGTCTGTTCTACACAAGTACACTG
 TGCAGCCGAGTGCCACCCCCGAAGGACCACATAGTCAACTACCCGGCGTCACATACCACCCTCGGGG
 TCCAGGACATCTCCGCTACGGCGATGTCATGGGTGCAGAAGATCACGGGAGGTGTGGGACTGGTTGTT
 GCTGTTGCCGCACTGATTCTAATCGTGGTGTCTATGCGTGTCTTCAGCAGGCACTAAGTGTGACAATTA
 GTATGAAGGTATATGTGTCCCCTAAGAGACACACTGTACATAGCAAATAATCTATAGATCAAAGGGCT
 ACGCAACCCCTGAATAGTAACAAAATACAAAATCACTAAAAATTATAAAAAACAGAAAAATACATAAA
 TAGGTATACGTGTCCCCTAAGAGACACATTGTATGTAGGTGATAAGTATAGATCAAAGGGCCGAATAA
 CCCCTGAATAGTAACAAAATATGAAAATCAATAAAAATCATAAAATAGAAAAACCATAAACAGAAGT
 AGTTCAAAGGGCTATAAAACCCCTGAATAGTAACAAAACATAAAATTAATAAAAATCAAATGAATAC
 CATAATTGGCAAACGGAAGAGATGTAGGTACTTAAGCTTCCTAAAAGCAGCCGAAGTCACTTTGAGAA
 GTAGGCATAGCATACCGAACTCTTCCACGATTCTCCGAACCCACAGGGACGTAGGAGATGTTATTTTG
 TTTTAATATTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

SEQ ID NO: 2

Trình tự axit amin của protein E2 từ chủng virus Chikungunya LR2006_OPY1—các axit amin 339-742 từ
 polyprotein cấu trúc Mã Số Truy Cập GenBank: ABD95938.1 (1-1248 aa)

STKDNFNVYKATRPYLHCPDCGEGHSCHSPVALERIRNEATDGLTKIQVSLQIGIKTDDSHDWTCLRYMD
 NHMPADAERAGLFVRTSAPCTITGTMGHIFILARCPKGETLTVGFTDSRKISHSCTHPFHDPVIGREKFHS
 RPQHGKELPCSTYVQSTAATTEEIEVHMPPDTPDHTLMSQQSGNVKITVNGQTVRYKCNCGGSNEGLTTT
 DKVINNCKVDQCHAAVTNHKKWQYNSPLVPRNAELGDRKGKIHPFPLANVTCRVPKARNPTVYTGKNQ
 VIMLLYPDHTLLSYRNMGEENYQEEWVMHKKEVVLTPVTEGLEVTWGNNEPYKYWPQLSTNGTAHG
 HPHEIILYYYELYPTMTVVVSVATFILLSMVGMAAGMCMCARRRCITPYELTPGATVPFLLSLICCIRTAK
 A

Một số biến thể E2 được xác định trong bản mô tả này

SEQ ID NO: 3

Biến thể E168K của protein E2 từ virus Chikungunya

STKDNFNVYKATRPYLHCPDCGEGHSCHSPVALERIRNEATDGLTKIQVSLQIGIKTDDSHDWTCLRYMD
 NHMPADAERAGLFVRTSAPCTITGTMGHIFILARCPKGETLTVGFTDSRKISHSCTHPFHDPVIGREKFHS
 RPQHGKELPCSTYVQSTAATTEEIKVHMPPDTPDHTLMSQQSGNVKITVNGQTVRYKCNCGGSNEGLTTT
 DKVINNCKVDQCHAAVTNHKKWQYNSPLVPRNAELGDRKGKIHPFPLANVTCRVPKARNPTVYTGKNQ
 VIMLLYPDHTLLSYRNMGEENYQEEWVMHKKEVVLTPVTEGLEVTWGNNEPYKYWPQLSTNGTAHG
 HPHEIILYYYELYPTMTVVVSVATFILLSMVGMAAGMCMCARRRCITPYELTPGATVPFLLSLICCIRTAK
 A

SEQ ID NO: 4

Biến thể G55R của protein E2 từ virus Chikungunya

STKDNFNVYKATRPYLHCPDCGEGHSCHSPVALERIRNEATDGLTKIQVSLQIRIKTDDSHDWTCLRYMD
 NHMPADAERAGLFVRTSAPCTITGTMGHIFILARCPKGETLTVGFTDSRKISHSCTHPFHDPVIGREKFHS
 RPQHGKELPCSTYVQSTAATTEEIEVHMPPDTPDHTLMSQQSGNVKITVNGQTVRYKCNCGGSNEGLTTT
 DKVINNCKVDQCHAAVTNHKKWQYNSPLVPRNAELGDRKGKIHPFPLANVTCRVPKARNPTVYTGKNQ
 VIMLLYPDHTLLSYRNMGEENYQEEWVMHKKEVVLTPVTEGLEVTWGNNEPYKYWPQLSTNGTAHG

HPHEILYYYELYPTMTVVVSVATFILLSMVGMAAGMCMCARRRCITPYELTPGATVPFLLSLICCIRTAK
A

SEQ ID NO: 5

Biến thể E247K của protein E2 từ virus Chikungunya

STKDNFNVYKATRPYLAHCPDCGEGHSCSPVALERIRNEATDGTCLKIQVSLQIGIKTDDSHDWTCLRYMD
NHMPADAERAGLFVRTSAPCTITGTMGHFILARCPKGETLTVGFTDSRKISHSCTHPFHHDPPVIGREKFHS
RPQHGKELPCSTYVQSTAATTEEIEVHMPPDTPDHTLMSQQSGNVKITVNGQTVRYKCNCGGSNEGLTTT
DKVINNCKVDQCHAAVTNHKKWQYNSPLVPRNAKLGDRKGKIHIPPLANVTCRVPKARNPTVTYGKNQ
VIMLLYPDHTLLSYRNMGEENYQEEWVMHKKEVVLTVPTGLEVTWGNNEPYKYWPQLSTNGTAHG
HPHEILYYYELYPTMTVVVSVATFILLSMVGMAAGMCMCARRRCITPYELTPGATVPFLLSLICCIRTAK
A

SEQ ID NO: 6

BIẾN THỂ G82R của protein E2 từ virus Chikungunya

STKDNFNVYKATRPYLAHCPDCGEGHSCSPVALERIRNEATDGTCLKIQVSLQIGIKTDDSHDWTCLRYMD
NHMPADAERARLLFVRTSAPCTITGTMGHFILARCPKGETLTVGFTDSRKISHSCTHPFHHDPPVIGREKFHS
RPQHGKELPCSTYVQSTAATTEEIEVHMPPDTPDHTLMSQQSGNVKITVNGQTVRYKCNCGGSNEGLTTT
DKVINNCKVDQCHAAVTNHKKWQYNSPLVPRNAELGDRKGKIHIPPLANVTCRVPKARNPTVTYGKNQ
VIMLLYPDHTLLSYRNMGEENYQEEWVMHKKEVVLTVPTGLEVTWGNNEPYKYWPQLSTNGTAHG
HPHEILYYYELYPTMTVVVSVATFILLSMVGMAAGMCMCARRRCITPYELTPGATVPFLLSLICCIRTAK
A

SEQ ID NO: 7

BIẾN THỂ H232Y của protein E2 từ virus Chikungunya

STKDNFNVYKATRPYLAHCPDCGEGHSCSPVALERIRNEATDGTCLKIQVSLQIGIKTDDSHDWTCLRYMD
NHMPADAERAGLFVRTSAPCTITGTMGHFILARCPKGETLTVGFTDSRKISHSCTHPFHHDPPVIGREKFHS
RPQHGKELPCSTYVQSTAATTEEIEVHMPPDTPDHTLMSQQSGNVKITVNGQTVRYKCNCGGSNEGLTTT
DKVINNCKVDQCHAAVTNYKKWQYNSPLVPRNAELGDRKGKIHIPPLANVTCRVPKARNPTVTYGKNQ
VIMLLYPDHTLLSYRNMGEENYQEEWVMHKKEVVLTVPTGLEVTWGNNEPYKYWPQLSTNGTAHG
HPHEILYYYELYPTMTVVVSVATFILLSMVGMAAGMCMCARRRCITPYELTPGATVPFLLSLICCIRTAK
A

SEQ ID NO: 8

Môi 1F để giải trình tự CHIKV-Δ5nsP3

TTAGGATCCGATGGCTGCGTGAGACAC

SEQ ID NO: 9

Môi 1R để giải trình tự CHIKV-Δ5nsP3

TAACCTCGAGCCGTCAGGTCTGTTGAACAT

SEQ ID NO: 10

Môi 2F để giải trình tự CHIKV-Δ5nsP3

TTAGGATCCTACCACCAGGCGATTAAAG

SEQ ID NO: 11

Môi 2R để giải trình tự CHIKV-Δ5nsP3

TAACCTCGAGCTTTGCCCACTTACTGAAGG

SEQ ID NO: 12

Môi 3F để giải trình tự CHIKV-Δ5nsP3

TTAGGATCCTGCTACAGAAGTCACGCC

SEQ ID NO: 13

Mũi 3R để giải trình tự CHIKV- Δ 5nsP3

TAACTCGAGGCCAAAGCGTGAATCAG

SEQ ID NO: 14

Mũi 4F để giải trình tự CHIKV- Δ 5nsP3

TTAGGATCCAACAGCTTGAGGACAGAGCG

SEQ ID NO: 15

Mũi 4R để giải trình tự CHIKV- Δ 5nsP3

TAACTCGAGCTCTGTCTCATCACGTCGG

SEQ ID NO: 16

Mũi 5F để giải trình tự CHIKV- Δ 5nsP3

TTAGGATCCAAATTGCAGTCATAGGAGTCTTC

SEQ ID NO: 17

Mũi 5R để giải trình tự CHIKV- Δ 5nsP3

TAACTCGAGAGTACGTTGACGTGCTCTGA

SEQ ID NO: 18

Mũi 6F để giải trình tự CHIKV- Δ 5nsP3

TTAGGATCCGTGGGTAAACAACACTGCAAA

SEQ ID NO: 19

Mũi 6R để giải trình tự CHIKV- Δ 5nsP3

TAACTCGAGGGTTAAAGTCTTCTATCCTCCTGG

SEQ ID NO: 20

Mũi 7F để giải trình tự CHIKV- Δ 5nsP3

TTAGGATCCGGATAACCACTGGGATAATAGG

SEQ ID NO: 21

Mũi 7R để giải trình tự CHIKV- Δ 5nsP3

TAACTCGAGAGTTGTGAAATTCCTTCTGCC

SEQ ID NO: 22

Mũi 8F để giải trình tự CHIKV- Δ 5nsP3

TTAGGATCCCGCAGATAGAACCAGTGAAC

SEQ ID NO: 23

Mũi 8R để giải trình tự CHIKV- Δ 5nsP3

TAACTCGAGCAGCAGCTCTACTTGGGTC

SEQ ID NO: 24

Mũi 9F để giải trình tự CHIKV- Δ 5nsP3

TTAGGATCCAGGAGGGAAAGACAGGCT

SEQ ID NO: 25

Mũi 9R để giải trình tự CHIKV- Δ 5nsP3

TAACTCGAGCCCTCGCCTTCTTCTG

SEQ ID NO: 26

Mỗi 10F để giải trình tự CHIKV- Δ 5nsP3

TTAGGATCCCAAATAAGAGAGTGCAAAAAG

SEQ ID NO: 27

Mỗi 10R để giải trình tự CHIKV- Δ 5nsP3

TAACTCGAGCCTGGAGTTTCTTAAGTAATAGTTGC

SEQ ID NO: 28

Mỗi 11F để giải trình tự CHIKV- Δ 5nsP3

TTAGGATCCACCGGTCCAGGTCATTTA

SEQ ID NO: 29

Mỗi 11R để giải trình tự CHIKV- Δ 5nsP3

TAACTCGAGGCAGCAAATTCTTCCCAG

SEQ ID NO: 30

Mỗi 12F để giải trình tự CHIKV- Δ 5nsP3

TTAGGATCCCCATTCCAGAACACACTACAG

SEQ ID NO: 31

Mỗi 12R để giải trình tự CHIKV- Δ 5nsP3

TAACTCGAGATACCTGATTTTCATCATGGC

SEQ ID NO: 32

Mỗi 13F để giải trình tự CHIKV- Δ 5nsP3

TTAGGATCCCCTTTGATAAGAGCCAAGATG

SEQ ID NO: 33

Mỗi 13R để giải trình tự CHIKV- Δ 5nsP3

TAACTCGAGTACAAAGTTATGACGGGTCCT

SEQ ID NO: 34

Mỗi 14F để giải trình tự CHIKV- Δ 5nsP3

TTAGGATCCCAACGAACAGGGCTAATTG

SEQ ID NO: 35

Mỗi 14R để giải trình tự CHIKV- Δ 5nsP3

TAACTCGAGGACCGCTTAAAGGCCAG

SEQ ID NO: 36

Mỗi 15F để giải trình tự CHIKV- Δ 5nsP3

TTAGGATCCGTGCATGAAAATCGAAAATG

SEQ ID NO: 37

Mỗi 15R để giải trình tự CHIKV- Δ 5nsP3

TAACTCGAGTGGTCTTGTGGCTTTATAGACA

SEQ ID NO: 38

Mỗi 16F để giải trình tự CHIKV- Δ 5nsP3

TTAGGATCCAACCGGAGGAAACCCTAC

SEQ ID NO: 39

Mỗi 16R để giải trình tự CHIKV- Δ 5nsP3

TAACTCGAGGTACCGCACCGTCTGG

SEQ ID NO: 40

Mỗi 17F để giải trình tự CHIKV- Δ 5nsP3

TTAGGATCCAGCTACCTTGCAGCACGT

SEQ ID NO: 41

Mỗi 17R để giải trình tự CHIKV- Δ 5nsP3

TAACTCGAGCCCCACCATCGACAGG

SEQ ID NO: 42

Mỗi 18F để giải trình tự CHIKV- Δ 5nsP3

TTAGGATCCCGAGCCGTATAAGTATTGGC

SEQ ID NO: 43

Mỗi 18R để giải trình tự CHIKV- Δ 5nsP3

TAACTCGAGCGCCGGTGAAGACCTTAC

SEQ ID NO: 44

Mỗi 19F để giải trình tự CHIKV- Δ 5nsP3

TTAGGATCCACTACTGTCAGTCACTTTGGAGC

SEQ ID NO: 45

Mỗi 19R để giải trình tự CHIKV- Δ 5nsP3

TAACTCGAGTACCGGGTTTGTGCTATTT

SEQ ID NO: 46

Mỗi 20F để giải trình tự CHIKV- Δ 5nsP3

TTAGGATCCCACAACTGGTACTGCAGAGAC

SEQ ID NO: 47

Mỗi 20R để giải trình tự CHIKV- Δ 5nsP3

TAACTCGAGGCGTAGCCCTTTGATCTATAG

SEQ ID NO: 48

Mỗi 21F để giải trình tự CHIKV- Δ 5nsP3

TTAGGATCCGGTGCTATGCGTGTCGT

SEQ ID NO: 49

Mỗi 21R để giải trình tự CHIKV- Δ 5nsP3

TAACTCGAGATCTCCTACGTCCCTGTGGG

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Dược phẩm chứa

- (i) các hạt CHIKV- Δ 5nsP3 biểu hiện protein cấu trúc E2 như được xác định bởi trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2;
 - (ii) các hạt CHIKV- Δ 5nsP3 biểu hiện protein cấu trúc E2 có sự đột biến E168K trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2; và
 - (iii) tùy ý, tá dược được dụng;
- trong đó từ 1 đến 50% hạt CHIKV- Δ 5nsP3 trong dược phẩm này biểu hiện protein cấu trúc E2 có sự đột biến E168K nêu trên.

2. Dược phẩm chứa (i) các hạt CHIKV- Δ 5nsP3; và (ii) tùy ý, tá dược được dụng; trong đó ít nhất 30% hạt CHIKV- Δ 5nsP3 có mặt trong dược phẩm này biểu hiện protein cấu trúc E2 như được xác định bởi trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2.

3. Dược phẩm theo điểm 1 hoặc 2, trong đó ít nhất 50%, ít nhất 75% hoặc ít nhất 90% hạt CHIKV- Δ 5nsP3 có mặt trong dược phẩm này biểu hiện protein cấu trúc E2 như được xác định bởi trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2.

4. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó ít hơn 40%, ít hơn 25% hoặc ít hơn 10% hạt CHIKV- Δ 5nsP3 có mặt trong dược phẩm này biểu hiện protein cấu trúc E2 có sự đột biến E168K nêu trên.

5. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó từ 5 đến 30% hoặc từ 10 đến 20% hạt CHIKV- Δ 5nsP3 có mặt trong dược phẩm này biểu hiện protein cấu trúc E2 có sự đột biến E168K nêu trên.

6. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, thu được hoặc có thể thu được bằng cách tạo ra các hạt CHIKV- Δ 5nsP3 ở tế bào Vero.

7. Được phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó được phẩm này gây cảm ứng kháng thể làm trung hòa chống lại CHIKV- Δ 5nsP3 ở chuột được gây miễn dịch bằng được phẩm này làm cho huyết thanh chứa kháng thể làm trung hòa và trong đó huyết thanh này làm trung hòa sự nhiễm virus Chikungunya (CHIKV) của các tế bào Vero ít nhất là 80% trong thử nghiệm làm trung hòa *in vitro*, với hệ pha loãng huyết thanh theo tỷ lệ 1:80.

8. Được phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó các hạt CHIKV- Δ 5nsP3 trong mục (i) nêu trên được xác định bởi trình tự polynucleotit nêu trong SEQ ID NO: 1.

9. Được phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó được phẩm này chứa lượng hữu hiệu của các hạt CHIKV- Δ 5nsP3 biểu hiện protein cấu trúc E2 như được xác định bởi trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2, trong đó lượng hữu hiệu này được xác định là ít nhất 10^3 hoặc ít nhất 10^4 hạt CHIKV- Δ 5nsP3 biểu hiện protein cấu trúc E2 như được xác định bởi trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2.

10. Được phẩm theo điểm 9, trong đó lượng hữu hiệu nêu trên được xác định là khoảng 10^4 hạt CHIKV- Δ 5nsP3 biểu hiện protein cấu trúc E2 như được xác định bởi trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2.

11. Được phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, trong đó được phẩm này được bào chế ở dạng được phẩm một-liều.

12. Được phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11, trong đó được phẩm này được bào chế ở dạng vaccin.

13. Được phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12, trong đó được phẩm này được bào chế ở dạng đông khô nhanh.

14. Được phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13, trong đó được phẩm

này được bào chế ở dạng sử dụng dưới da.

15. Quy trình sản xuất được phẩm chứa các hạt CHIKV- Δ 5nsP3 biểu hiện protein cấu trúc E2 như được xác định bởi trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 bao gồm bước:

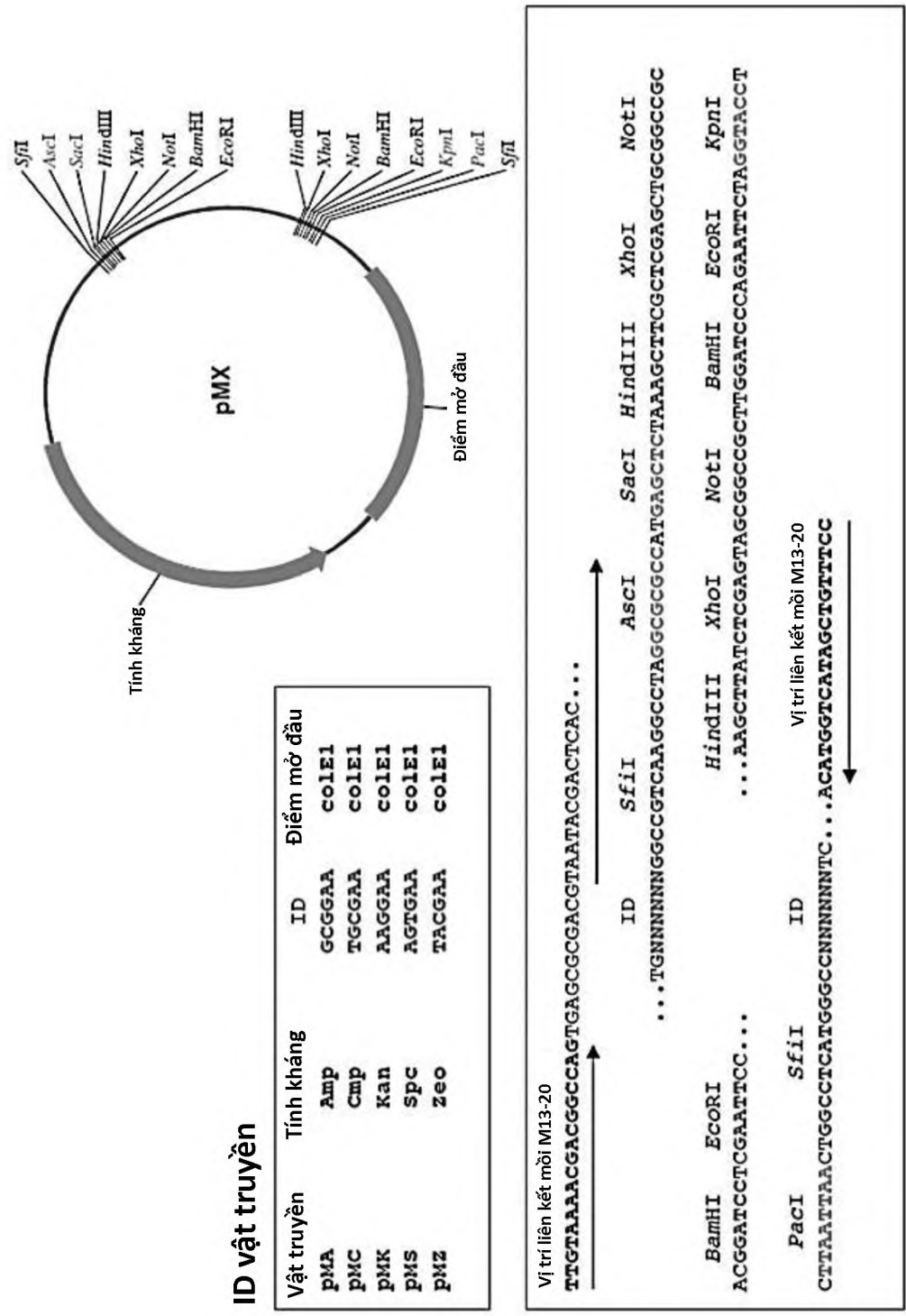
- nuôi cấy CHIKV- Δ 5nsP3 trên tế bào chủ theo cách để làm giảm đến mức tối thiểu sự có mặt của đột biến làm giảm-khả năng gây miễn dịch của virus.

16. Quy trình theo điểm 15, trong đó các hạt CHIKV- Δ 5nsP3 nêu trên được xác định bởi trình tự polynucleotit nêu trong SEQ ID NO: 1 và được cấy chuyển trên tế bào chủ trong môi trường nuôi cấy ít hơn 5 lần sau khi tách khỏi virus.

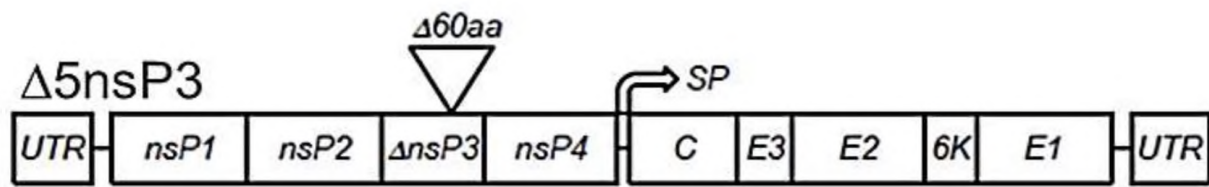
17. Quy trình theo điểm 15 hoặc 16, trong đó các hạt CHIKV- Δ 5nsP3 nêu trên được cấy chuyển trên tế bào chủ trong môi trường nuôi cấy tối đa ba lần.

Fig. 1

1/23



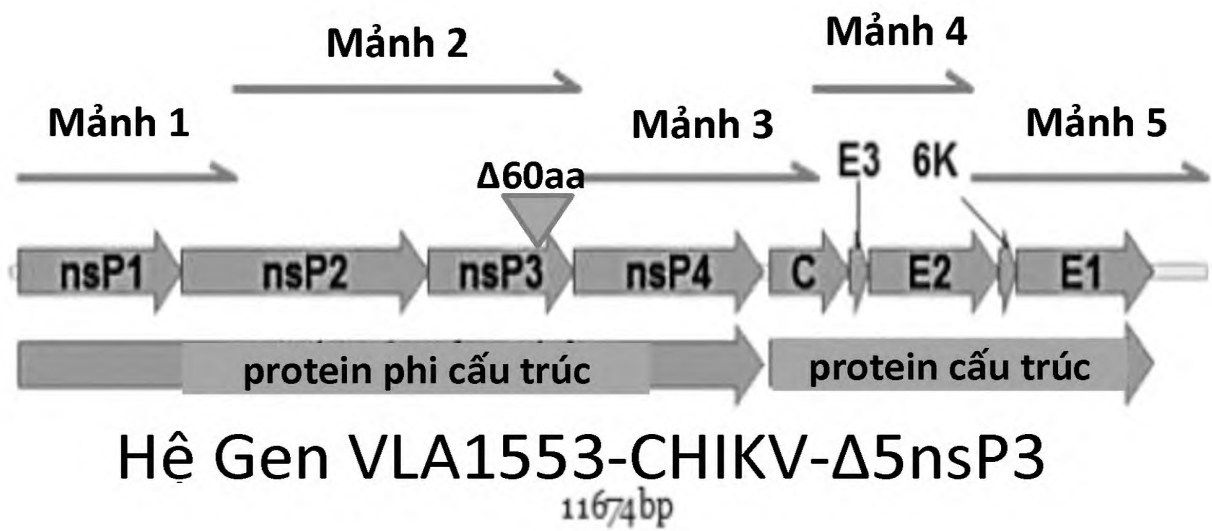
2/23

Fig. 2

3/23

Fig. 3

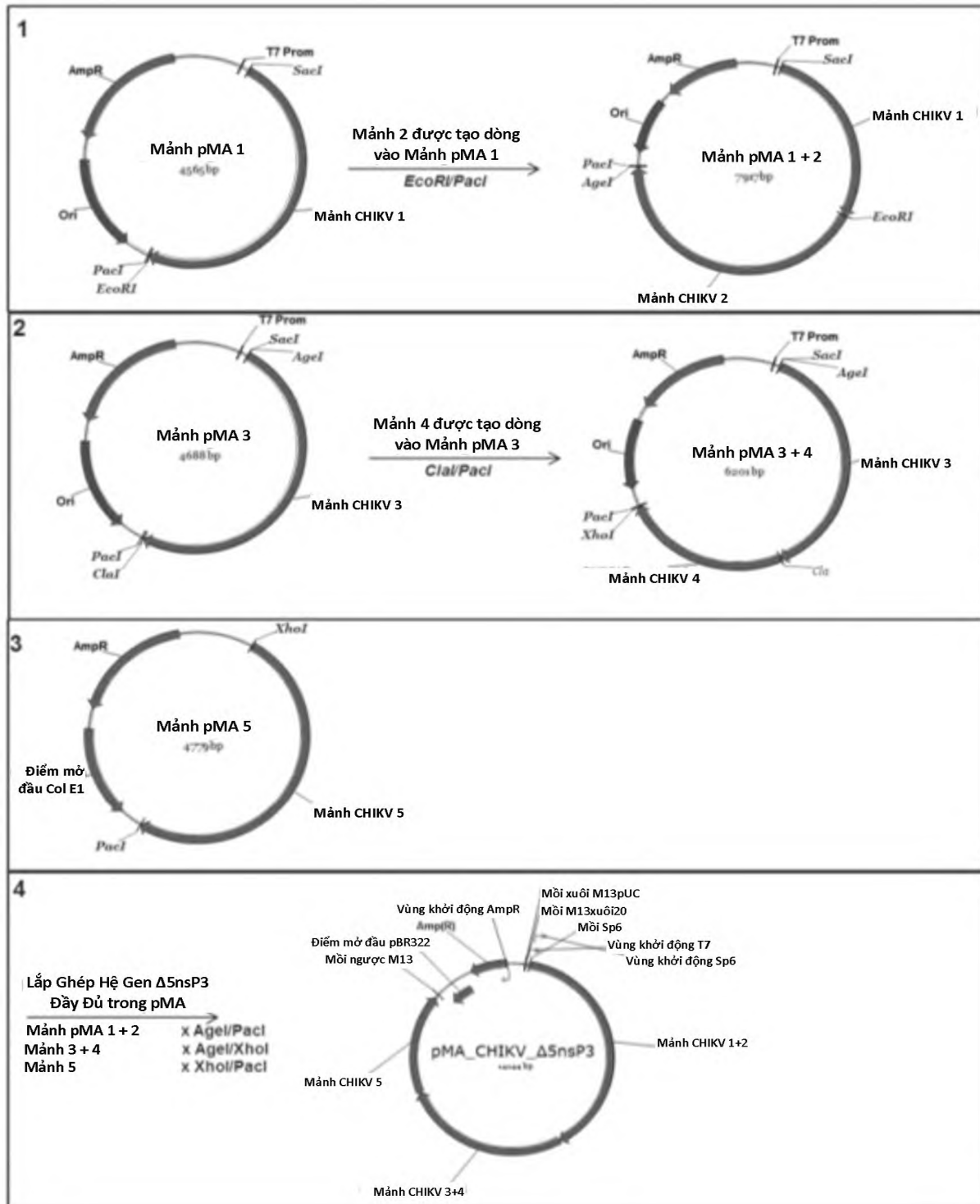
A.



4/23

Fig. 3 (tiếp)

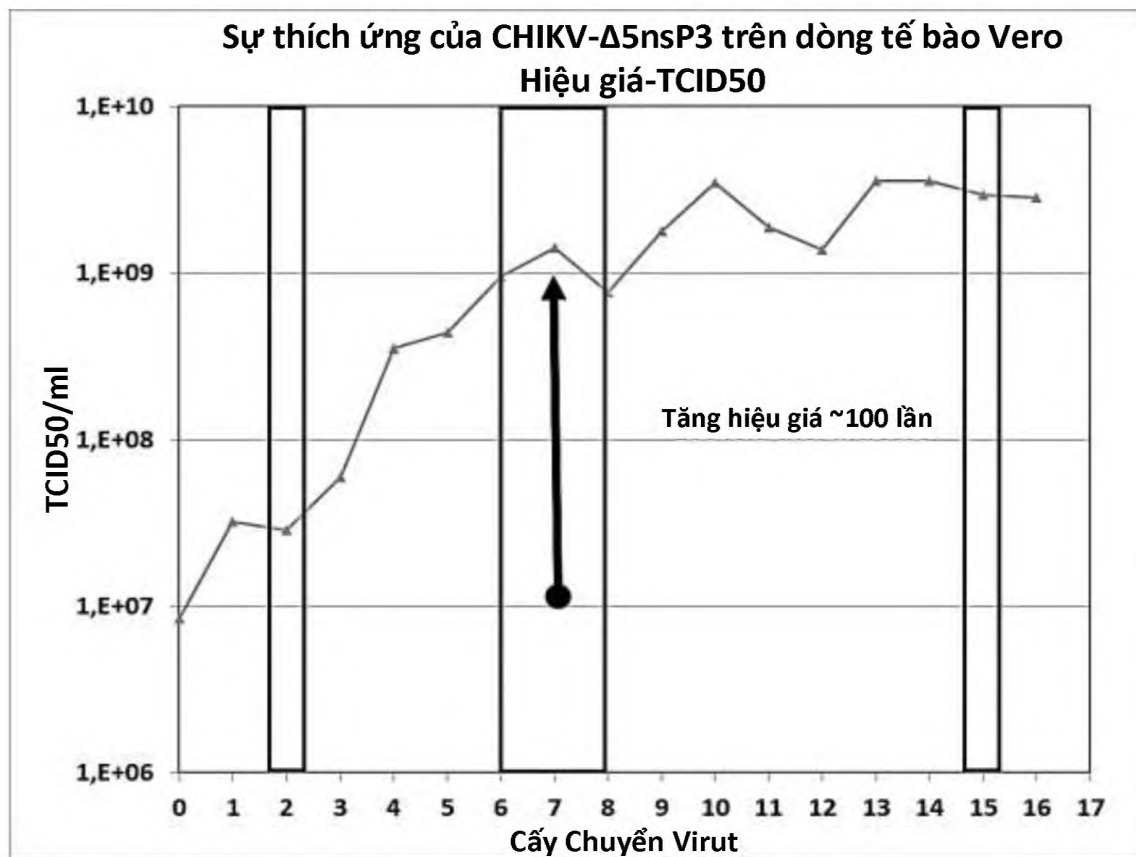
B.



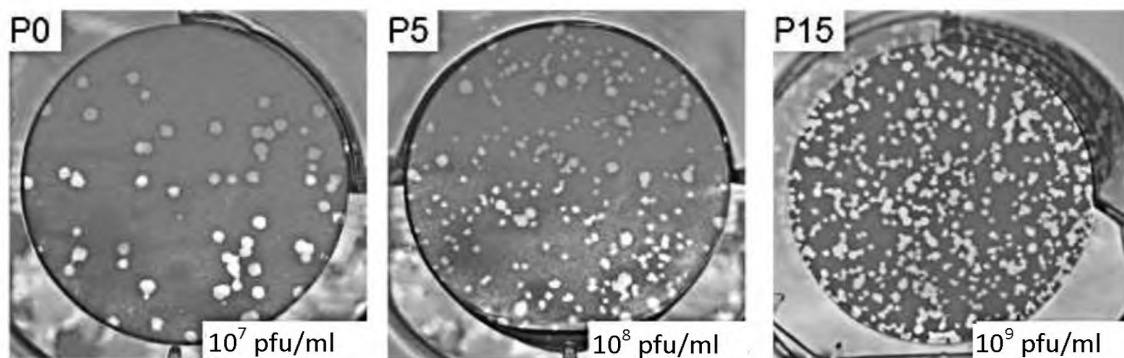
5/23

Fig. 4

A.



B.



Kích thước mảng, Khả năng gây miễn dịch

Hiệu giá virus

6/23

Fig. 4 (tiếp)

C.

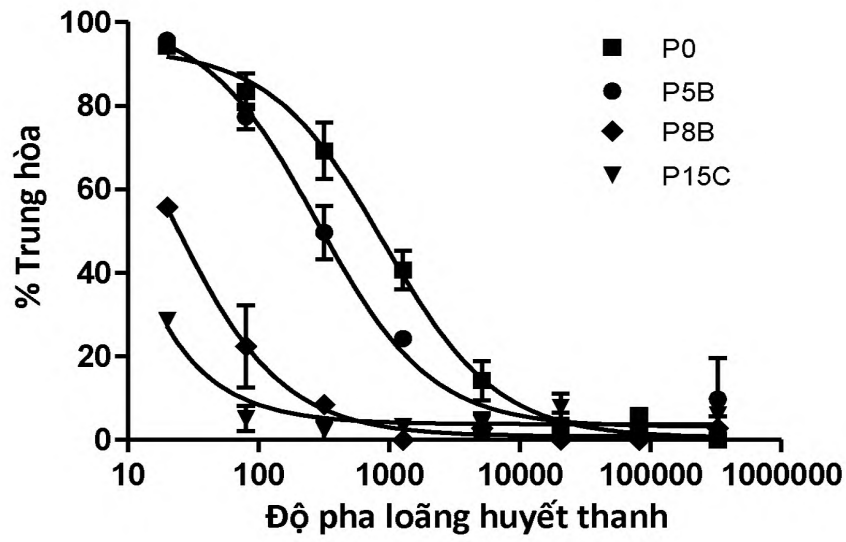
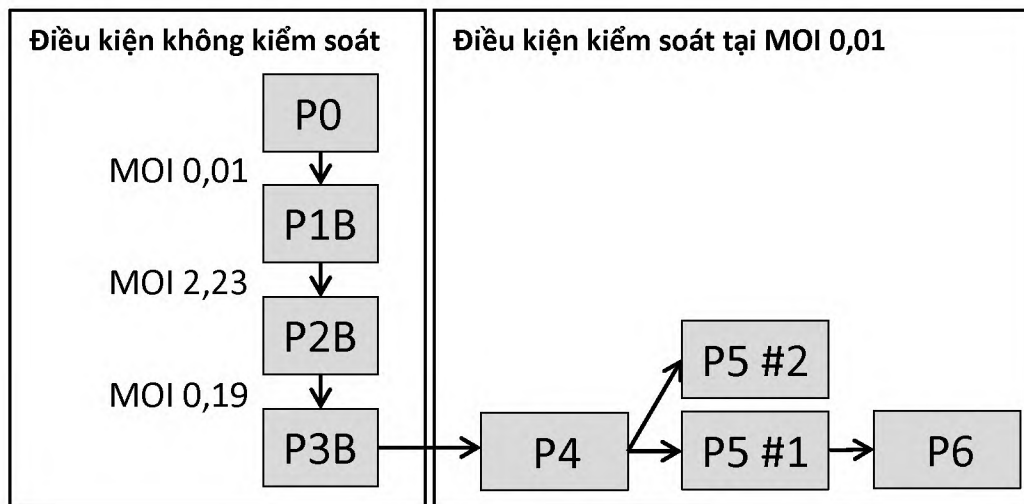


Fig. 5

A.



B.

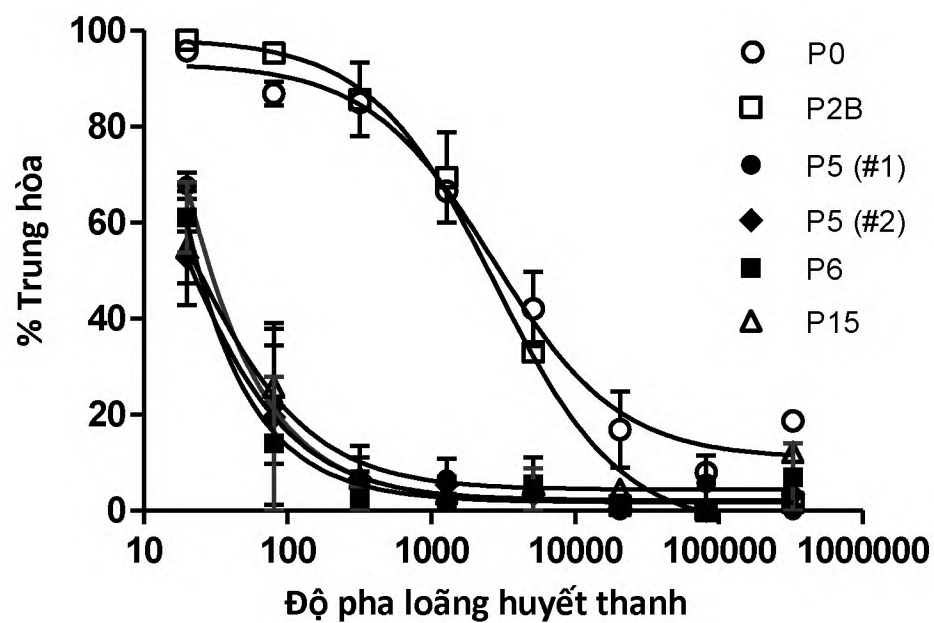
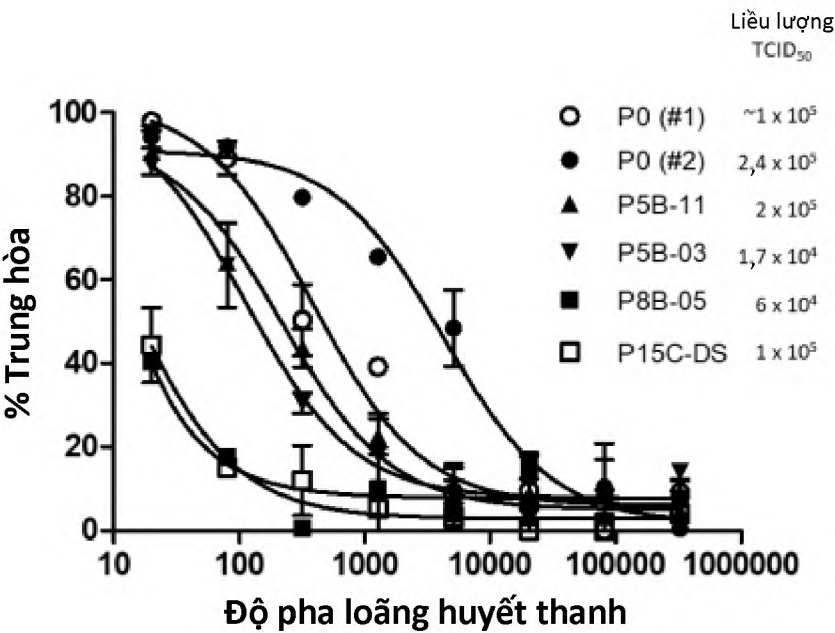
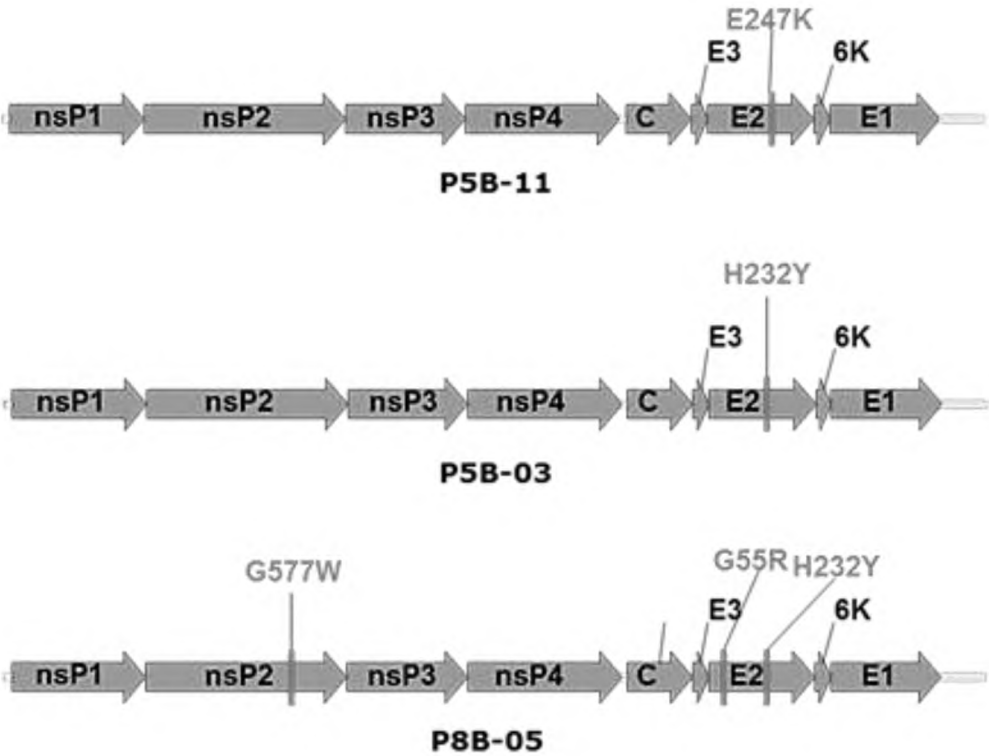


Fig. 6
A.



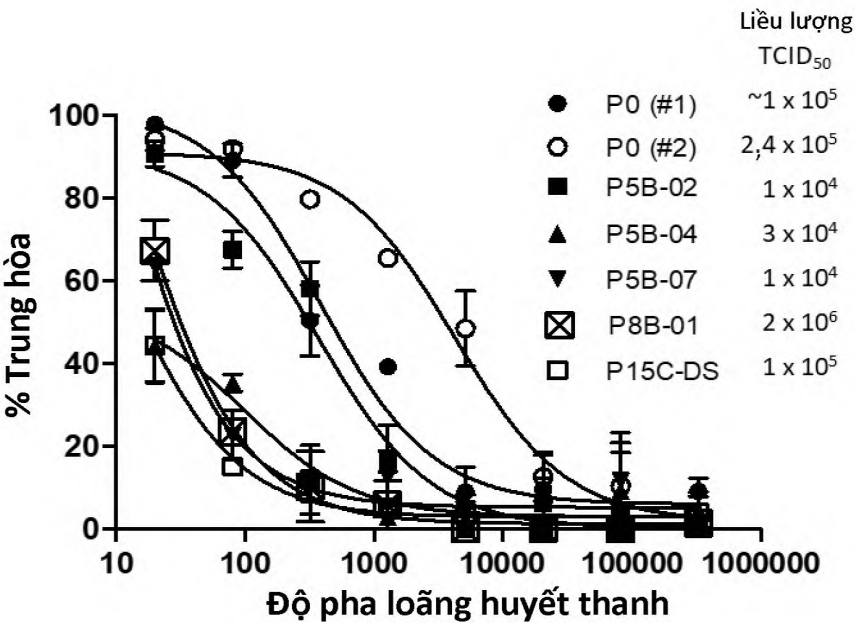
B.



9/23

Fig. 6 (tiếp)

C.



D.

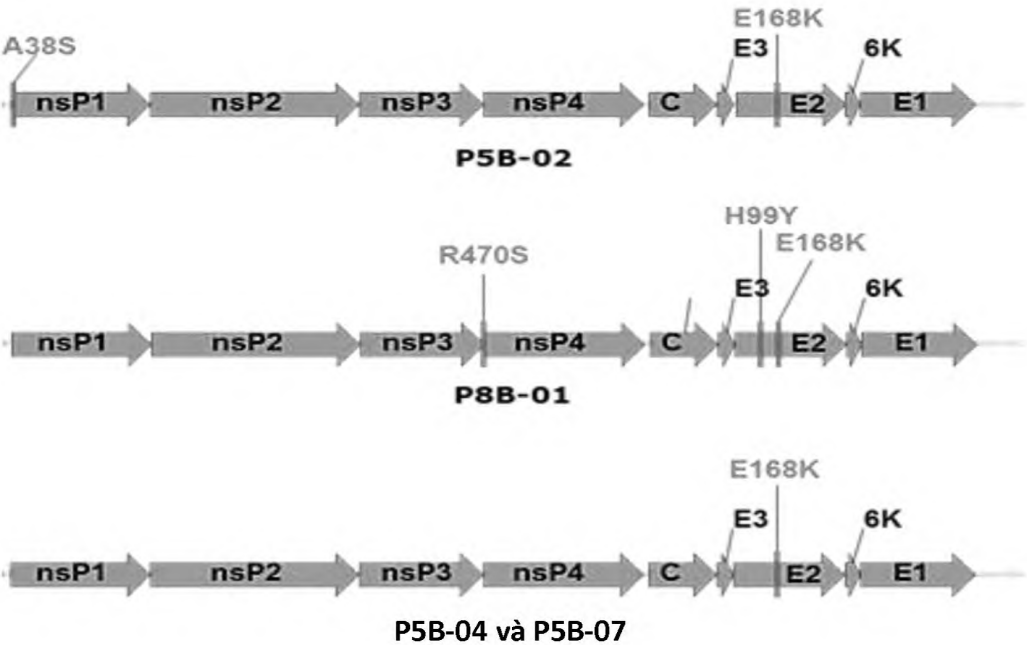


Fig. 7

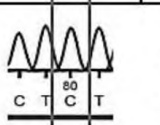
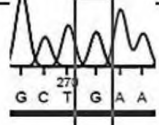
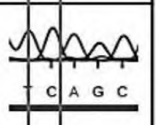
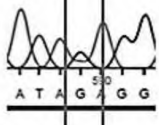
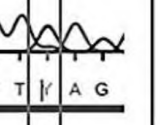
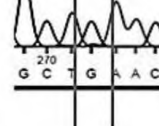
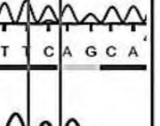
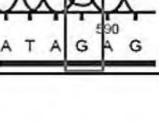
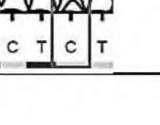
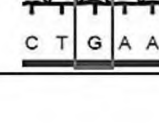
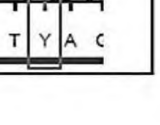
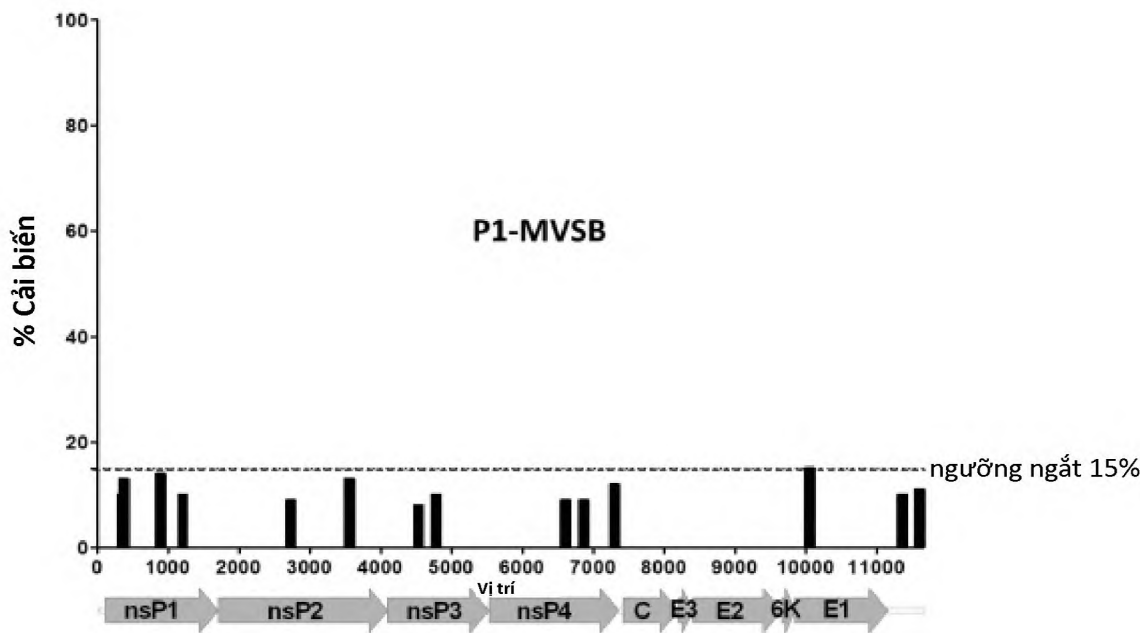
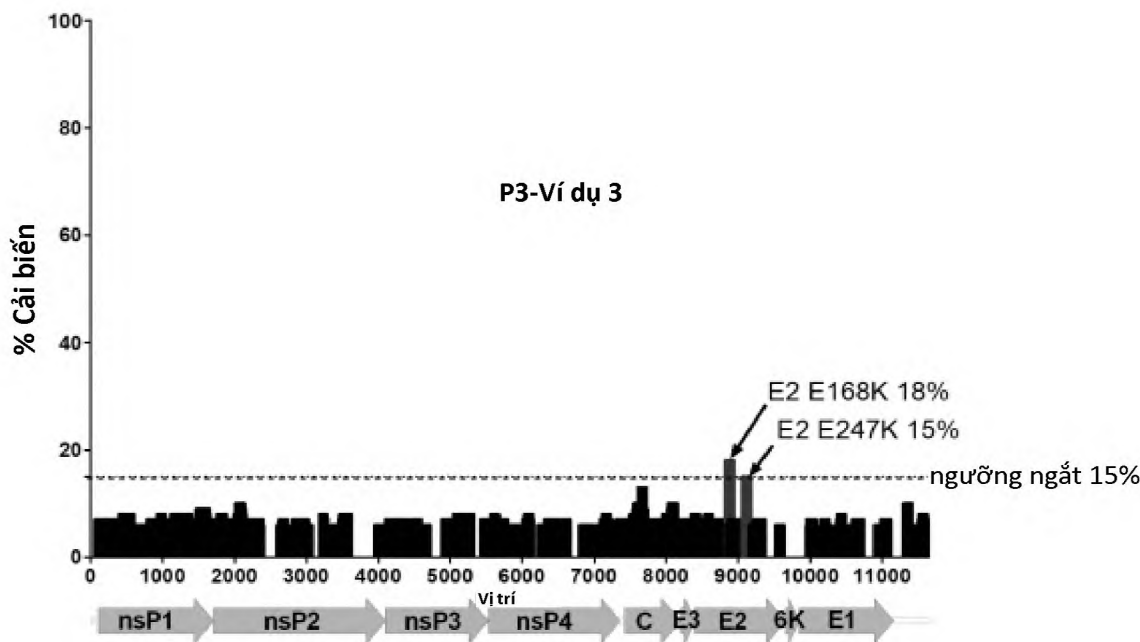
Gen	E168K		E247K	
	Mỗi 16fw	Mỗi 16rev	Mỗi 17fw	Mỗi 17rev
P0	 T A G A G 590	 C T C T 80	 G C T G A A 279	 T C A G C
P3 Ví dụ 1	 A T A G G G 590	 : T N T	 T G C T G A A 70	 T T A G
P3 Ví dụ 2	 A T A G A G G 590	 C C T Y T A T	 G C T G A A C 270	 G T T C A G C A 390
P3 Ví dụ 3	 T A G A G G 590	 C C T C A T 80	 G A A C 280	 G T T C A G C A
P3 Ví dụ 4	 A T A G A G 590	 C C T C T	 C T G A A	 T T Y A C

Fig. 8

A.



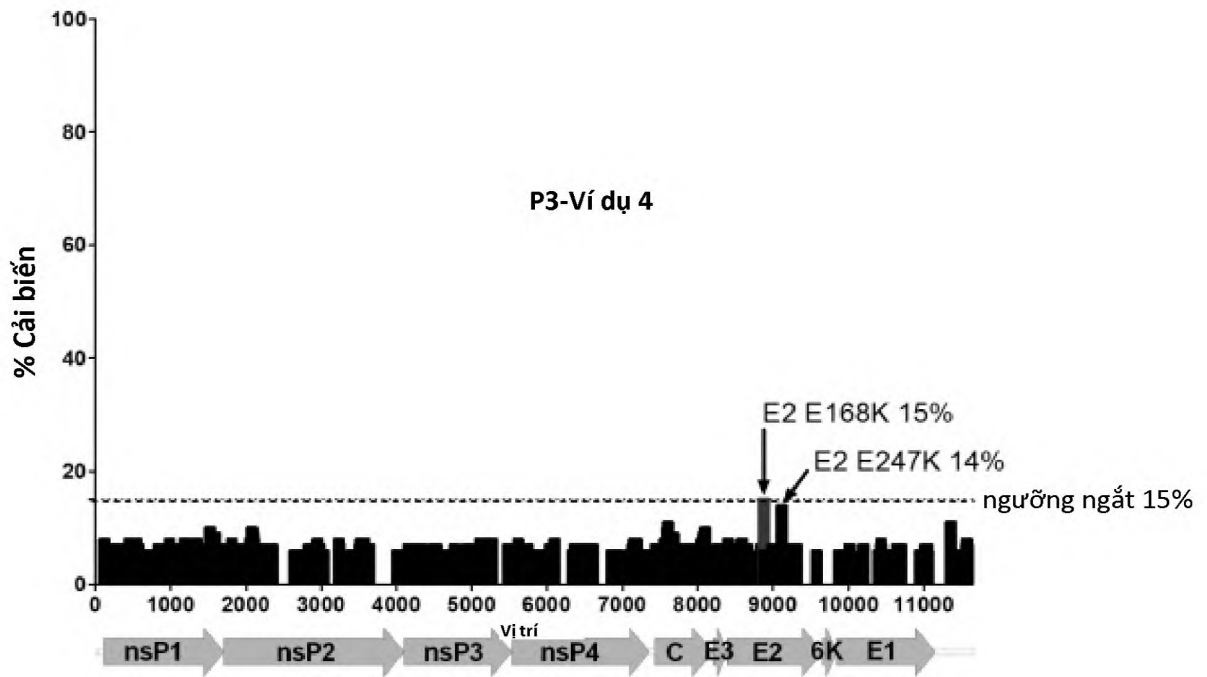
B.



12/23

Fig. 8 (tiếp)

C.



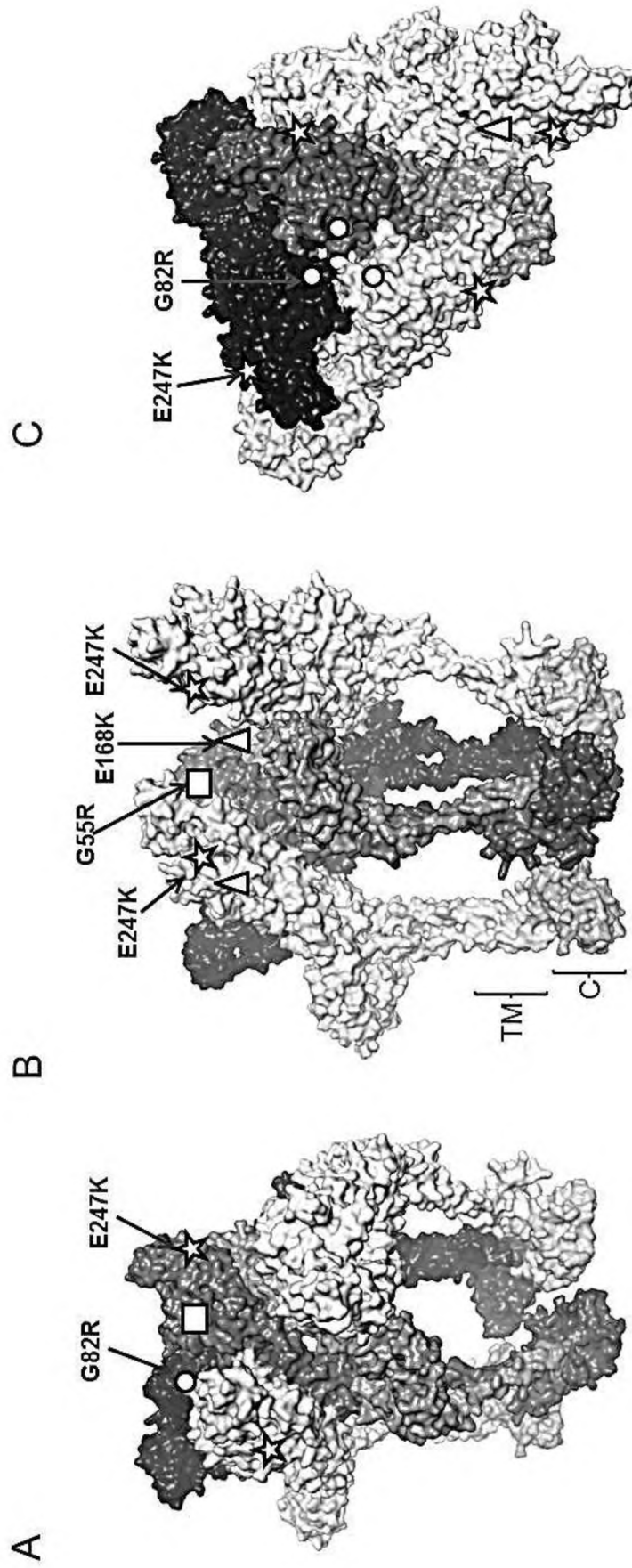
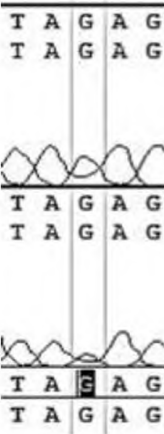
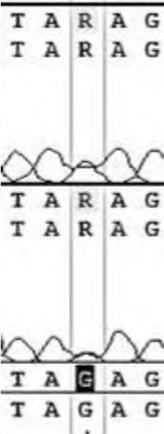
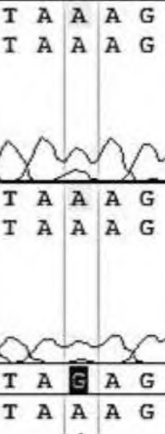
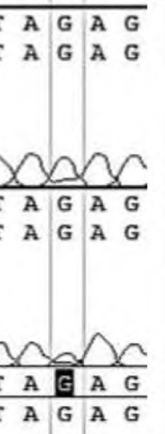
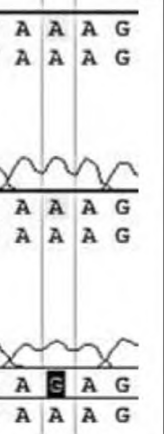
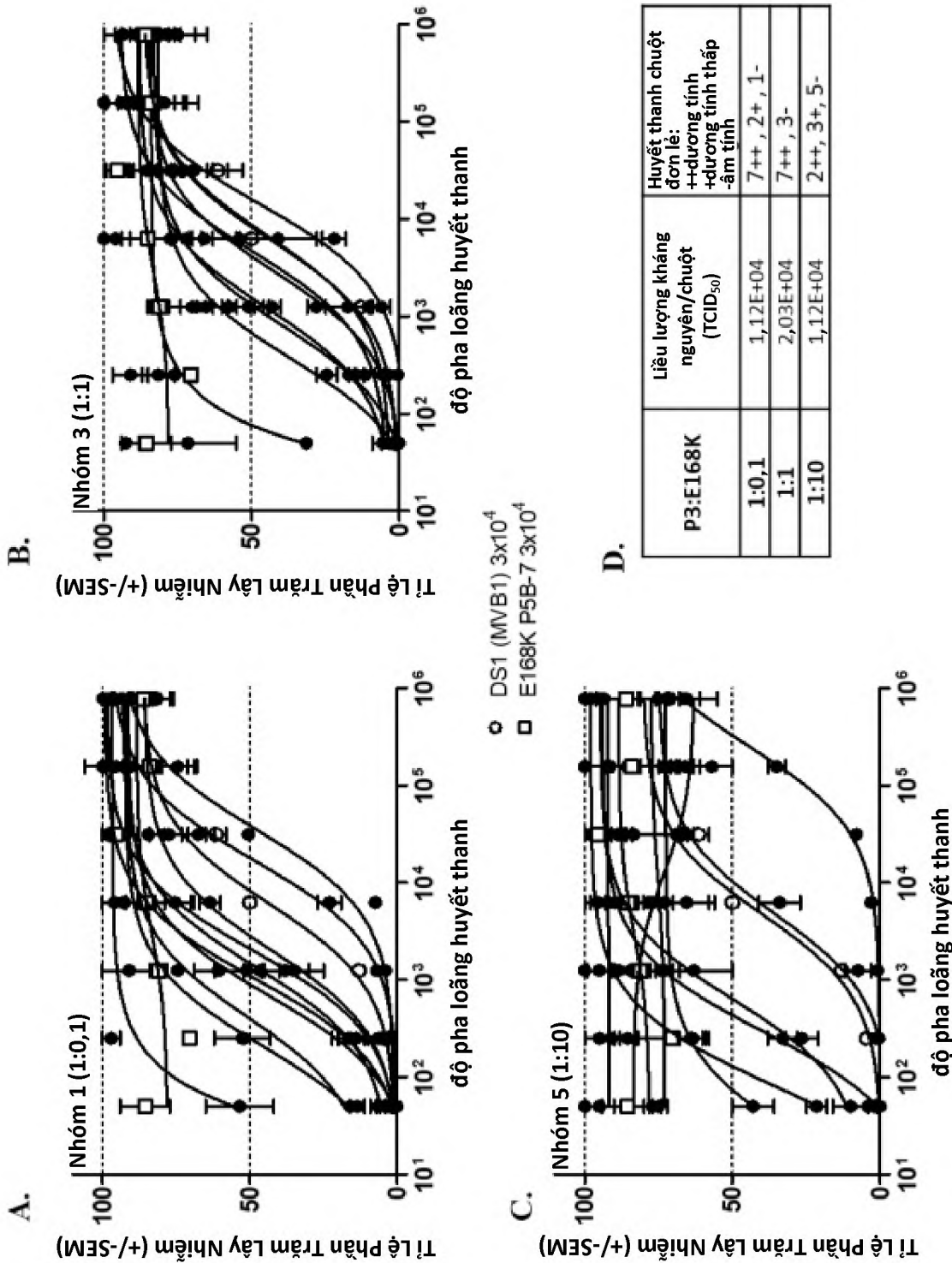


Fig. 10

	Nhóm để gây miễn dịch dưới da gồm các con chuột C57Bl/6				
	Nhóm 1	Nhóm 3	Nhóm 5	Nhóm 6	Nhóm 7
Tỉ lệ tạo chế phẩm của P3 và P5B-07 (E168K)	P3:E168K 1:0,1	P3:E168K 1:1	P3:E168K 1:10	P3	P5B-7
Trình tự tham chiếu	G	G	G	G	G
Tính không đồng nhất	G>A	G=A	G<A	G>A	A
Sắc ký đồ					

15/23

Fig. 11



16/23

Fig. 12

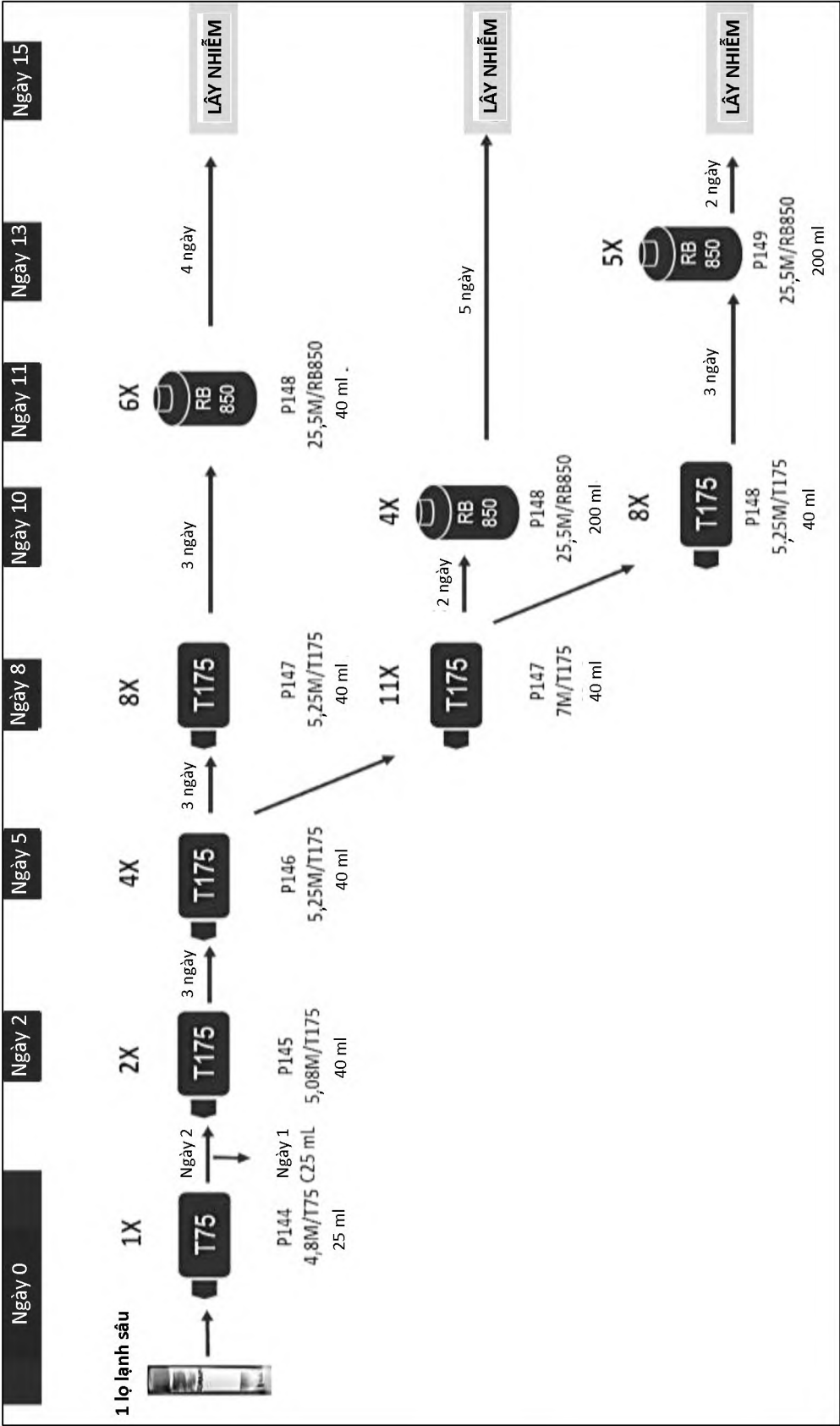
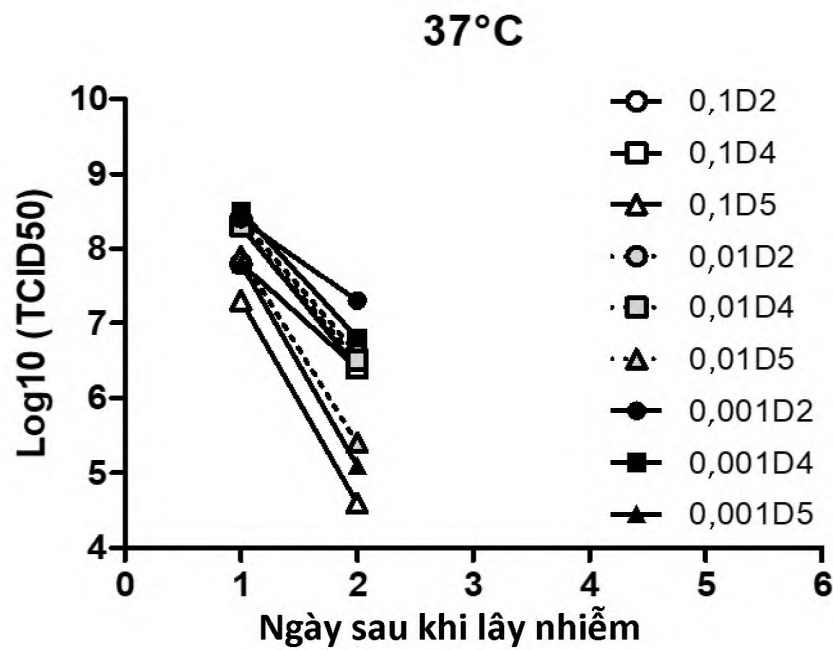
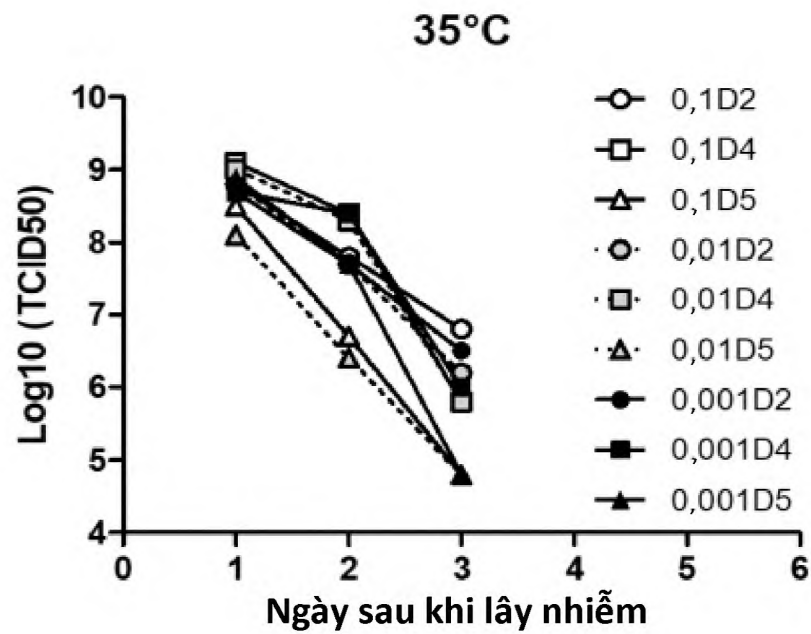


Fig. 13

A.



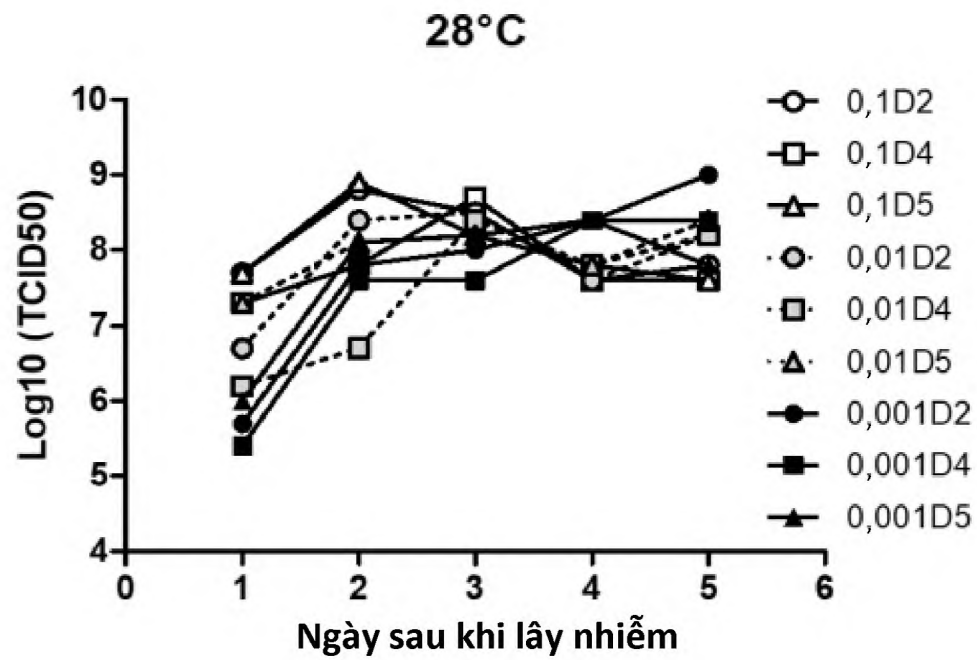
B.



18/23

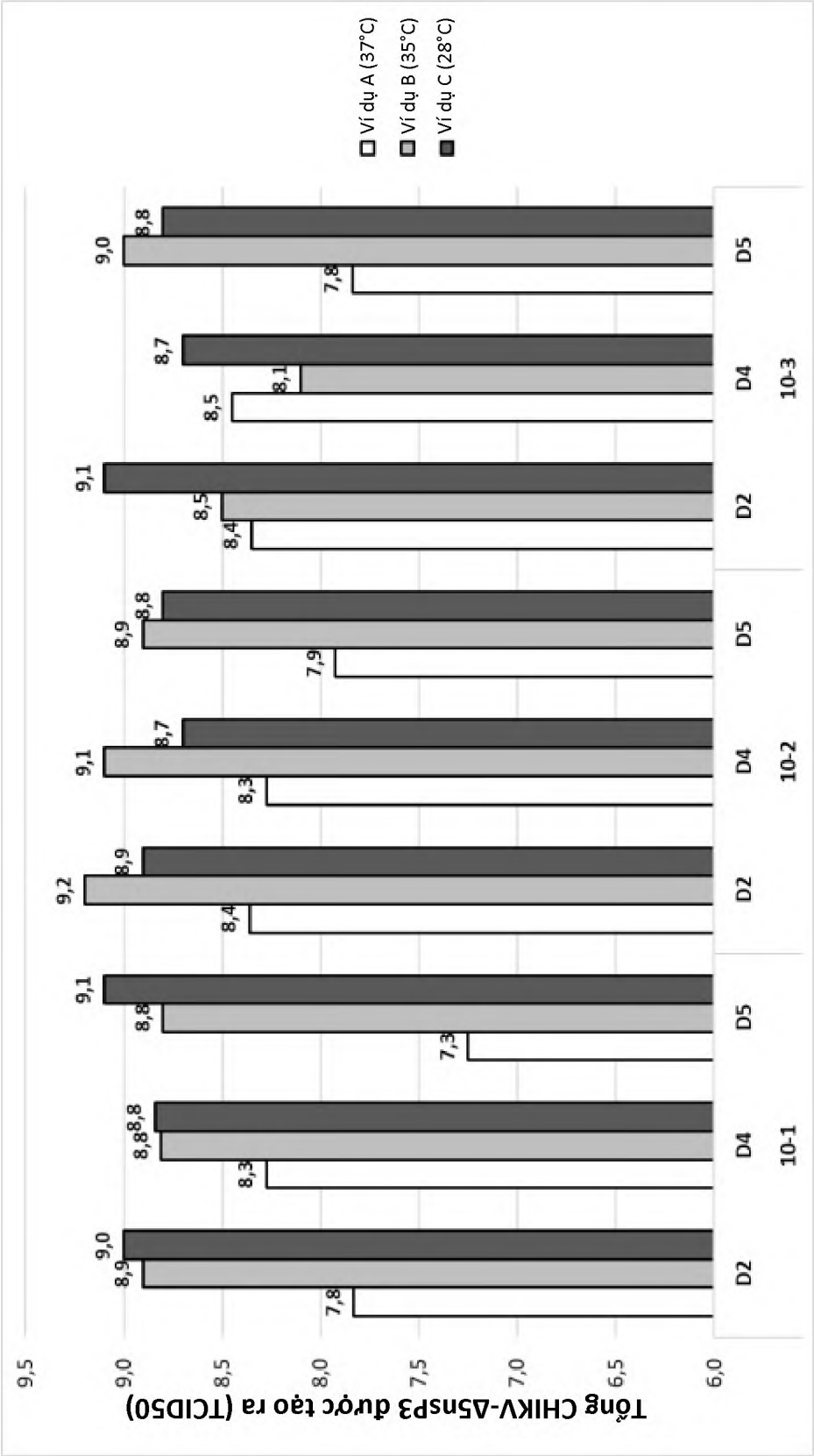
Fig. 13 (tiếp)

C.



19/23

Fig. 14



20/23

Fig. 15

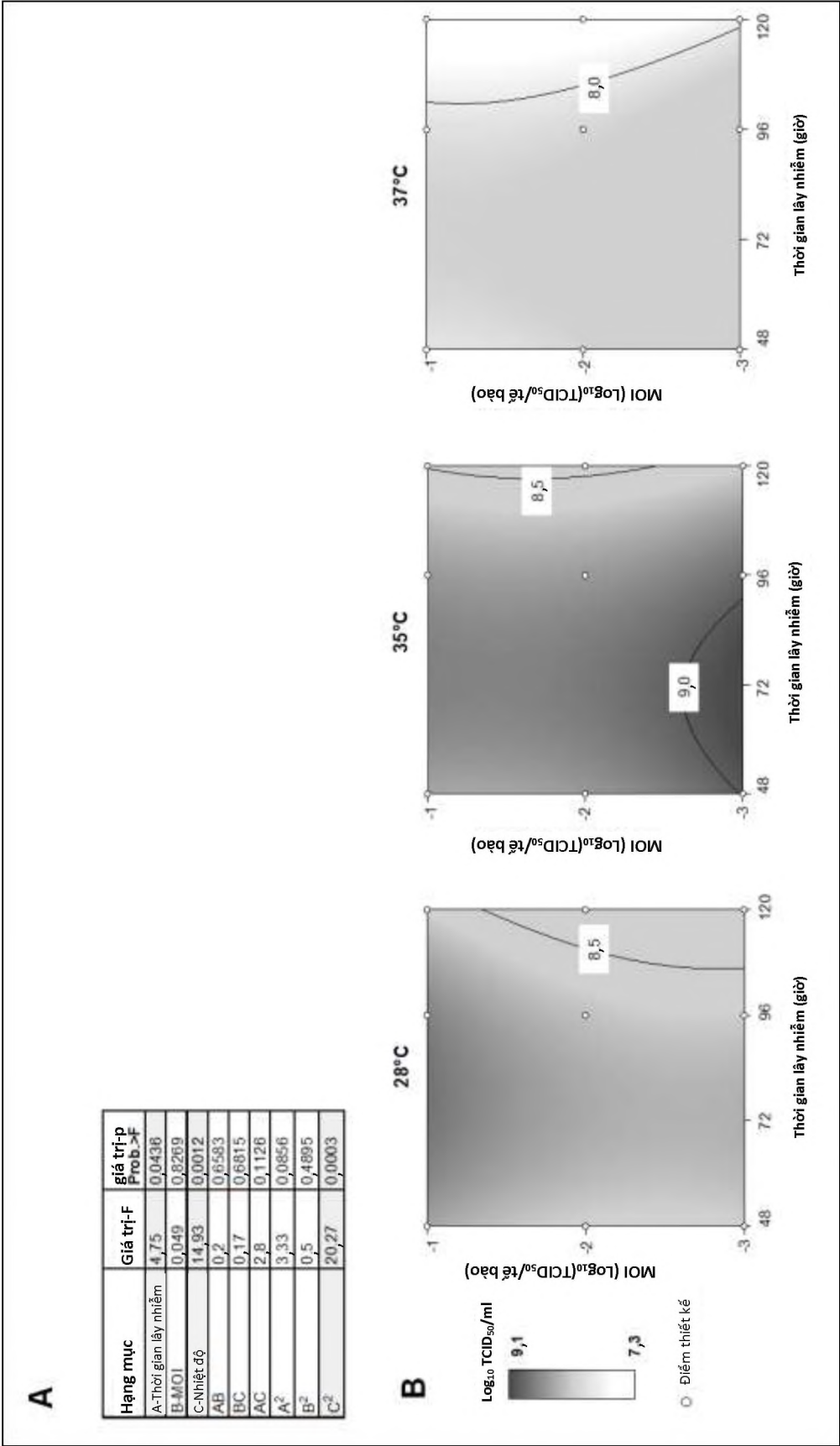


Fig. 16

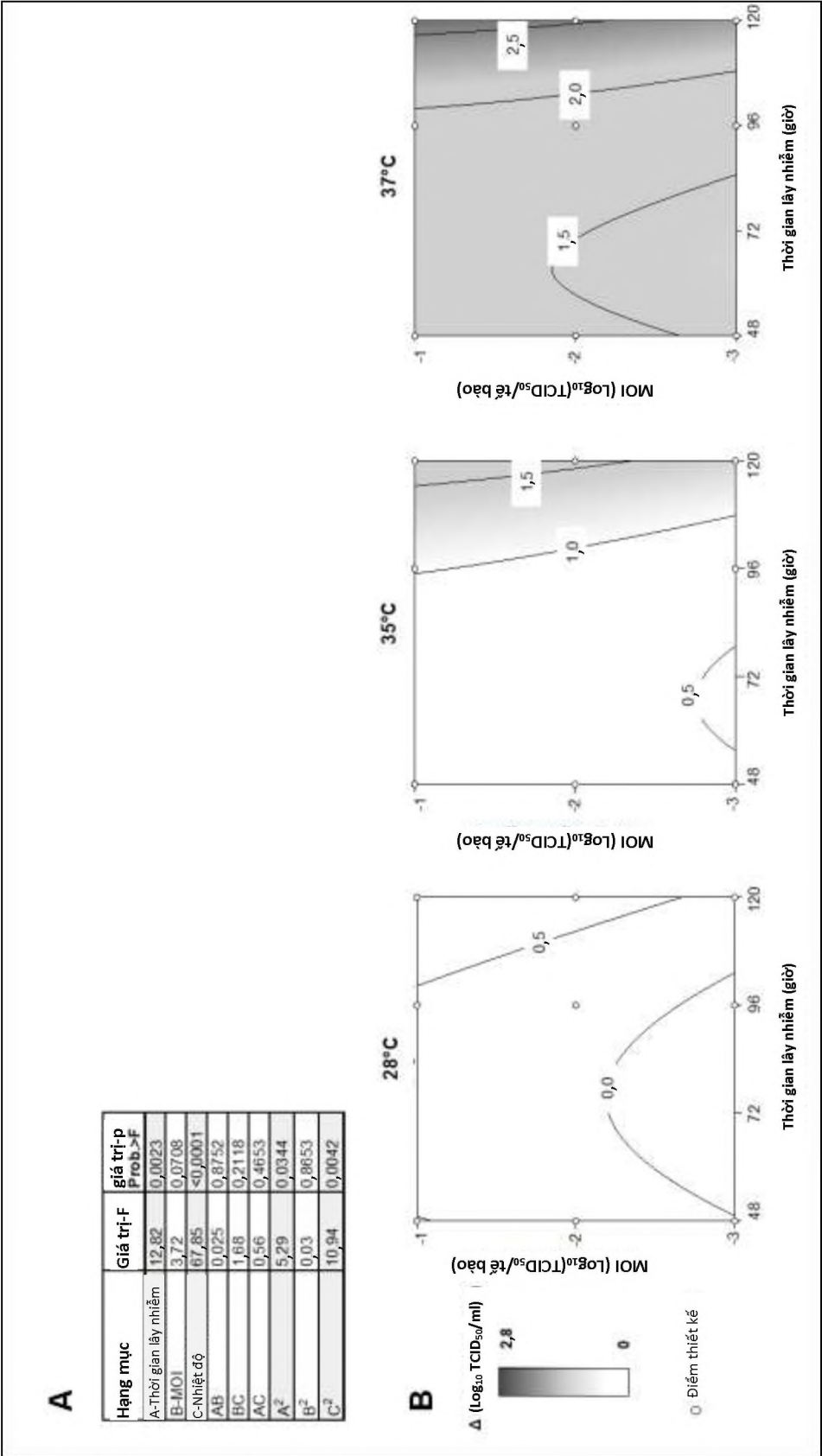
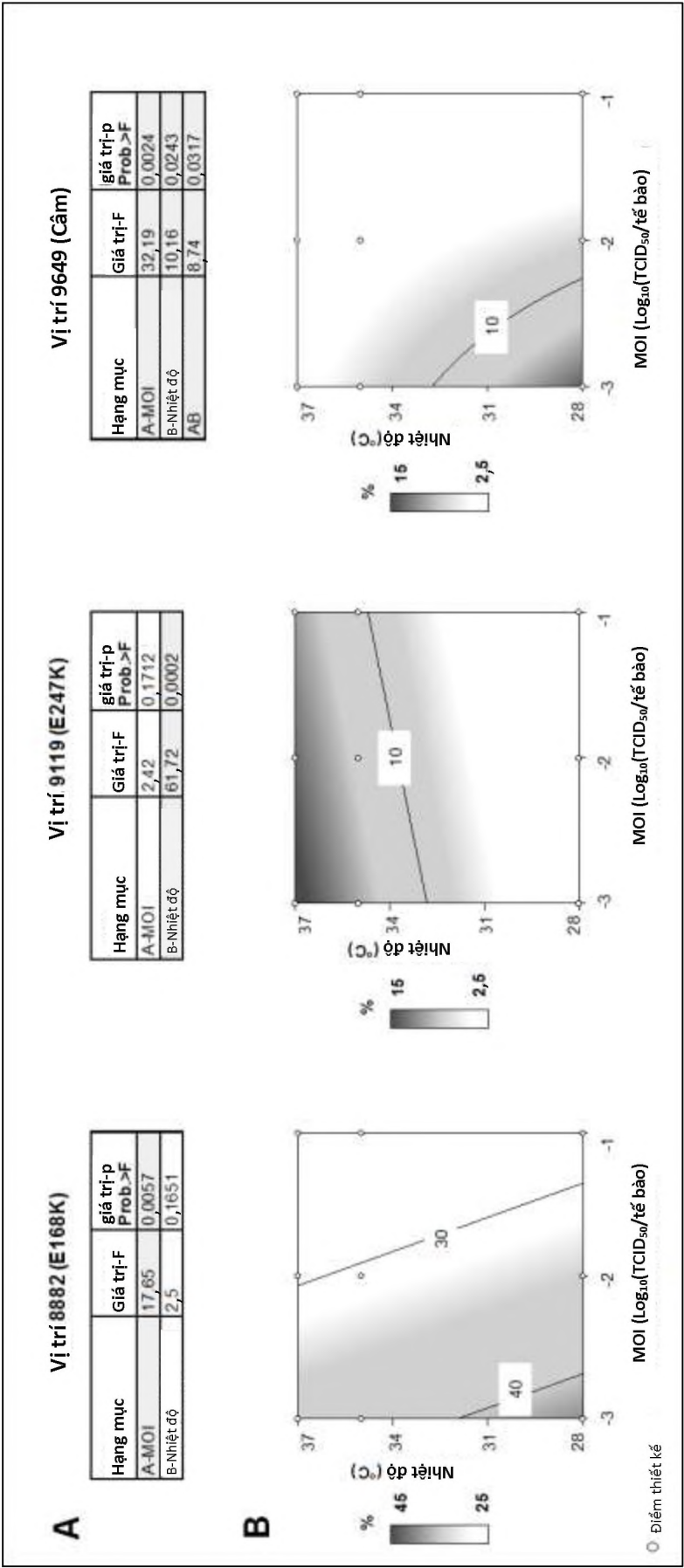
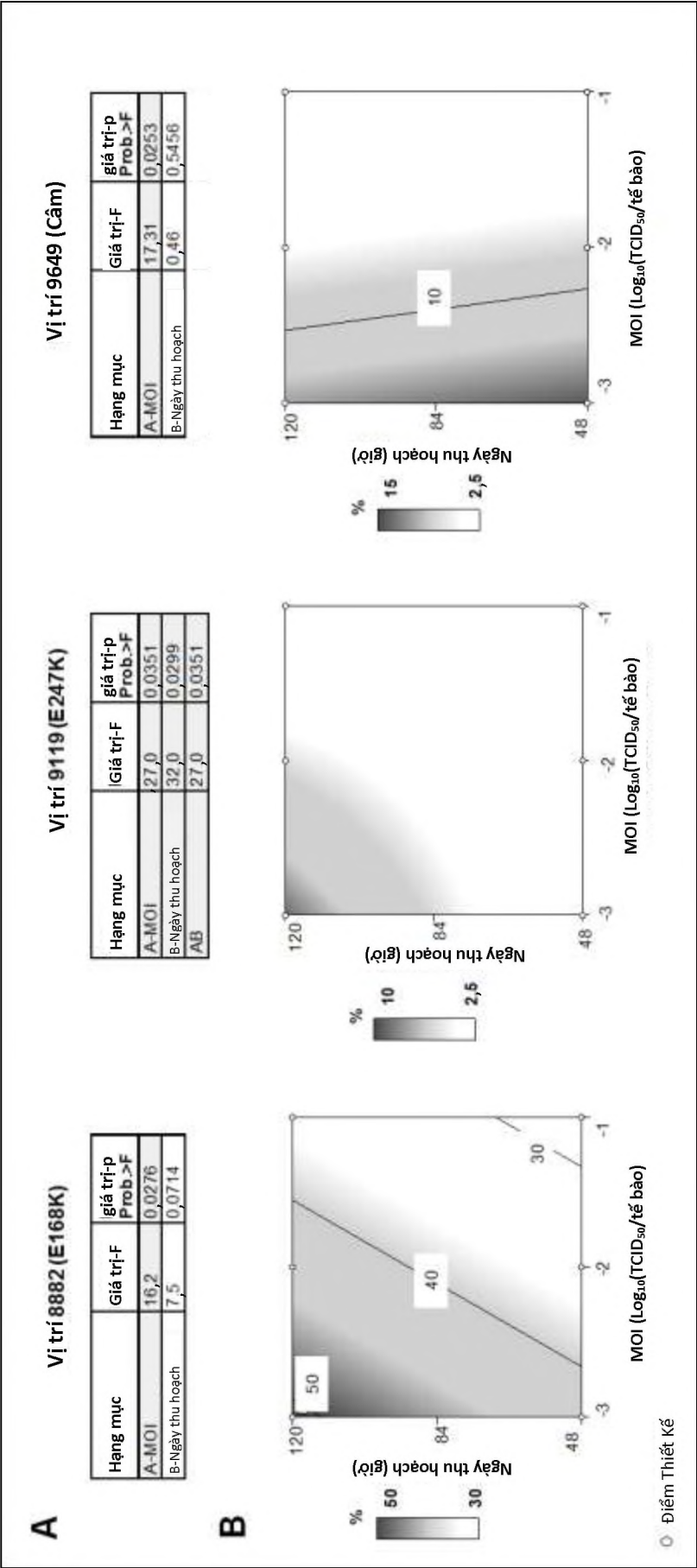


Fig. 17



23/23

Fig. 18



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Valneva SE

<120> Virut Chikungunya gây miễn dịch

<130> PAT028/PCT

<150> EP17192374.1

<151> 21-09-2017

<160> 49

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 11674

<212> ADN

<213> Virut Chikungunya

<400> 1

gatggctgcg tgagacacac gtagcctacc agtttcttac tgctctactc tgcaaagcaa	60
gagattaata acccatcatg gatcctgtgt acgtggacat agacgctgac agcgcctttt	120
tgaaggccct gcaacgtgcg taccatgtgt ttgaggtgga accaaggcag gtcacaccga	180
atgaccatgc taatgctaga gcgttctcgc atctagctat aaaactaata gagcaggaaa	240
ttgaccccgga ctcaaccatc ctggatatcg gcagtgcgcc agcaaggagg atgatgtcgg	300
acaggaagta ccactgcgtc tgcccgatgc gcagtgcgga agatcccagag agactcgcca	360
attatgctgag aaagctagca tctgccgcag gaaaagtcct ggacagaaac atctctggaa	420
agatcgggga cttacaagca gtaatggccg tgccagacac ggagacgcca acattctgct	480
tacacacaga cgtctcatgt agacagagag cagacgtcgc tatataccaa gacgtctatg	540
ctgtacacgc acccacgtcg ctataccacc aggcgattaa aggggtccga gtggcgctact	600
gggttgggtt cgacacaacc ccgttcatgt acaatgccat ggcggtgcc taccctcat	660
actcgacaaa ctgggcagat gagcaggtagc tgaaggctaa gaacatagga ttatgttcaa	720
cagacctgac ggaaggtaga cgaggcaagt tgtctattat gagagggaaa aagctaaaac	780
cgtgcgaccg tgtgctgttc tcagtagggc caacgctcta cccggaaagc cgcaagctac	840
ttaagagctg gcacctgcca tcggtgttcc atttaaaggg caaactcagc ttcacatgcc	900
gctgtgatac agtggtttcg tgtgagggt acgtcgtaa gagaataacg atgagcccag	960
gcctttatgg aaaaaccaca gggtagtcgg taaccaccca cgcagacgga ttcctgatgt	1020

gcaagactac cgacacgggt gacggcgaaa gaatgtcatt ctcggtgtgc acatacgtgc	1080
cggcgaccat ttgtgatcaa atgaccggca tccttgctac agaagtcacg ccggaggatg	1140
cacagaagct gttggtgggg ctgaaccaga gaatagtggg taacggcaga acgcaacgga	1200
atacgaacac catgaaaaat tatctgcttc ccgtggctgc ccaagccttc agtaagtggg	1260
caaaggagtg ccggaaagac atggaagatg aaaaactcct gggggtcaga gaaagaacac	1320
tgacctgtct ctgtctatgg gcattcaaga agcagaaaaac acacacggtc tacaagaggc	1380
ctgataccca gtcaattcag aaggttcagg ccgagtttga cagctttgtg gtaccgagtc	1440
tgtggctcgtc cgggttgtca atccctttga ggactagaat caaatggttg ttaagcaagg	1500
tgccaaaaac cgacctgatc ccatacagcg gagacgcccg agaagcccgg gacgcagaaa	1560
aagaagcaga ggaagaacga gaagcagaac tgactcgcga agccctacca cctctacagg	1620
cagcacagga agatgttcag gtcgaaatcg acgtggaaca gcttgaggac agagcgggcg	1680
caggaataat agagactccg agaggagcta tcaaagttac tgcccaacca acagaccacg	1740
tcgtgggaga gtacctggtg ctctccccgc agaccgtact acgtagccag aagctcagtc	1800
tgattcacgc tttggcggag caagtgaaga cgtgcacgca caacggacga gcagggaggt	1860
atgcggctga agcgtacgac ggccgagtc tagtgccctc aggctatgca atctcgctg	1920
aagacttcca gagtctaagc gaaagcgcaa cgatggtgta taacgaaaga gagttcgtaa	1980
acagaaagct acaccatatt gcgatgcacg gaccagccct gaacaccgac gaagagtcgt	2040
atgagctggg gagggcagag aggacagaac acgagtacgt ctacgacgtg gatcagagaa	2100
gatgctgtaa gaaggaagaa gccgcaggac tgggtactggg gggcgacttg actaatccgc	2160
cctaccacga attcgcatat gaagggctaa aaatccgccc tgctgcca taaaaattg	2220
cagtcatagg agtcttcgga gtaccgggat ctggcaagtc agctattatc aagaacctag	2280
ttaccaggca ggacctggtg actagcggaa agaaagaaaa ctgccaagaa atcaccaccg	2340
acgtgatgag acagagaggt ctagagatat ctgcacgtac ggttgactcg ctgctcttga	2400
atggatgcaa cagaccagtc gacgtgttgt acgtagacga ggcgtttgcg tgccactctg	2460
gaacgctact tgctttgatc gccttgggtga gaccaaggca gaaagttgta ctttgtgggtg	2520
acccgaagca gtgcggcttc ttcaatatga tgcagatgaa agtcaactat aatcacaaca	2580
tctgcaccca agtgtaccac aaaagtatct ccaggcgggtg tacactgcct gtgaccgcca	2640

ttgtgtcatc gttgcattac gaaggcaaaa tgcgcactac gaatgagtag aacaagccga	2700
ttgtagtggga cactacaggc tcaacaaaaac ctgaccctgg agacctcgtg ttaacgtgct	2760
tcagagggtg ggttaaaciaa ctgcaaattg actatcgtgg atacgaggtc atgacagcag	2820
ccgcatccca aggggttaacc agaaaaggag ttacgcagt tagacaaaaa gttaatgaaa	2880
acccgctcta tgcattcaacg tcagagcacg tcaacgtact cctaacgcgt acggaaggta	2940
aactggatatg gaagacactt tccggcgacc cgtggataaa gacgctgcag aaccaccga	3000
aaggaaactt caaagcaact attaggagt gggagggtgga gcatgcatca ataattggcg	3060
gcatctgcag tcaccaaattg accttcgata cattccaaaa taaagccaac gtttgttggg	3120
ctaagagctt ggtccctatc ctgaaacag cggggataaa actaaatgat aggcagtgg	3180
ctcagataat tcaagccttc aaagaagaca aagcactatc acctgaagta gccctgaatg	3240
aaatatgtac gcgcatgtat ggggtggatc tagacagcgg gctattttct aaaccgttgg	3300
tgtctgtgta ttacgcgat aaccactggg ataattaggcc tggagggaaa atgttcggat	3360
ttaacccga ggcagcatcc attctagaaa gaaagtatcc attcacaaaa gggaagtgga	3420
acatcaaciaa gcagatctgc gtgactacca ggaggataga agactttaac cctaccacca	3480
acatcatacc ggccaacagg agactaccac actcattagt ggccgaacac cgcccagtaa	3540
aaggggaaag aatggaatgg ctggttaaca agataaacgg ccaccacgtg ctcttggtca	3600
gtggctataa ccttgactg cctactaaga gagtcacttg ggtagcgccg ttaggtgtcc	3660
gcggagcgga ctacacatac aacctagagt tgggtctgcc agcaacgctt ggtaggtatg	3720
acctagtggg cataaacatc cacacacctt ttgcataca ccattacca cagtgcgtcg	3780
accacgcaat gaaactgcaa atgctcgggg gtgactcatt gagactgctc aaaccgggcg	3840
gctctctatt gatcagagca tatggttacg cagatagaac cagtgaacga gtcattctcg	3900
tattgggacg caagtttaga tcgtctagag cgttgaaacc accatgtgtc accagcaaca	3960
ctgagatgtt tttcctattc agcaactttg acaatggcag aaggaatttc acaactcatg	4020
tcattgaacia tcaactgaat gcagccttcg taggacaggc caccgagca ggatgtgcac	4080
cgtcgtaccg ggtaaaacgc atggacatcg cgaagaacga tgaagagtgc gtagtcaacg	4140
ccgctaacc tcgcgggtta ccgggtggcg gtgtttgcaa ggcagtatac aaaaaatggc	4200
cggagtcctt taagaacagt gcaacaccag tgggaaccgc aaaaacagtt atgtgcggta	4260

cgtatccagt aatccacgct gttggaccaa acttctctaa ttattcggag tctgaagggg	4320
accgggaatt ggcagctgcc tatcgagaag tcgcaaagga agtaactagg ctgggagtaa	4380
atagtgtagc tatacctctc ctctccacag gtgtatactc aggagggaaa gacaggctga	4440
cccagtcact gaaccacctc tttacagcca tggactcgac ggatgcagac gtggtcatct	4500
actgccgcga caaagaatgg gagaagaaaa tatctgaggc catacagatg cggacccaag	4560
tagagctgct ggatgagcac atctccatag actgcgatat tgttcgcgtg caccctgaca	4620
gcagcttggc aggcagaaaa ggatacagca ccacggaagg cgactgtac tcatatctag	4680
aagggaacccg ttttcatcag acggctgtgg atatggcgga gatacatact atgtggccaa	4740
agcaaacaga ggccaatgag caagtctgcc tatatgccct gggggaaagt attgaatcga	4800
tcaggcagaa atgcccgggtg gatgatgcag acgcatcatc tcccccaaa actgtcccgt	4860
gcctttgccg ttacgctatg actccagaac gcgtcacccg gcttcgcatg aaccacgtca	4920
caagcataat tgttgtttct tcgtttcccc tcccaaagta caaaatagaa ggagtgcaaa	4980
aagtcaaatg ctctaaggta atgctatttg accacaacgt gccatcgcgc gtaagtccaa	5040
gggcttatag aggtgccgct gccggtaacc ttgcggccgt gtctgattgg gtaatgagca	5100
ccgtacctgt cgcgccgccc agaagaaggc gagggagaaa cctgactgtg acatgtgacg	5160
agagagaagg gaatataaca cccatggcta gcgtccgatt ctttagggca gagctgtgtc	5220
cggtcgtaca agaaacagcg gagacgcgtg acacagcaat gtctcttcag gcaccaccga	5280
gtaccgccac ggaaccgaat catccgccga tctccttcgg agcatcaagc gagacgttcc	5340
ccattacatt tggggacttc aacgaaggag aaatcgaaag cttgtcttct gagctactaa	5400
ctttcggaga cttcttacca ggagaagtgg atgacttgac agacagcgac tgggtccacgt	5460
gctcagacac ggacgacgag ttaagactag acagggcagg tgggtatata ttctcgtcgg	5520
acaccggtcc aggtcattta caacagaagt cagtaccca gtcagtgtg cgggtgaaca	5580
ccctggagga agtccacgag gagaagtgtt acccacctaa gctggatgaa gcaaaggagc	5640
aactattact taagaaactc caggagagtg catccatggc caacagaagc aggtatcagt	5700
cgcgcaaagt agaaaacatg aaagcagcaa tcatccagag actaaagaga ggctgtagac	5760
tataacttaat gtcagagacc caaaagtcc ctacttaccg gactacatat ccggcgcctg	5820
tgtactcgcc tccgatcaac gtccgattgt ccaatcccga gtccgcagtg gcagcatgca	5880

atgagttcctt agctagaaac tatccaactg tctcatcata ccaaattacc gacgagtatg	5940
atgcatatct agacatgggtg gacgggtcgg agagttgcct ggaccgagcg acattcaatc	6000
cgtcaaaaact caggagctac ccgaaacagc acgcttacca cgcgccctcc atcagaagcg	6060
ctgtaccgtc cccattccag aacacactac agaatgtact ggagcagcc acgaaaagaa	6120
actgcaacgt cacacagatg aggggaattac ccactttgga ctgagcagta ttcaacgtgg	6180
agtgtttcaa aaaattcgca tgcaaccaag aatactggga agaatttgct gccagcccta	6240
ttaggataac aactgagaat ttagcaacct atgttactaa actaaaaggg ccaaaagcag	6300
cagcgctatt cgcaaaaacc cataatctac tgccactaca ggaagtacca atggataggt	6360
tcacagtaga tatgaaaagg gacgtaaaagg tgactcctgg taaaagcat acagaggaaa	6420
gacctaaggt gcagggtata caggcggctg aacccttggc gacagcatac ctatgtggga	6480
ttcacagaga gctggttagg aggctgaacg ccgtcctcct acccaatgta catacactat	6540
ttgacatgtc tgccgaggat ttgatgcca tcatagccgc acactttaag ccaggagaca	6600
ctgttttggg aacggacata gcctcctttg ataagagcca agatgattca cttgcgctta	6660
ctgctttgat gctgttagag gatttagggg tggatcactc cctgctggac ttgatagagg	6720
ctgctttcgg agagatttcc agctgtcacc taccgacagg tacgcgcttc aagttcggcg	6780
ccatgatgaa atcaggtatg ttcctaactc tgttcgtcaa cacattgtta aacatcacca	6840
tcgccagccg agtgctggaa gatcgtctga caaatccgc gtgcgcggcc ttcacggcg	6900
acgacaacat aatacatgga gtcgtctccg atgaattgat ggcagccaga tgtgccactt	6960
ggatgaacat ggaagtgaag atcatagatg cagttgtatc cttgaaagcc cttactttt	7020
gtggagggtt tatactgcac gatactgtga caggaacagc ttgcagagtg gcagaccgc	7080
taaaaaggct ttttaaactg ggcaaaccgc tagcggcagg tgacgaacaa gatgaagata	7140
gaagacgagc gctggctgac gaagtgatca gatggcaacg aacagggcta attgatgagc	7200
tgagaaaagc ggtatactct aggtacgaag tgcagggtat atcagttgtg gtaatgtcca	7260
tggccacctt tgcaagctcc agatccaact tcgagaagct cagaggaccc gtcataactt	7320
tgtacggcgg tcctaaatag gtacgacta cagctaccta ttttgcagaa gccgacagca	7380
agtatctaaa cactaatcag ctacaatgga gttcatcca acccaaactt tttaaatag	7440
gaggtaccag cctcgaccct ggactccgcg ccctactatc caagtcatca ggcccagacc	7500

gcgccctcag aggcaagctg ggcaacttgc ccagctgatc tcagcagtta ataaactgac 7560
 aatgcgcgcg gtaccacaac agaagccacg caggaatcgg aagaataaga agcaaaagca 7620
 aaaacaacag gcgccacaaa acaacacaaa tcaaaagaag cagccaccta aaaagaaacc 7680
 ggctcaaaag aaaaagaagc cgggccgcag agagaggatg tgcataaaaa tcgaaaatga 7740
 ttgtattttc gaagtcaagc acgaaggtaa ggtaacaggt tacgcgtgcc tgggtggggga 7800
 caaagtaatg aaaccagcac acgtaaaggg gaccatcgat aacgcggacc tggccaaact 7860
 ggcttttaag cggtcattcta agtatgacct tgaatgcgcg tagatacccg tgcacatgaa 7920
 gtccgacgct tcgaagttca cccatgagaa accggagggg tactacaact ggcaccacgg 7980
 agcagtacag tactcaggag gccggttcac catccctaca ggtgctggca aaccagggga 8040
 cagcggcaga ccgatcttcg acaacaaggg acgcgtgggt gccatagtct taggaggagc 8100
 taatgaagga gcccgtacag ccctctcggg ggtgacctgg aataaagaca ttgtcactaa 8160
 aatcaccccc gagggggccg aagagtggag tcttgccatc ccagttatgt gcctgttggc 8220
 aaacaccacg ttccccctgct cccagcccc ttgcacgccc tgctgctacg aaaaggaacc 8280
 ggaggaaacc ctacgcatgc ttgaggacaa cgtcatgaga cctgggtact atcagctgct 8340
 acaagcatcc ttaacatgtt ctccccaccg ccagcgacgc agcaccaagg acaacttcaa 8400
 tgtctataaa gccacaagac catacttagc tcaactgtccc gactgtggag aagggcactc 8460
 gtgccatagt cccgtagcac tagaacgcat cagaaatgaa gcgacagacg ggacgctgaa 8520
 aatccaggtc tccttgcaaa tcggaataaa gacggatgac agccacgatt ggaccaagct 8580
 gcgttatatg gacaaccaca tgccagcaga cgcagagagg gcggggctat ttgtaagaac 8640
 atcagcaccg tgtacgatta ctggaacaat gggacacttc atcctggccc gatgtccaaa 8700
 aggggaaact ctgacggtgg gattcactga cagtaggaag attagtcact catgtacgca 8760
 cccatttcac cacgaccctc ctgtgatagg tcgggaaaaa ttccattccc gaccgcagca 8820
 cggtaaagag ctaccttgca gcacgtacgt gcagagcacc gccgcaacta ccgaggagat 8880
 agaggtacac atgccccag acaccctga tcgcacatta atgtcacaac agtccggcaa 8940
 cgtaaagatc acagtcaatg gccagacggt gcggtacaag tgtaattgcg gtggctcaaa 9000
 tgaaggacta acaactacag acaaagtgat taataactgc aaggttgatc aatgtcatgc 9060
 cgcggtcacc aatcacaaaa agtggcagta taactcccct ctggtcccg gtaatgctga 9120

acttggggac cgaaaaggaa aaattcacat cccgtttccg ctggcaaag taacatgcag	9180
ggtgcctaaa gcaaggaacc ccaccgtgac gtacgggaaa aaccaagtca tcatgctact	9240
gtatcctgac cacccaacac tcctgtccta ccggaatatg ggagaagaac caaactatca	9300
agaagagtgg gtgatgcata agaaggaagt cgtgctaacc gtgccgactg aagggtcga	9360
ggtcacgtgg ggcaacaacg agccgtataa gtattggccg cagttatcta caaacggtac	9420
agcccatggc caccgcatg agataattct gtattattat gagctgtacc ccactatgac	9480
tgtagtagtt gtgtcagtgg ccacgttcat actcctgtcg atggtgggta tggcagcggg	9540
gatgtgcatg tgtgcacgac gcagatgcat cacaccgtat gaactgacac caggagctac	9600
cgtccctttc ctgcttagcc taatatgctg catcagaaca gctaaagcgg ccacatacca	9660
agaggctgcg atatacctgt ggaacgagca gcaacctttg ttttggctac aagcccttat	9720
tccgctggca gccctgattg ttctatgcaa ctgtctgaga ctcttaccat gctgctgtaa	9780
aacgttggct tttttagccg taatgagcgt cgggtgccac actgtgagcg cgtacgaaca	9840
cgtaacagtg atcccgaaca cgggtgggagt accgtataag actctagtca atagacctgg	9900
ctacagcccc atggtattgg agatggaact actgtcagtc actttggagc caacactatc	9960
gcttgattac atcacgtgcg agtacaaaac cgtcatcccg tctccgtacg tgaagtgtg	10020
cggtagca gagtgcaagg aaaaaacct acctgactac agctgtaagg tcttcaccgg	10080
cgtctaccca tttatgtggg gcggcgccta ctgcttctgc gacgctgaaa acacgcagtt	10140
gagcgaagca cacgtggaga agtccgaatc atgcaaaaca gaatttgcac cagcatacag	10200
ggctcatacc gcatctgcat cagctaagct ccgctcctt taccaaggaa ataacatcac	10260
tgtaactgcc tatgcaaacg gcgacatgc cgtcacagtt aaggaccca aattcattgt	10320
ggggccaatg tcttcagcct ggacaccttt cgacaacaaa attgtgggtg acaaagggtga	10380
cgtctataac atggactacc cgccctttgg cgcaggaaga ccaggacaat ttggcgatat	10440
ccaaagtcgc acacctgaga gtaaagacgt ctatgctaata acacaactgg tactgcagag	10500
accggctgtg ggtacggtac acgtgccata ctctcaggca ccatctggct ttaagtattg	10560
gctaaaagaa cgcggggctg cgctgcagca cacagcacca tttggctgcc aaatagcaac	10620
aaacccggta agagcgggtga actgcgccgt aggggaacatg cccatctcca tcgacatacc	10680
ggaagcggcc ttcactaggg tcgtcgacgc gccctcttta acggacatgt cgtgcgaggt	10740

```

accagcctgc acccattcct cagactttgg gggcgtcgcc attattaaat atgcagccag 10800
caagaaaggc aagtgtgcgg tgcattcgat gactaacgcc gtcactattc gggaagctga 10860
gatagaagtt gaagggaatt ctcagctgca aatctctttc tcgacggcct tagccagcgc 10920
cgaattccgc gtacaagtct gttctacaca agtacactgt gcagccgagt gccaccccc 10980
gaaggaccac atagtcaact acccggcgct acataccacc ctcgggggtcc aggacatctc 11040
cgctacggcg atgtcatggg tgcagaagat cacggggaggt gtgggactgg ttgttgctgt 11100
tgccgcactg attctaactg tgggtgctatg cgtgtcgttc agcaggcact aacttgacaa 11160
ttaagtatga aggtatatgt gtcccctaag agacacactg tacatagcaa ataatctata 11220
gatcaaaggg ctacgcaacc cctgaatagt aacaaaatac aaaatcacta aaaattataa 11280
aaacagaaaa atacataaat aggtatacgt gtcccctaag agacacattg tatgtaggtg 11340
ataagtatag atcaaagggc cgaataaccc ctgaatagta acaaaatatg aaaatcaata 11400
aaaatcataa aatagaaaaa ccataaacag aagtagttca aagggtata aaaccctga 11460
atagtaacaa aacataaaat taataaaaat caaatgaata ccataattgg caaacggaag 11520
agatgtaggt acttaagctt cctaaaagca gccgaactca ctttgagaag taggcatagc 11580
ataccgaact cttccacgat tctccgaacc cacagggacg taggagatgt tattttgttt 11640
ttaatatttc aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 11674

```

```

<210> 2
<211> 423
<212> PRT
<213> Virut Chikungunya

```

```

<400> 2

```

```

Ser Thr Lys Asp Asn Phe Asn Val Tyr Lys Ala Thr Arg Pro Tyr Leu
1           5           10           15

```

```

Ala His Cys Pro Asp Cys Gly Glu Gly His Ser Cys His Ser Pro Val
          20           25           30

```

```

Ala Leu Glu Arg Ile Arg Asn Glu Ala Thr Asp Gly Thr Leu Lys Ile
          35           40           45

```

```

Gln Val Ser Leu Gln Ile Gly Ile Lys Thr Asp Asp Ser His Asp Trp
          50           55           60

```

Thr Lys Leu Arg Tyr Met Asp Asn His Met Pro Ala Asp Ala Glu Arg
65 70 75 80

Ala Gly Leu Phe Val Arg Thr Ser Ala Pro Cys Thr Ile Thr Gly Thr
85 90 95

Met Gly His Phe Ile Leu Ala Arg Cys Pro Lys Gly Glu Thr Leu Thr
100 105 110

Val Gly Phe Thr Asp Ser Arg Lys Ile Ser His Ser Cys Thr His Pro
115 120 125

Phe His His Asp Pro Pro Val Ile Gly Arg Glu Lys Phe His Ser Arg
130 135 140

Pro Gln His Gly Lys Glu Leu Pro Cys Ser Thr Tyr Val Gln Ser Thr
145 150 155 160

Ala Ala Thr Thr Glu Glu Ile Glu Val His Met Pro Pro Asp Thr Pro
165 170 175

Asp His Thr Leu Met Ser Gln Gln Ser Gly Asn Val Lys Ile Thr Val
180 185 190

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

Gly Leu Thr Thr Thr Asp Lys Val Ile Asn Asn Cys Lys Val Asp Gln
210 215 220

Cys His Ala Ala Val Thr Asn His Lys Lys Trp Gln Tyr Asn Ser Pro
225 230 235 240

Leu Val Pro Arg Asn Ala Glu Leu Gly Asp Arg Lys Gly Lys Ile His
245 250 255

Ile Pro Phe Pro Leu Ala Asn Val Thr Cys Arg Val Pro Lys Ala Arg
260 265 270

Asn Pro Thr Val Thr Tyr Gly Lys Asn Gln Val Ile Met Leu Leu Tyr
 275 280 285

Pro Asp His Pro Thr Leu Leu Ser Tyr Arg Asn Met Gly Glu Glu Pro
 290 295 300

Asn Tyr Gln Glu Glu Trp Val Met His Lys Lys Glu Val Val Leu Thr
 305 310 315 320

Val Pro Thr Glu Gly Leu Glu Val Thr Trp Gly Asn Asn Glu Pro Tyr
 325 330 335

Lys Tyr Trp Pro Gln Leu Ser Thr Asn Gly Thr Ala His Gly His Pro
 340 345 350

His Glu Ile Ile Leu Tyr Tyr Tyr Glu Leu Tyr Pro Thr Met Thr Val
 355 360 365

Val Val Val Ser Val Ala Thr Phe Ile Leu Leu Ser Met Val Gly Met
 370 375 380

Ala Ala Gly Met Cys Met Cys Ala Arg Arg Arg Cys Ile Thr Pro Tyr
 385 390 395 400

Glu Leu Thr Pro Gly Ala Thr Val Pro Phe Leu Leu Ser Leu Ile Cys
 405 410 415

Cys Ile Arg Thr Ala Lys Ala
 420

<210> 3
 <211> 423
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đột biến phát sinh từ việc cấy chuyển Vero

<400> 3

Ser Thr Lys Asp Asn Phe Asn Val Tyr Lys Ala Thr Arg Pro Tyr Leu
 1 5 10 15

Ala His Cys Pro Asp Cys Gly Glu Gly His Ser Cys His Ser Pro Val
 20 25 30

Ala Leu Glu Arg Ile Arg Asn Glu Ala Thr Asp Gly Thr Leu Lys Ile
 35 40 45

Gln Val Ser Leu Gln Ile Gly Ile Lys Thr Asp Asp Ser His Asp Trp
 50 55 60

Thr Lys Leu Arg Tyr Met Asp Asn His Met Pro Ala Asp Ala Glu Arg
 65 70 75 80

Ala Gly Leu Phe Val Arg Thr Ser Ala Pro Cys Thr Ile Thr Gly Thr
 85 90 95

Met Gly His Phe Ile Leu Ala Arg Cys Pro Lys Gly Glu Thr Leu Thr
 100 105 110

Val Gly Phe Thr Asp Ser Arg Lys Ile Ser His Ser Cys Thr His Pro
 115 120 125

Phe His His Asp Pro Pro Val Ile Gly Arg Glu Lys Phe His Ser Arg
 130 135 140

Pro Gln His Gly Lys Glu Leu Pro Cys Ser Thr Tyr Val Gln Ser Thr
 145 150 155 160

Ala Ala Thr Thr Glu Glu Ile Lys Val His Met Pro Pro Asp Thr Pro
 165 170 175

Asp His Thr Leu Met Ser Gln Gln Ser Gly Asn Val Lys Ile Thr Val
 180 185 190

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

Gly Leu Thr Thr Thr Asp Lys Val Ile Asn Asn Cys Lys Val Asp Gln
 210 215 220

Cys His Ala Ala Val Thr Asn His Lys Lys Trp Gln Tyr Asn Ser Pro
 225 230 235 240

Leu Val Pro Arg Asn Ala Glu Leu Gly Asp Arg Lys Gly Lys Ile His
 245 250 255

Ile Pro Phe Pro Leu Ala Asn Val Thr Cys Arg Val Pro Lys Ala Arg
 260 265 270

Asn Pro Thr Val Thr Tyr Gly Lys Asn Gln Val Ile Met Leu Leu Tyr
 275 280 285

Pro Asp His Pro Thr Leu Leu Ser Tyr Arg Asn Met Gly Glu Glu Pro
 290 295 300

Asn Tyr Gln Glu Glu Trp Val Met His Lys Lys Glu Val Val Leu Thr
 305 310 315 320

Val Pro Thr Glu Gly Leu Glu Val Thr Trp Gly Asn Asn Glu Pro Tyr
 325 330 335

Lys Tyr Trp Pro Gln Leu Ser Thr Asn Gly Thr Ala His Gly His Pro
 340 345 350

His Glu Ile Ile Leu Tyr Tyr Tyr Glu Leu Tyr Pro Thr Met Thr Val
 355 360 365

Val Val Val Ser Val Ala Thr Phe Ile Leu Leu Ser Met Val Gly Met
 370 375 380

Ala Ala Gly Met Cys Met Cys Ala Arg Arg Arg Cys Ile Thr Pro Tyr
 385 390 395 400

Glu Leu Thr Pro Gly Ala Thr Val Pro Phe Leu Leu Ser Leu Ile Cys
 405 410 415

Cys Ile Arg Thr Ala Lys Ala
 420

<210> 4
 <211> 423
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đột biến phát sinh từ việc cấy chuyển Vero

<400> 4

Ser Thr Lys Asp Asn Phe Asn Val Tyr Lys Ala Thr Arg Pro Tyr Leu
 1 5 10 15

Ala His Cys Pro Asp Cys Gly Glu Gly His Ser Cys His Ser Pro Val
 20 25 30

Ala Leu Glu Arg Ile Arg Asn Glu Ala Thr Asp Gly Thr Leu Lys Ile
 35 40 45

Gln Val Ser Leu Gln Ile Arg Ile Lys Thr Asp Asp Ser His Asp Trp
 50 55 60

Thr Lys Leu Arg Tyr Met Asp Asn His Met Pro Ala Asp Ala Glu Arg
 65 70 75 80

Ala Gly Leu Phe Val Arg Thr Ser Ala Pro Cys Thr Ile Thr Gly Thr
 85 90 95

Met Gly His Phe Ile Leu Ala Arg Cys Pro Lys Gly Glu Thr Leu Thr
 100 105 110

Val Gly Phe Thr Asp Ser Arg Lys Ile Ser His Ser Cys Thr His Pro
 115 120 125

Phe His His Asp Pro Pro Val Ile Gly Arg Glu Lys Phe His Ser Arg
 130 135 140

Pro Gln His Gly Lys Glu Leu Pro Cys Ser Thr Tyr Val Gln Ser Thr
 145 150 155 160

Ala Ala Thr Thr Glu Glu Ile Glu Val His Met Pro Pro Asp Thr Pro
 165 170 175

Asp His Thr Leu Met Ser Gln Gln Ser Gly Asn Val Lys Ile Thr Val
 180 185 190

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

Gly Leu Thr Thr Thr Asp Lys Val Ile Asn Asn Cys Lys Val Asp Gln
 210 215 220

Cys His Ala Ala Val Thr Asn His Lys Lys Trp Gln Tyr Asn Ser Pro
 225 230 235 240

Leu Val Pro Arg Asn Ala Glu Leu Gly Asp Arg Lys Gly Lys Ile His
 245 250 255

Ile Pro Phe Pro Leu Ala Asn Val Thr Cys Arg Val Pro Lys Ala Arg
 260 265 270

Asn Pro Thr Val Thr Tyr Gly Lys Asn Gln Val Ile Met Leu Leu Tyr
 275 280 285

Pro Asp His Pro Thr Leu Leu Ser Tyr Arg Asn Met Gly Glu Glu Pro
 290 295 300

Asn Tyr Gln Glu Glu Trp Val Met His Lys Lys Glu Val Val Leu Thr
 305 310 315 320

Val Pro Thr Glu Gly Leu Glu Val Thr Trp Gly Asn Asn Glu Pro Tyr
 325 330 335

Lys Tyr Trp Pro Gln Leu Ser Thr Asn Gly Thr Ala His Gly His Pro
 340 345 350

His Glu Ile Ile Leu Tyr Tyr Tyr Glu Leu Tyr Pro Thr Met Thr Val
 355 360 365

Val Val Val Ser Val Ala Thr Phe Ile Leu Leu Ser Met Val Gly Met
 370 375 380

Ala Ala Gly Met Cys Met Cys Ala Arg Arg Arg Cys Ile Thr Pro Tyr
 385 390 395 400

Glu Leu Thr Pro Gly Ala Thr Val Pro Phe Leu Leu Ser Leu Ile Cys
 405 410 415

Cys Ile Arg Thr Ala Lys Ala
420

<210> 5
<211> 423
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đột biến phát sinh từ việc cấy chuyển Vero

<400> 5

Ser Thr Lys Asp Asn Phe Asn Val Tyr Lys Ala Thr Arg Pro Tyr Leu
1 5 10 15

Ala His Cys Pro Asp Cys Gly Glu Gly His Ser Cys His Ser Pro Val
20 25 30

Ala Leu Glu Arg Ile Arg Asn Glu Ala Thr Asp Gly Thr Leu Lys Ile
35 40 45

Gln Val Ser Leu Gln Ile Gly Ile Lys Thr Asp Asp Ser His Asp Trp
50 55 60

Thr Lys Leu Arg Tyr Met Asp Asn His Met Pro Ala Asp Ala Glu Arg
65 70 75 80

Ala Gly Leu Phe Val Arg Thr Ser Ala Pro Cys Thr Ile Thr Gly Thr
85 90 95

Met Gly His Phe Ile Leu Ala Arg Cys Pro Lys Gly Glu Thr Leu Thr
100 105 110

Val Gly Phe Thr Asp Ser Arg Lys Ile Ser His Ser Cys Thr His Pro
115 120 125

Phe His His Asp Pro Pro Val Ile Gly Arg Glu Lys Phe His Ser Arg
130 135 140

Pro Gln His Gly Lys Glu Leu Pro Cys Ser Thr Tyr Val Gln Ser Thr
145 150 155 160

Ala Ala Thr Thr Glu Glu Ile Glu Val His Met Pro Pro Asp Thr Pro
 165 170 175

Asp His Thr Leu Met Ser Gln Gln Ser Gly Asn Val Lys Ile Thr Val
 180 185 190

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

Gly Leu Thr Thr Thr Asp Lys Val Ile Asn Asn Cys Lys Val Asp Gln
 210 215 220

Cys His Ala Ala Val Thr Asn His Lys Lys Trp Gln Tyr Asn Ser Pro
 225 230 235 240

Leu Val Pro Arg Asn Ala Lys Leu Gly Asp Arg Lys Gly Lys Ile His
 245 250 255

Ile Pro Phe Pro Leu Ala Asn Val Thr Cys Arg Val Pro Lys Ala Arg
 260 265 270

Asn Pro Thr Val Thr Tyr Gly Lys Asn Gln Val Ile Met Leu Leu Tyr
 275 280 285

Pro Asp His Pro Thr Leu Leu Ser Tyr Arg Asn Met Gly Glu Glu Pro
 290 295 300

Asn Tyr Gln Glu Glu Trp Val Met His Lys Lys Glu Val Val Leu Thr
 305 310 315 320

Val Pro Thr Glu Gly Leu Glu Val Thr Trp Gly Asn Asn Glu Pro Tyr
 325 330 335

Lys Tyr Trp Pro Gln Leu Ser Thr Asn Gly Thr Ala His Gly His Pro
 340 345 350

His Glu Ile Ile Leu Tyr Tyr Tyr Glu Leu Tyr Pro Thr Met Thr Val
 355 360 365

Val Val Val Ser Val Ala Thr Phe Ile Leu Leu Ser Met Val Gly Met
370 375 380

Ala Ala Gly Met Cys Met Cys Ala Arg Arg Arg Cys Ile Thr Pro Tyr
385 390 395 400

Glu Leu Thr Pro Gly Ala Thr Val Pro Phe Leu Leu Ser Leu Ile Cys
405 410 415

Cys Ile Arg Thr Ala Lys Ala
420

<210> 6

<211> 423

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đột biến phát sinh từ việc cấy chuyển Vero

<400> 6

Ser Thr Lys Asp Asn Phe Asn Val Tyr Lys Ala Thr Arg Pro Tyr Leu
1 5 10 15

Ala His Cys Pro Asp Cys Gly Glu Gly His Ser Cys His Ser Pro Val
20 25 30

Ala Leu Glu Arg Ile Arg Asn Glu Ala Thr Asp Gly Thr Leu Lys Ile
35 40 45

Gln Val Ser Leu Gln Ile Gly Ile Lys Thr Asp Asp Ser His Asp Trp
50 55 60

Thr Lys Leu Arg Tyr Met Asp Asn His Met Pro Ala Asp Ala Glu Arg
65 70 75 80

Ala Arg Leu Phe Val Arg Thr Ser Ala Pro Cys Thr Ile Thr Gly Thr
85 90 95

Met Gly His Phe Ile Leu Ala Arg Cys Pro Lys Gly Glu Thr Leu Thr
100 105 110

Val Gly Phe Thr Asp Ser Arg Lys Ile Ser His Ser Cys Thr His Pro
 115 120 125

Phe His His Asp Pro Pro Val Ile Gly Arg Glu Lys Phe His Ser Arg
 130 135 140

Pro Gln His Gly Lys Glu Leu Pro Cys Ser Thr Tyr Val Gln Ser Thr
 145 150 155 160

Ala Ala Thr Thr Glu Glu Ile Glu Val His Met Pro Pro Asp Thr Pro
 165 170 175

Asp His Thr Leu Met Ser Gln Gln Ser Gly Asn Val Lys Ile Thr Val
 180 185 190

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

Gly Leu Thr Thr Thr Asp Lys Val Ile Asn Asn Cys Lys Val Asp Gln
 210 215 220

Cys His Ala Ala Val Thr Asn His Lys Lys Trp Gln Tyr Asn Ser Pro
 225 230 235 240

Leu Val Pro Arg Asn Ala Glu Leu Gly Asp Arg Lys Gly Lys Ile His
 245 250 255

Ile Pro Phe Pro Leu Ala Asn Val Thr Cys Arg Val Pro Lys Ala Arg
 260 265 270

Asn Pro Thr Val Thr Tyr Gly Lys Asn Gln Val Ile Met Leu Leu Tyr
 275 280 285

Pro Asp His Pro Thr Leu Leu Ser Tyr Arg Asn Met Gly Glu Glu Pro
 290 295 300

Asn Tyr Gln Glu Glu Trp Val Met His Lys Lys Glu Val Val Leu Thr
 305 310 315 320

Val Pro Thr Glu Gly Leu Glu Val Thr Trp Gly Asn Asn Glu Pro Tyr
 325 330 335

Lys Tyr Trp Pro Gln Leu Ser Thr Asn Gly Thr Ala His Gly His Pro
340 345 350

His Glu Ile Ile Leu Tyr Tyr Tyr Glu Leu Tyr Pro Thr Met Thr Val
355 360 365

Val Val Val Ser Val Ala Thr Phe Ile Leu Leu Ser Met Val Gly Met
370 375 380

Ala Ala Gly Met Cys Met Cys Ala Arg Arg Arg Cys Ile Thr Pro Tyr
385 390 395 400

Glu Leu Thr Pro Gly Ala Thr Val Pro Phe Leu Leu Ser Leu Ile Cys
405 410 415

Cys Ile Arg Thr Ala Lys Ala
420

<210> 7

<211> 423

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đột biến phát sinh từ việc cấy chuyển Vero

<400> 7

Ser Thr Lys Asp Asn Phe Asn Val Tyr Lys Ala Thr Arg Pro Tyr Leu
1 5 10 15

Ala His Cys Pro Asp Cys Gly Glu Gly His Ser Cys His Ser Pro Val
20 25 30

Ala Leu Glu Arg Ile Arg Asn Glu Ala Thr Asp Gly Thr Leu Lys Ile
35 40 45

Gln Val Ser Leu Gln Ile Gly Ile Lys Thr Asp Asp Ser His Asp Trp
50 55 60

Thr Lys Leu Arg Tyr Met Asp Asn His Met Pro Ala Asp Ala Glu Arg
65 70 75 80

Ala Gly Leu Phe Val Arg Thr Ser Ala Pro Cys Thr Ile Thr Gly Thr
85 90 95

Met Gly His Phe Ile Leu Ala Arg Cys Pro Lys Gly Glu Thr Leu Thr
100 105 110

Val Gly Phe Thr Asp Ser Arg Lys Ile Ser His Ser Cys Thr His Pro
115 120 125

Phe His His Asp Pro Pro Val Ile Gly Arg Glu Lys Phe His Ser Arg
130 135 140

Pro Gln His Gly Lys Glu Leu Pro Cys Ser Thr Tyr Val Gln Ser Thr
145 150 155 160

Ala Ala Thr Thr Glu Glu Ile Glu Val His Met Pro Pro Asp Thr Pro
165 170 175

Asp His Thr Leu Met Ser Gln Gln Ser Gly Asn Val Lys Ile Thr Val
180 185 190

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

Gly Leu Thr Thr Thr Asp Lys Val Ile Asn Asn Cys Lys Val Asp Gln
210 215 220

Cys His Ala Ala Val Thr Asn Tyr Lys Lys Trp Gln Tyr Asn Ser Pro
225 230 235 240

Leu Val Pro Arg Asn Ala Glu Leu Gly Asp Arg Lys Gly Lys Ile His
245 250 255

Ile Pro Phe Pro Leu Ala Asn Val Thr Cys Arg Val Pro Lys Ala Arg
260 265 270

Asn Pro Thr Val Thr Tyr Gly Lys Asn Gln Val Ile Met Leu Leu Tyr
275 280 285

Pro Asp His Pro Thr Leu Leu Ser Tyr Arg Asn Met Gly Glu Glu Pro
 290 295 300

Asn Tyr Gln Glu Glu Trp Val Met His Lys Lys Glu Val Val Leu Thr
 305 310 315 320

Val Pro Thr Glu Gly Leu Glu Val Thr Trp Gly Asn Asn Glu Pro Tyr
 325 330 335

Lys Tyr Trp Pro Gln Leu Ser Thr Asn Gly Thr Ala His Gly His Pro
 340 345 350

His Glu Ile Ile Leu Tyr Tyr Tyr Glu Leu Tyr Pro Thr Met Thr Val
 355 360 365

Val Val Val Ser Val Ala Thr Phe Ile Leu Leu Ser Met Val Gly Met
 370 375 380

Ala Ala Gly Met Cys Met Cys Ala Arg Arg Arg Cys Ile Thr Pro Tyr
 385 390 395 400

Glu Leu Thr Pro Gly Ala Thr Val Pro Phe Leu Leu Ser Leu Ile Cys
 405 410 415

Cys Ile Arg Thr Ala Lys Ala
 420

<210> 8
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mồi

<400> 8
 ttaggatccg atggctgcgt gagacac

27

<210> 9
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 9

taactcgagc cgtcaggtct gttgaacat

29

<210> 10

<211> 28

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 10

ttaggatcct accaccaggc gattaaag

28

<210> 11

<211> 29

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 11

taactcgagc ttgcccact tactgaagg

29

<210> 12

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 12

ttaggatcct gctacagaag tcacgcc

27

<210> 13

<211> 26

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 13

taactcgagg ccaaagcgtg aatcag

26

<210> 14
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi

<400> 14
 ttaggatcca acagcttgag gacagagcg 29

<210> 15
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi

<400> 15
 taactcgagc tctgtctcat cacgtcgg 28

<210> 16
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi

<400> 16
 ttaggatcca aattgcagtc ataggagtct tc 32

<210> 17
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi

<400> 17
 taactcgaga gtacgttgac gtgctctga 29

<210> 18
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 18
ttaggatccg tgggttaaac aactgcaaa 29

<210> 19
<211> 33
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 19
taactcgagg gttaaagtct tctatcctcc tgg 33

<210> 20
<211> 31
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 20
ttaggatccg gataaccact gggataatag g 31

<210> 21
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 21
taactcgaga gttgtgaaat tccttctgcc 30

<210> 22
<211> 29
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 22
ttaggatccc gcagatagaa ccagtgaac 29

<210> 23
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi

<400> 23
 taactcgagc agcagctcta cttgggtc 28

<210> 24
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi

<400> 24
 ttaggatcca ggagggaaag acaggct 27

<210> 25
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi

<400> 25
 taactcgagc cctcgccttc ttctg 25

<210> 26
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi

<400> 26
 ttaggatccc aaaatagaag gaggcaaaa ag 32

<210> 27
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 27

taactcgagc ctggagtttc ttaagtaata gttgc

35

<210> 28

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 28

ttaggatcca ccggtccagg tcattta

27

<210> 29

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 29

taactcgagg cagcaaattc ttcccag

27

<210> 30

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 30

ttaggatccc cattccagaa cacactacag

30

<210> 31

<211> 29

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 31

taactcgaga tacctgattt catcatggc

29

<210> 32
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 32
ttaggatccc ctttgataag agccaagatg 30

<210> 33
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 33
taactcgagt acaaagttat gacgggtcct 30

<210> 34
<211> 28
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 34
ttaggatccc aacgaacagg gctaattg 28

<210> 35
<211> 26
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 35
taactcgagg accgcttaaa ggccag 26

<210> 36
<211> 29
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223>	mỗi	
<400>	36	
ttaggatccg	tgcatgaaaa	tcgaaaatg
		29
<210>	37	
<211>	31	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	mỗi	
<400>	37	
taactcgagt	ggtcttgtgg	ctttatagac a
		31
<210>	38	
<211>	27	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	mỗi	
<400>	38	
ttaggatcca	accgaggaa	accctac
		27
<210>	39	
<211>	25	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	mỗi	
<400>	39	
taactcgagg	taccgcaccg	tctgg
		25
<210>	40	
<211>	27	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	mỗi	
<400>	40	
ttaggatcca	gctaccttgc	agcacgt
		27

<210> 41
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi

<400> 41
 taactcgagc ccaccatcga cagg 24

<210> 42
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi

<400> 42
 ttaggatccc gagccgtata agtattggc 29

<210> 43
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi

<400> 43
 taactcgagc gccggtgaag accttac 27

<210> 44
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi

<400> 44
 ttaggatcca ctactgtcag tcactttgga gc 32

<210> 45
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 45
taactcgagt accgggttg ttgctat

29

<210> 46
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 46
ttaggatccc acaactggta ctgcagagac

30

<210> 47
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 47
taactcgagg cgtagccctt tgatctatag

30

<210> 48
<211> 26
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 48
ttaggatccg gtgctatgcg tgcgt

26

<210> 49
<211> 29
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 49
taactcgaga tctcctacgt ccctgtggg

29