(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) **1-0044601**

(51)[7] **C07K 16/10**; A61K 39/12; G01N 33/569; C12Q 1/70; A61K 39/00; A61K 39/395

(13) **B**

(21) 1-2017-04538
(22) 14/04/2016
(86) PCT/US2016/027466 14/04/2016
(87) WO2016/168417 A2 20/10/2016
(30) 62/147,354 14/04/2015 US
(45) 25/04/2025 445
(43) 26/04/2018 361A
(71) VANDERBILT UNIVERSITY (US)
305 Kirkland Hall, 2201 West End Avenue, Nashville, TN 37240, US
(72) CROWE James E. (US); SMITH Scott A. (US); DERMODY Terence (US); SILVA Laurie (US).
(74) Công ty TNHH Trần Hữu Nam và Đồng sự (TRAN H.N & ASS.)

(54) KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG TÁI TỔ HỢP HOẶC MẢNH KHÁNG THỂ, DƯỢC PHẨM VÀ BỘ KIT CHỨA KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG TÁI TỔ HỢP HOẶC MẢNH KHÁNG THỂ NÀY

(21) 1-2017-04538

(57) Sáng chế này đề cập đến các kháng thể liên kết với và trung hòa virut Chikungunya (CHIKV) và các phương pháp sử dụng chúng. Sáng chế cũng bộc lộ kháng thể đơn dòng, tế bào lai, phương pháp phát hiện sự lây nhiễm virut Chikungunya ở đối tượng, dược phẩm, dòng tế bào, phương pháp sản xuất kháng thể và bộ kit chứa kháng thể này.

Đơn này yêu cầu hưởng quyền ưu tiên đối với đơn yêu cầu cấp sáng chế Hòa Kỳ tạm thời số 62/147.354, nộp ngày 14 tháng 4 năm 2015, có toàn bộ nội dung được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Cơ sở pháp lý

Sáng chế này được thực hiện dưới sự hỗ trợ của chính phủ theo các khoản tài trợ số K08 AI103038, F32 AI096833, và U54 AI057157 cấp bởi Viện Y tế Quốc gia Hoa Kỳ. Chính phủ có các quyền nhất định đối với sáng chế này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Nói chung, sáng chế đề cập đến các lĩnh vực y học, bệnh truyền nhiễm, và miễn dịch học. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến các kháng thể trung hòa virut Chikungunya.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Virut Chikungunya (CHIKV) là một loại virut mang ARN chiều dương có vỏ bọc thuộc chi Alphavirut của họ Togaviridae và lây truyền qua muỗi Aedes. Hạt virut CHIKV trưởng thành chứa hai glycoprotein, E1 và E2, được tạo ra từ một tiền polyprotein, p62-E1, bởi sự phân giải proteolytic. E2 hoạt động trong quá trình gắn kết của virut, trong khi E1 làm trung gian dung hợp tế bào, cho phép virut xâm nhập vào cơ thể (Kielian et al., 2010). Ở người, sự nhiễm CHIKV gây ra sốt và đau khớp, có thể rất nặng và một vài trường hợp có thể kéo dài trong nhiều năm (Schilte et al., 2013, Sissoko et al., 2009, Staples et al., 2009). CHIKV đã gây ra sự bùng phát bệnh dịch ở hầu hết các khu vực của Châu Phi ở vùng hạ Sahara và ở một vài khu vực ở châu Á, châu Âu, Ấn Độ Dương và Thái Bình Dương. Vào tháng 12 năm 2013, đợt bùng phát virut CHIKV đầu tiên ở Tây bán cầu đã xảy ra, với các ca mắc ngay tại địa phương ở St. Martin (CDC 2013). Virut này lây truyền nhanh chóng đến hầu như tất cả các đảo ở Caribê cũng như Trung, Nam, và Bắc Mỹ. Trong chưa đầy một năm, xuất hiện hơn một triệu trường hợp nghi mắc CHIKV ở Tây Bán cầu, và thế giới đã ghi nhận đợt bùng phát dịch lan ra hơn 40 quốc gia, bao gồm Hoa Kỳ (CDC, 2014). Hiện không có vắc xin hoặc

liệu pháp chống virut nào được cấp phép để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh nhiễm CHIKV.

Mặc dù cơ chế miễn dịch bảo vệ đối với bệnh nhiễm CHIKV ở người chưa được hiểu một cách đầy đủ, phản ứng dịch thể kiểm soát sự lây nhiễm và hạn chế tổn thương mô (Chu et al., 2013; Hallengard et al., 2014; Hawman et al., 2013; Kam et al., 2012b, Lum et al., 2013, Pal et al., 2013). Gama globulin miễn dịch ở người trung hòa tính lây nhiễm ở các tế bào được nuôi cấy và phòng ngừa mắc bệnh ở chuột tối đa 24 giờ sau khi được tiêm virut (Couderc et al., 2009). Một vài kháng thể đơn dòng ở chuột (các mAb) trung hòa sự lây nhiễm CHIKV đã được mô tả (Brehin et al., 2008, Goh et al., 2013; Masrinoul et al., 2014; Palvà et al., 2013; Pal et al., 2014), bao gồm một vài kháng thể có hiệu quả khi được sử dụng kết hợp để điều trị bệnh cho chuột hoặc động vật linh trưởng không phải người sau khi được tiêm CHIKV (Pal et al., 2013; Pal et al., 2014). Khi so sánh, các mAb CHIKV ở người xuất hiện với số lượng giới hạn, phần lớn trong số chúng thể hiện hoạt tính trung hòa trung bình (Fong et al., 2014; Fric et al., 2013; Lee et al., 2011; Selvarajah et al., 2013; Warter et al., 2011).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vì thế, sáng chế đề xuất phương pháp phát hiện sự nhiễm virut Chikungunya ở đối tượng, bao gồm các bước (a) cho mẫu từ đối tượng đó tiếp xúc lần lượt với kháng thể hoặc mảnh kháng thể có các trình tự CDR của chuỗi nặng và nhẹ bắt cặp theo dòng tương ứng theo bảng 3 và 4; và (b) phát hiện glycoprotein E2 của virut Chikungunya có trong mẫu bằng liên kết của kháng thể hoặc mảnh kháng thể nói trên với E2 trong mẫu nói trên. Mẫu này có thể là dịch thể, như máu, đờm, nước mắt, nước bọt, chất nhầy hoặc huyết thanh, nước tiểu hoặc phân. Bước phát hiện này có thể sử dụng phương pháp ELISA, RIA hoặc Western blot. Phương pháp này có thể bao gồm thêm việc thực hiện các bước (a) và (b) lần thứ hai và xác định sự thay đổi lượng E2 so với lần xét nghiệm đầu tiên. Kháng thể này có thể được mã hoá bởi các trình tự biến đổi bắt cặp theo dòng như được nêu trong bảng 1, hoặc được mã hoá bởi các trình tự biến đổi của chuỗi nhẹ và nặng có mức độ đồng nhất là 70%, 80%, 90% hoặc 95% với các trình tự biến đổi bắt cặp theo dòng như được nêu trong bảng 1, hoặc có trình tự biến đổi của chuỗi nhẹ và nặng được đặc trưng bởi các trình tự bắt cặp theo dòng như được nêu trong bảng 2, hoặc có mức độ đồng nhất là 70%, 80%, 90% hoặc 95% với các trình tự bắt cặp theo dòng

như được nêu trong bảng 2. Mảnh kháng thể có thể là kháng thể tái tổ hợp ScFv (mảnh biến đổi chuỗi đơn), mảnh Fab, mảnh $F(ab')_2$, hoặc mảnh Fv. Kháng thể có thể là IgG, và/hoặc kháng thể khảm.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh cho đối tượng bị nhiễm virut Chikungunya hoặc làm giảm khả năng lây nhiễm của đối tượng có nguy cơ nhiễm virut Chikungunya, bao gồm việc đưa vào cơ thể đối tượng đó kháng thể hoặc mảnh kháng thể có các trình tự CDR của chuỗi nặng và nhẹ bắt cặp theo dòng tương ứng theo bảng 3 và 4. Kháng thể này có thể được mã hoá bởi các trình tự biến đổi bắt cặp theo dòng như được nêu trong bảng 1, hoặc được mã hoá bởi các trình tự biến đổi của chuỗi nhẹ và nặng có mức độ đồng nhất là 70%, 80%, 90% hoặc 95% với các chuỗi biến đổi bắt cặp theo dòng như được nêu trong bảng 1, hoặc có các trình tự biến đổi của chuỗi nhẹ và nặng được đặc trưng bởi các trình tự bắt cặp theo dòng như được nêu trong bảng 2, hoặc có mức độ đồng nhất là 70%, 80%, 90% hoặc 95% với các trình tự bắt cặp theo dòng như được nêu trong bảng 2. Mảnh kháng thể này có thể là kháng thể tái tổ hợp ScFv (mảnh biến đổi chuỗi đơn), mảnh Fab, mảnh $F(ab')_2$, hoặc mảnh Fv. Kháng thể này có thể là IgG, và/hoặc kháng thể khảm. Kháng thể hoặc mảnh kháng thể có thể được đưa vào cơ thể trước khi lây nhiễm, hoặc sau khi lây nhiễm. Việc đưa vào cơ thể có thể bao gồm dùng kháng thể hoặc mảnh kháng thể, hoặc chuyển gen (vật chất di chuyền) với trình tự ARN hoặc ADN hoặc vật chủ trung gian mã hoá kháng thể hoặc mảnh kháng thể.

Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng, trong đó kháng thể này được đặc trưng bởi các trình tự CDR của chuỗi nặng và nhẹ bắt cặp theo dòng tương ứng theo bảng 3 và 4. Kháng thể này có thể được mã hoá bởi các trình tự biến đổi bắt cặp theo dòng như được nêu trong bảng 1, hoặc được mã hoá bởi các trình tự biến đổi của chuỗi nhẹ và nặng có mức độ đồng nhất là 70%, 80%, 90% hoặc 95% với các trình tự biến đổi bắt cặp theo dòng như được nêu trong bảng 1, hoặc có các trình tự biến đổi của chuỗi nhẹ và nặng được đặc trưng bởi các trình tự bắt cặp theo dòng như được nêu trong bảng 2, hoặc có mức độ đồng nhất là 70%, 80%, 90% hoặc 95% với các trình tự bắt cặp theo dòng như được nêu trong bảng 2. Mảnh kháng thể này có thể là kháng thể tái tổ hợp ScFv (mảnh biến thể chuỗi đơn), mảnh Fab, mảnh F(ab')2, hoặc mảnh Fv. Kháng thể này có thể là kháng thể khảm, hoặc kháng thể đặc hiệu kép hướng đích kháng nguyên của virut Chikungunya khác với glycoprotein. Kháng thể này có thể là IgG.

Kháng thể hoặc mảnh kháng thể này chứa thêm peptit thâm nhập tế bào và/hoặc là một nội bào.

Sáng chế cũng đề xuất tế bào lai hoặc tế bào nhân tạo mã hoá kháng thể hoặc mảnh kháng thể, trong đó kháng thể hoặc mảnh kháng thể này được đặc trưng bởi các trình tự CDR của chuỗi nặng và nhẹ bắt cặp theo dòng tương ứng theo bảng 3 và 4. Kháng thể hoặc mảnh kháng thể này có thể được mã hoá bởi các trình tự biến đổi bắt cặp theo dòng như được nêu trong bảng 1, hoặc được mã hoá bởi các trình tự biến đổi của chuỗi nhẹ và nặng có mức độ đồng nhất là 70%, 80%, 90% hoặc 95% với các trình tự biến đổi bắt cặp theo dòng như được nêu trong bảng 1, hoặc có các trình tự biến đổi của chuỗi nhẹ và nặng được đặc trưng bởi các trình tự bắt cặp theo dòng như được nêu trong bảng 2, hoặc có mức độ đồng nhất là 70%, 80%, 90% hoặc 95% với các trình tự bắt cặp theo dòng như được nêu trong bảng 2. Mảnh kháng thể này có thể là kháng thể tái tổ hợp ScFv (mảnh biến đổi chuỗi đơn), mảnh Fab, mảnh $F(ab')_2$, hoặc mảnh Fv. Kháng thể này có thể là kháng thể khảm, và/hoặc IgG. Kháng thể hoặc mảnh kháng thể này có thể chứa thêm peptit thâm nhập tế bào và/hoặc là một nội bào.

Theo một phương án, kháng thể đơn dòng phân lập hoặc mảnh liên kết với kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với glycoprotein E2 của virut Chikungunya, chứa các cặp trình tự biến đổi của chuỗi nặng và nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 53/54, 55/56, 57/58, 59/60, 61/62, 63/64, 65/66, 67/68, 70/71, 72/73, 74/75, 76/77, 81/82, 83/84, 85/86, 87/88, 89/90, 91/92, 93/94, 95/96, và 97/98.

Theo một phương án, kháng thể đơn dòng phân lập hoặc mảnh liên kết với kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với glycoprotein E2 của virut Chikungunya bao gồm các trình tự axit amin CDRH1, CDRH2 và CDRH3 có các SEQ ID NO: 103, 104 và 105 tương ứng, và các trình tự axit amin CDRL1, CDRL2 và CDRL3 có các SEQ ID NO: 187, 188 và 189 tương ứng.

Theo một phương án, kháng thể đơn dòng phân lập hoặc mảnh liên kết với kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với glycoprotein E2 của virut Chikungunya bao gồm các trình tự axit amin CDRH1, CDRH2 và CDRH3 có các SEQ ID NO: 106, 107 và 108 tương ứng và các trình tự axit amin CDRL1, CDRL2 và CDRL3 có các SEQ ID NO: 190, 191 và 192 tương ứng.

Theo một phương án, kháng thể đơn dòng phân lập hoặc mảnh liên kết với kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với glycoprotein E2 của virut Chikungunya bao gồm

các trình tự axit amin CDRH1, CDRH2 và CDRH3 có các SEQ ID NO: 109, 110 và 111 tương ứng, và các trình tự axit amin CDRL1, CDRL2 và CDRL3 có các SEQ ID NO: 193, 194 và 195 tương ứng.

Theo một phương án, kháng thể đơn dòng phân lập hoặc mảnh liên kết với kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với glycoprotein E2 của virut Chikungunya chứa các trình tự axit amin CDRH1, CDRH2 và CDRH3 có các SEQ ID NO: 112, 113 và 114 tương ứng, và các trình tự axit amin CDRL1, CDRL2 và CDRL3 có các SEQ ID NO: 196, 197 và 198 tương ứng.

Theo một phương án, kháng thể đơn dòng phân lập hoặc mảnh liên kết với kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với glycoprotein E2 của virut Chikungunya chứa các trình tự axit amin CDRH1, CDRH2 và CDRH3 có các SEQ ID NO: 115, 116 và 117 tương ứng, và các trình tự axit amin CDRL1, CDRL2 và CDRL3 có các SEQ ID NO: 199, 200 và 201 tương ứng.

Theo một phương án, kháng thể đơn dòng phân lập hoặc mảnh liên kết với kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với glycoprotein E2 của virut Chikungunya chứa các trình tự axit amin CDRH1, CDRH2 và CDRH3 có các SEQ ID NO: 118, 119 và 120 tương ứng và các trình tự axit amin CDRL1, CDRL2 và CDRL3 có các SEQ ID NO: 202, 203 và 204 tương ứng.

Theo một phương án, kháng thể đơn dòng phân lập hoặc mảnh liên kết với kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với glycoprotein E2 của virut Chikungunya chứa các trình tự axit amin CDRH1, CDRH2 và CDRH3 có các SEQ ID NO: 121, 122 và 123 tương ứng và các trình tự axit amin CDRL1, CDRL2 và CDRL3 có các SEQ ID NO: 205, 206 và 207 tương ứng.

Theo một phương án, kháng thể đơn dòng phân lập hoặc mảnh liên kết với kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với glycoprotein E2 của virut Chikungunya chứa các trình tự axit amin CDRH1, CDRH2 và CDRH3 có các SEQ ID NO: 124, 125 và 126 tương ứng và các trình tự axit amin CDRL1, CDRL2 và CDRL3 có các SEQ ID NO: 208, 209 và 210 tương ứng.

Theo một phương án, kháng thể đơn dòng phân lập hoặc mảnh liên kết với kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với glycoprotein E2 của virut Chikungunya chứa các trình tự axit amin CDRH1, CDRH2 và CDRH3 có các SEQ ID NO: 130, 131 và 132

tương ứng và các trình tự axit amin CDRL1, CDRL2 và CDRL3 có các SEQ ID NO: 211, 212 và 213 tương ứng.

Theo một phương án, kháng thể đơn dòng phân lập hoặc mảnh liên kết với kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với glycoprotein E2 của virut Chikungunya chứa các trình tự axit amin CDRH1, CDRH2 và CDRH3 có các SEQ ID NO: 133, 134 và 135 tương ứng và các trình tự axit amin CDRL1, CDRL2 và CDRL3 có các SEQ ID NO: 214, 215 và 216 tương ứng.

Theo một phương án, kháng thể đơn dòng phân lập hoặc mảnh liên kết với kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với glycoprotein E2 của virut Chikungunya chứa các trình tự axit amin CDRH1, CDRH2 và CDRH3 có các SEQ ID NO: 136, 137 và 138 tương ứng và các trình tự axit amin CDRL1, CDRL2 và CDRL3 có các SEQ ID NO: 217, 218 và 219 tương ứng.

Theo một phương án, kháng thể đơn dòng phân lập hoặc mảnh liên kết với kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với glycoprotein E2 của virut Chikungunya chứa các trình tự axit amin CDRH1, CDRH2 và CDRH3 có các SEQ ID NO: 139, 140 và 141 tương ứng và các trình tự axit amin CDRL1, CDRL2 và CDRL3 có các SEQ ID NO: 220, 221 và 222 tương ứng.

Theo một phương án, kháng thể đơn dòng phân lập hoặc mảnh liên kết với kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với glycoprotein E2 của virut Chikungunya chứa các trình tự axit amin CDRH1, CDRH2 và CDRH3 có các SEQ ID NO: 151, 152 và 153 tương ứng và các trình tự axit amin CDRL1, CDRL2 và CDRL3 có các SEQ ID NO: 223, 224 và 225 tương ứng.

Theo một phương án, kháng thể đơn dòng phân lập hoặc mảnh liên kết với kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với glycoprotein E2 của virut Chikungunya chứa các trình tự axit amin CDRH1, CDRH2 và CDRH3 có các SEQ ID NO: 154, 155 và 156 tương ứng và các trình tự axit amin CDRL1, CDRL2 và CDRL3 có các SEQ ID NO: 226, 227 và 228 tương ứng.

Theo một phương án, kháng thể đơn dòng phân lập hoặc mảnh liên kết với kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với glycoprotein E2 của virut Chikungunya chứa các trình tự axit amin CDRH1, CDRH2 và CDRH3 có các SEQ ID NO: 157, 158 và 159 tương ứng và các trình tự axit amin CDRL1, CDRL2 và CDRL3 có các SEQ ID NO: 229, 230 và 231 tương ứng.

Theo một phương án, kháng thể đơn dòng phân lập hoặc mảnh liên kết với kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với glycoprotein E2 của virut Chikungunya chứa các trình tự axit amin CDRH1, CDRH2 và CDRH3 có các SEQ ID NO: 160, 161 và 162 tương ứng và các trình tự axit amin CDRL1, CDRL2 và CDRL3 có các SEQ ID NO: 232, 233 và 234 tương ứng.

Theo một phương án, kháng thể đơn dòng phân lập hoặc mảnh liên kết với kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với glycoprotein E2 của virut Chikungunya chứa các trình tự axit amin CDRH1, CDRH2 và CDRH3 có các SEQ ID NO: 163, 164 và 165 tương ứng và các trình tự axit amin CDRL1, CDRL2 và CDRL3 có các SEQ ID NO: 235, 236 và 237 tương ứng.

Theo một phương án, kháng thể đơn dòng phân lập hoặc mảnh liên kết với kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với glycoprotein E2 của virut Chikungunya chứa các trình tự axit amin CDRH1, CDRH2 và CDRH3 có các SEQ ID NO: 166, 167 và 168 tương ứng và các trình tự axit amin CDRL1, CDRL2 và CDRL3 có các SEQ ID NO: 238, 239 và 240 tương ứng.

Theo một phương án, kháng thể đơn dòng phân lập hoặc mảnh liên kết với kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với glycoprotein E2 của virut Chikungunya chứa các trình tự axit amin CDRH1, CDRH2 và CDRH3 có các SEQ ID NO: 169, 170 và 171 tương ứng và các trình tự axit amin CDRL1, CDRL2 và CDRL3 có các SEQ ID NO: 241, 242 và 243 tương ứng.

Theo một phương án, kháng thể đơn dòng phân lập hoặc mảnh liên kết với kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với glycoprotein E2 của virut Chikungunya chứa các trình tự axit amin CDRH1, CDRH2 và CDRH3 có các SEQ ID NO: 172, 173 và 174 tương ứng và các trình tự axit amin CDRL1, CDRL2 và CDRL3 có các SEQ ID NO: 244, 245, và 246 tương ứng.

Theo một phương án, kháng thể đơn dòng phân lập hoặc mảnh liên kết với kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với glycoprotein E2 của virut Chikungunya chứa các trình tự axit amin CDRH1, CDRH2 và CDRH3 có các SEQ ID NO: 175, 176 và 177 tương ứng và các trình tự axit amin CDRL1, CDRL2 và CDRL3 có các SEQ ID NO: 247, 248 và 249 tương ứng.

Việc sử dụng từ "một" khi được dùng kết hợp với thuật ngữ "chứa" trong các điểm yêu cầu bảo hộ và/hoặc bản mô tả có thể có nghĩa là "một", nhưng nó cũng có thể

mang nghĩa "một hoặc nhiều", "Ít nhất một" và "một hoặc nhiều". Từ "khoảng" có nghĩa là sai số trên dưới 5% so với con số đã nêu.

Phương pháp hoặc dược phẩm bất kỳ được mô tả ở đây có thể được kết hợp với phương pháp hoặc chế phẩm bất kỳ khác được mô tả ở đây. Các đối tượng, dấu hiệu và ưu điểm khác của sáng chế này sẽ trở nên rõ ràng hơn từ phần mô tả chi tiết dưới đây. Tuy nhiên, cần phải hiểu rằng mặc dù phần mô tả chi tiết và các ví dụ cụ thể biểu thị các phương án cụ thể của sáng chế, nhưng chỉ nhằm mục đích minh họa, vì các thay đổi và sửa đổi khác nhau nằm trong tinh thần và phạm vi của sáng chế này sẽ trở nên rõ ràng đối với các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật từ phần mô tả chi tiết này.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các hình vẽ dưới đây là một phần của bản mô tả này và được đưa vào để làm rõ hơn nữa những khía cạnh nhất định của sáng chế này. Sáng chế này có thể được hiểu rõ hơn nếu dựa vào một hoặc nhiều hình vẽ kết hợp với phần mô tả chi tiết của các phương án cụ thể được trình bày dưới đây.

Hình 1A-C. Phân tích cấu trúc của các phần dư E2 quan trọng đối với sự liên kết mAb. (Hình 1A) Sự sắp xếp trình tự của E2 từ các chủng CHIKV được sử dụng trong nghiên cứu này. Tên chủng được biểu thị phía bên trái (S27, SEQ ID NO: 1, Số hiệu truy cập AF369024.2, SL15649, Số hiệu truy cập GU189061, LR2006_OPY1, Số hiệu truy cập DQ443544.2; 99659, Số hiệu truy cập KJ451624, RSU1, Số hiệu truy cập HM045797.1; NI 64 IbH35, Số hiệu truy cập HM045786.1). Các số phía trên trình tự tương ứng với vị trí axit amin trong protein E2 trưởng thành. Các axit amin giống với chủng S27 được biểu thị bởi đường gạch chéo. Các miền của E2 được xác định từ cấu trúc tinh thể của heterođime E2/E1 của virut CHIKV (Voss et al., 2010) được vẽ trong sơ đồ phía trên sự sắp xếp trình tự và được mã hoá bằng màu (màu xanh lục: miền A, màu tím: liên kết dải beta, xanh lá cây: miền B, màu hồng: miền C, màu nâu xám bóng: các vùng không có mặt trong cấu trúc tinh thể). Vị trí của các phần dư mà ở đó sự thế alanin phá vỡ liên kết mAb, như được xác định bởi phương pháp đột biến quét alanin, được biểu thị bởi các dấu chấm mã hoá bằng màu phía trên sự sắp xếp đối với mỗi kháng thể cụ thể. Các phần dư ảnh hưởng đến liên kết của nhiều kháng thể được biểu thị bằng các ô vuông màu xám, với màu xám càng sẫm thì số lượng kháng thể bị ảnh hưởng bởi sự thế alanin ở phần dư đó càng nhiều. (Hình 1B) Vị trí của các phần dư cần thiết đối

với liên kết mAb được ánh xạ vào cấu trúc tinh thể của phức glycoprotein có vỏ trưởng thành (PDB ID 3N41). Hình chiếu cạnh của vết dải của một heterođime E1/E2 được thể hiện với E1 có màu xanh lục và các miền của E2 có màu như trong bảng A. Các chuỗi cạnh của các axit amin cần thiết đối với liên kết kháng thể được thể hiện là các dạng trám không gian và được mã hoá bằng màu đối với mỗi trong số 20 kháng thể riêng biệt theo chú giải trong bảng A. Các phần dư ảnh hưởng đến sự liên kết của nhiều kháng thể được vẽ bằng các ô vuông màu xám, với màu xám càng sẫm thì số lượng kháng thể bị ảnh hưởng bởi sự thế alanin ở phần dư đó càng nhiều (chú thích trình bày ở phía bên trái). (Hình 1C) Hình chiếu bằng từ phía trên của heterođime E1/E2, được quay 90° từ cấu trúc trong hình 1B.

Hình 2A-B. Cơ chế trung hòa bởi các mAb kháng virut CHIKV ở người. (Hình 2A) Các xét nghiệm trung hòa trước và sau khi gắn kết. Các VRP SL15649 đã được (i) ủ với các mAb đã nêu (bao gồm CHK-152, mAb đối chứng dương tính) ở 4°C trong 1 giờ trước khi thêm vào các tế bào Vero đã được làm lạnh trước, tiếp theo là loại bỏ virut không liên kết bằng ba lần rửa (trước khi gắn kết; vòng tròn kín) hoặc (ii) cho phép hấp phụ các tế bào Vero đã được làm lạnh trước ở nhiệt độ 4°C trong 1 giờ, sau đó thêm các mAb đã nêu ở 4°C trong 1 giờ (sau khi gắn kết, vòng tròn hở). (Hình 2B) Xét nghiệm FFWO. Các VRP SL15649 đã được hấp phụ vào các tế bào Vero đã được làm lạnh trước ở nhiệt độ 4°C trong 1 giờ, tiếp theo là thêm các mAb đã nêu (bao gồm CHK-152, mAb ở chuột đối chứng dương tính) trong 1 giờ. Virut không liên kết đã bị loại bỏ, và các tế bào được cho tiếp xúc với môi trường có độ pH thấp (độ pH 5,5, các vòng tròn kín) ở 37°C trong 2 phút để kích hoạt sự xâm nhập virut trên màng sinh chất. Với đối chứng âm tính, các tế bào đã được cho tiếp xúc với môi trường có độ pH trung tính (độ pH 7,4, vòng tròn hở) ở 37°C trong 2 phút. Đối với cả hai hình 2A và 2B, các tế bào đã được ủ ở 37°C trong 18 giờ sau khi lây nhiễm, và các tế bào dương tính với GFP được định lượng bằng kính hiển vi huỳnh quang. Dữ liệu này được tổng hợp từ hai thí nghiệm độc lập, mỗi thí nghiệm được thực hiện ba lần.

Hình. 3A-D. Liệu pháp dùng mAb của người chống lại sự nhiễm virut CHIKV gây tử vong ở những con chuột Ifnar$^{-/-}$. (Hình 3A) Những con chuột thí nghiệm được tiêm 50μg virut CHIKV đặc hiệu đã nêu hoặc mAb đối chứng bằng cách tiêm trong màng bụng 24 giờ trước khi nhiễm virut CHIKV gây tử vong (n = 3 đến 6 con chuột với mỗi mAb được thí nghiệm). (Hình 3B) Những con chuột thí nghiệm được tiêm 50μg

virut CHIKV đặc hiệu đã nêu hoặc mAb đối chứng bằng cách tiêm trong màng bụng 24 giờ sau khi nhiễm virut CHIKV gây tử vong (n = 4 đến 6 con chuột đối với mỗi mAb được thí nghiệm). (Hình 3C) Những con chuột thí nghiệm được tiêm 250µg virut CHIKV đặc hiệu đã nêu hoặc mAb đối chứng bằng cách tiêm trong màng bụng 48 giờ sau khi nhiễm virut CHIKV gây tử vong (n = 7 đến 10 con chuột mỗi mAb được thí nghiệm). (Hình 3D) Những con chuột thí nghiệm được tiêm 250µg virut CHIKV đặc hiệu đã nêu hoặc mAb đối chứng bằng cách tiêm trong màng bụng 60 giờ sau khi nhiễm virut CHIKV gây tử vong (n = 8 con chuột trên mỗi tổ hợp mAb được thí nghiệm ngoại trừ trường hợp 4J21 + 2H1, trong đó n = 3). Đối với một liệu pháp điều trị với 4J21 hoặc 4N12 sử dụng một liều 500µg duy nhất (n = 4 đến 5 con chuột mỗi mAb được thí nghiệm).

Hình 4. Phát ban đỏ tại thời điểm xuất hiện cấp tính. Đối tượng được đưa tới bác sĩ gia đình có biểu hiện sốt (39°C) trong suốt ba ngày, đồng thời có dấu hiệu đau khớp ở khuỷu tay và ngón tay, và phát ban. Những người chăm sóc đối tượng này đã ghi nhận có phát ban đỏ nổi lên, không ngứa và chuyển trắng khi tiêu biến (ảnh được thể hiện trên hình vẽ) trên lưng, ngực và bụng.

Hình 5. Xác định các nhóm mAb cạnh tranh. Liên kết cạnh tranh được định lượng dựa trên công nghệ giao thoa sinh học bằng hệ thống Octet được sử dụng để sắp xếp các mAb vào các nhóm cạnh tranh. Các đầu của máy cảm biến sinh học Anti-Penta-His phủ ngoài bởi vùng ngoại bào E2 cố định của CHIKV-LR2006 được nhúng vào trong các giếng chứa mAb ban đầu, tiếp theo là nhúng vào các giếng chứa các mAb cạnh tranh. Các trị số được thể hiện là tỷ lệ phần trăm liên kết của mAb cạnh tranh với sự có mặt của mAb đầu tiên (được xác định bằng cách so sánh tín hiệu tối đa của mAb cạnh tranh được dùng sau phức hợp mAb đầu tiên với tín hiệu tối đa của một mình mAb cạnh tranh). Các mAb đã được đánh giá là có khả năng cạnh tranh tốt trong việc liên kết với cùng một vị trí nếu tỷ lệ liên kết tối đa của mAb cạnh tranh được giảm xuống < 30% so với liên kết không cạnh tranh của nó (ô vuông màu đen) hoặc để thể hiện sự hoàn thiện một phần nếu liên kết của mAb cạnh tranh được giảm xuống < 70% so với liên kết không cạnh tranh của nó (ô vuông màu xám). Các mAb được coi là không cạnh tranh nếu tỷ lệ liên kết tối đa của mAb cạnh tranh là > 70% so với liên kết không cạnh tranh của nó (ô vuông màu trắng). Bốn nhóm liên kết cạnh tranh đã được xác định, được biểu thị bởi các ô màu. Các vị trí tương ứng của kháng nguyên chính đối với các mAb đã được phát

hiện bởi kỹ thuật đột biến quét alanin (bảng 1 và hình vẽ từ 1A đến 1C) được tóm tắt trong các cột bên phải của ma trận cạnh tranh. DA biểu thị miền A; DB biểu thị miền B, e biểu thị cung 1 và 2; NT nghĩa là không được thí nghiệm; NotReact nghĩa là mAb đã không phản ứng chống lại protein có lớp màng bọc tự nhiên; NoReduct nghĩa là mAb đã liên kết với các protein E tự nhiên, nhưng không có sự suy giảm nào được ghi nhận đối với đột biến bất kỳ. Dữ liệu được tổng hợp từ một thí nghiệm, với nhiều lần đọc đối với mỗi mAb riêng lẻ và một lần đọc của mAb kết hợp với mỗi kháng thể cạnh tranh.

Hình 6A-F. Ánh xạ epitop có độ phân giải cao của các MAb virut CHIKV. (A) Một nhóm đột biến quét alanin cho protein có màng bảo vệ của virut CHIKV gồm 910 đột biến E2/E1 đã được tạo ra mà trong đó mỗi axit amin bị đột biến riêng thành alanin. Mỗi giếng tại mỗi đĩa gây đột biến dạng mảng chứa một đột biến với một phản ứng thế xác định. Kết quả phản ứng của một đĩa 384 giếng đại diện được thể hiện. Tám đĩa cho kết quả dương tính (E2/E1 tự nhiên) và tám đĩa cho kết quả âm tính (giả nhiễm nạp) trên mỗi đĩa. (B) Để thiết lập ánh xạ epitop, các tế bào HEK-293T ở người biểu hiện nhóm đột biến có màng bảo vệ của virut CHIKV đã được thí nghiệm về khả năng phản ứng miễn dịch với MAb được quan tâm (MAb 4G20 được thể hiện ở đây) và được đo bằng cách sử dụng bộ đếm tế bào theo dòng chảy trung hòa cao Intellicyt. Các dòng với khả năng phản ứng < 30% so với E2/E1 của virut CHIKV tự nhiên, mặc dù > 70% khả năng phản ứng đối với MAb E2/E1 của virut CHIKV khác ban đầu được xác định là có tính quyết định đối với liên kết MAb. (C) Đột biến của bốn phần dư riêng lẻ đã làm giảm liên kết 4G20 (cột màu đỏ) nhưng không ảnh hưởng nhiều đến liên kết của các MAb phụ thuộc vào cấu hình khác (cột màu xám) hoặc kháng thể đa dòng của thỏ (rPAb, một món quà từ IBT Bioservices). Các cột biểu thị trị số trung bình và khoảng của ít nhất hai điểm dữ liệu sao chép. (D) Các epitop của các MAb trung hòa với PRNT50 <1.000 ng/ml được ánh xạ vào cấu trúc tinh thể trime của E2/E1 (PDB Entry 2XFC). Tất cả các epitop trung hòa được ánh xạ vào các miền tiếp xúc xa màng tế bào của E2/E1. Mỗi tiểu đơn vị của heterođime E2/E1 riêng lẻ được thể hiện bằng một màu khác nhau để cho trực quan. Các vùng miễn dịch cao trong các miền A và B của E2 mà chứa các phần dư epitop quan trọng đối với nhiều MAb được đánh dấu màu đỏ trên một tiểu đơn vị của E2.

Hình 7. Phân tích cấu trúc của các phần dư E2 quan trọng đối với sự liên kết mAb với các kháng thể đã được ánh xạ vào các nhóm cạnh tranh. Vị trí của các phần dư cần

thiết chho liên kết của các mAb ở người hoặc ở chuột từ các nhóm cạnh tranh khác nhau (các Hình từ 1A đến 1C) được ánh xạ vào cấu trúc tinh thể của E1/E2 (PDB ID 2XFB). Một mô hình trám không gian của trime E1/E2 với E1 màu trắng và mỗi đơn phân E2 màu xám nhạt, xám sẫm hoặc đen. Các phần dư cần thiết cho liên kết kháng thể được mã hoá bằng màu theo (các) nhóm cạnh tranh mà chúng thuộc về. Màu đỏ biểu thị các phần dư D117 và I121, các phần dư cần thiết cho liên kết 5N23, và thuộc về nhóm cạnh tranh 1. Màu xanh lam biểu thị các phần dư R80 và G253, các phần dư cần thiết cho liên kết I06 hoặc 5M16, và thuộc nhóm cạnh tranh 2. Màu xanh lá cây biểu thị các phần dư Q184, S185, I190, V197, R198, Y199, G209, L210, T212 và I217, các phần dư cần thiết cho liên kết CHK-285, CHK-88 hoặc 3A2, và thuộc nhóm cạnh tranh 3. Màu da cam biểu thị phần dư H18, phần dư cần thiết cho liên kết 5F19, và thuộc nhóm cạnh tranh 4. Màu tím biểu thị các phần dư E24, A33, L34, R36, V50, D63, F100, T155, các phần dư cần thiết cho liên kết 5N23, CHK-84, hoặc CHK-141, và thuộc nhóm cạnh tranh 1 và 2. Màu xanh mòng két biểu thị các phần dư T58, D59, D60, R68, I74, D77, T191, N193, và K234, các phần dư cần thiết cho liên kết 1H12, và thuộc nhóm cạnh tranh 2 và 3. Màu nâu biểu thị các phần dư D71, phần dư cần thiết cho liên kết CHK-84 và 1H12, và thuộc về các nhóm cạnh tranh 1, 2 và 3. Màu vàng biểu thị các phần dư (T58, D71, N72, I74, P75, A76, D77, S118, và R119) bao gồm miền liên kết thụ thể giả định (RBD), ngoại trừ phần dư D71, thuộc nhóm cạnh tranh 1, 2, và 3. Bảng trên thể hiện hình phối cảnh của trime, bảng giữa thể hiện hình chiếu cạnh có góc của trime khi xoay 45 độ theo trục x từ cấu trúc trong bảng trên, và bảng dưới thể hiện hình chiếu cạnh của trime khi xoay 45 độ theo trục x từ cấu trúc trong bảng giữa.

Hình 8. Cơ chế trung hòa bởi hai mAb kháng virut CHIKV ở người, 2H1 hoặc 4N12. Các thí nghiệm về sự trung hòa trước và sau khi gắn kết. Các hạt đơn vị sao chép virut (các VRP) SL15649 chủng CHIKV đã được (1) ủ với các mAb đã nêu (2H1 hoặc 4N12) trước khi thêm vào các tế bào Vero đã được làm lạnh trước, sau đó loại bỏ các virut không liên kết bằng ba lần rửa (trước khi gắn kết; vòng trong kín) hoặc (2) được phép hấp phụ các tế bào Vero đã được làm lạnh trước, sau đó bổ sung các mAb đã nêu (sau khi gắn kết, vòng tròn hở). Các mAb này trung hòa khi được thêm vào trước hoặc sau khi gắn kết.

Hình 9. Mô hình bệnh cấp tính ở chuột B6. Tế bào CHO sản sinh các kháng thể tái tổ hợp, đã được đưa vào ngày thứ nhất, làm giảm số lượng virut có trong mắt cá chân

so với việc điều trị bằng kháng thể đối chứng vào D+3. Các thí nghiệm được thực hiện trên những con chuột WT 4 tuần tuổi sau khi tiêm dưới da 10^3 FFU virut CHIKV-LR. Các kháng thể đã được tiêm vào D+1 và các mô được thu thập vào D+3 để chuẩn độ bằng xét nghiệm FFA – tạo màng.

Hình 10. Mô hình bệnh cấp tính ở chuột B6. mAb 4N12 CHIKV sản sinh trong các tế bào CHO, được đưa vào cơ thể vào ngày thứ 3, làm giảm chuẩn độ virut trong mắt cá chân. Các thí nghiệm được thực hiện trên những con chuột WT 4 tuần tuổi sau khi tiêm dưới da 10e3 FFU virut CHIKV-LR. Các kháng thể được tiêm vào D+3 và các mô được thu thập vào D+5 để chuẩn độ bằng xét nghiệm FFA – tạo màng.

Hình 11. Mô hình bệnh cấp tính ở chuột B6. Các mAb CHKV sản sinh trong các tế bào CHO, được đưa vào cơ thể vào ngày thứ 3, làm giảm đương lượng gen của virut trong mắt cá chân vào ngày 28. Các thí nghiệm được thực hiện trên những con chuột WT 4 tuần tuổi sau khi tiêm dưới da 10e3 FFU virut CHIKV-LR. Các kháng thể (300 µg) được tiêm vào D+3 và các mô được thu thập vào D+28 để phân tích bằng phản ứng tổng hợp chuỗi theo thời gian thực (qRT-PCR).

Hình 12. Mô hình bệnh gây tử vong chuột có gen INFNAR bất hoạt. Các mAb CHKV sản sinh trong các tế bào CHO, được đưa vào cơ thể qua đường nội hấp 60 giờ sau lây nhiễm, tăng cường khả năng sống sót. Các thí nghiệm đã được thực hiện trên những con chuột IFNAR -/- 4 đến 5 tuần tuổi sau khi tiêm dưới da 10e3 FFU virut CHIKV-LR. Các kháng thể được tiêm 60 giờ sau khi lây nhiễm và tử vong sau đó 21 ngày.

Hình 13. Các đường cong trung hòa đối với các mAb đặc hiệu với virut CHIKV được sản sinh bởi tế bào lai ('cũ') hoặc tái tổ hợp ('mới'). Các đường cong trung hòa đã được thực hiện ở các tế bào BHK21. 100 FFU virut CHIKV-LR được trộn với các mAb đã nêu trong 1 giờ ở 37°C trước khi thêm vào các tế bào BHK21. Sự lây nhiễm đã được xác định bằng xét nghiệm FFA – tạo màng.

Hình 14. Nồng độ ức chế 50% (EC_{50}; ng/mL) đối với các kháng thể được sản sinh bởi tế bào lai so với các kháng thể được sản sinh bởi tế bào CHO tái tổ hợp. Dữ liệu là tương tự với các kháng thể được sản sinh bởi tế bào lai và tái tổ hợp.

Hình 15. Sự sắp xếp của cả hai protein E1 và E2 như các axit amin, và các nucleotit đối với các gen mã hoá các protein này. Số hiệu truy cập của Genbank đối với các protein được liệt kê với chủng virut. Ba chủng virut thu được từ các nhóm nguyên

mẫu: Đông, Trung, Nam Phi (ECSA), hai chủng châu Á, và một chủng Tây Phi được cung cấp. Các kháng thể này phản ứng chéo với tất cả các chủng.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các tác giả sáng chế đã phân lập được một lượng lớn các mAb ở người trung hòa tính lây nhiễm của virut CHIKV trong môi trường nuôi cấy tế bào và điều trị bệnh thành công cho những con chuột *Ifnar*$^{-/-}$ (thiếu các thụ thể interferon loại I) được tiêm liều CHIKV gây tử vong, ngay cả khi được điều trị muộn nhất là 60 giờ sau khi nhiễm bệnh. Các tác giả sáng chế đã xác định được miền A của E2 là vị trí kháng nguyên chính để nhận biết bởi các mAb ngăn chặn sự lây nhiễm của virut CHIKV với hoạt tính siêu mạnh và đã cho thấy cơ chế ức chế chủ yếu là để ngăn ngừa sự dung hợp. Các khía cạnh này và các khía cạnh khác của sáng chế được mô tả một cách chi tiết dưới đây.

I. Sốt Chikungunya và Virut Chikungunya

Sốt Chikungunya là bệnh lẫy nhiễm gây ra bởi virut Chikungunya. Nó có đặc điểm là sốt cao đột ngột thường kéo dài từ hai đến bảy ngày, và các cơn đau nhức khớp thường kéo dài hàng tuần hoặc hàng tháng, đôi khi là hàng năm. Tỷ lệ tử vong là dưới 1 trên 1000, và người cao tuổi có nguy cơ tử vong cao nhất. Virut này được truyền vào cơ thể người bởi hai loài muỗi của chi Aedes: A. albopictus và A. aegypti. Động vật có thể mang virut này bao gồm khỉ, chim, gia súc, và các loài gặm nhấm. Điều này trái ngược với sốt xuất huyết dengue, chỉ có linh trưởng là vật chủ.

Cách tốt nhất để phòng ngừa sự lây nhiễm là kiểm soát muỗi và tránh để muỗi truyền bệnh đốt. Không có phương pháp điều trị cụ thể nào được biết đến, nhưng có thể dùng thuốc để giảm các triệu chứng. Nghỉ ngơi và uống nhiều nước cũng có thể hữu ích.

Thời gian ủ bệnh sốt chikungunya dao động từ hai đến mười hai ngày, thường là từ ba đến bảy ngày. Từ 72 đến 97% người bị nhiễm sẽ xuất hiện các triệu chứng. Các triệu chứng bao gồm sốt cao đột ngột, đôi khi sốt hai pha kéo dài từ vài ngày đến một tuần, đôi khi đến mười ngày, thường sốt trên 39°C (102°F) và đôi khi lên đến 41°C (104°F) và kèm theo đau khớp nhiều hoặc căng cứng cơ thường kéo dài hàng tuần hoặc hàng tháng thậm chí có trường hợp kéo dài hàng năm. Biểu hiện phát ban (thường là phát ban đỏ), đau cơ, nhức đầu, mệt mỏi, buồn nôn hoặc nôn có thể cũng xuất hiện. Có thể xuất hiện các chứng viêm mắt như bệnh viêm màng bồ đào, hoặc bệnh viêm niêm

mạc miệng, và có thể tổn thương võng mạc. Tựu chung lại, cơn sốt kéo dài trong vòng hai ngày và sau đó dứt đột ngột. Tuy nhiên, các triệu chứng như nhức đầu, mất ngủ và tình trạng kiệt sức kéo dài trong một khoảng thời gian khác nhau, thường là từ năm đến bảy ngày.

Các quan sát trong các vụ bùng phát dịch gần đây cho thấy sốt Chikungunya có thể gây ra các triệu chứng kéo dài sau lây nhiễm cấp tính. Trong đợt bùng phát dịch trên đảo La Reunion năm 2006, hơn 50% đối tượng trên 45 tuổi cho biết họ phải chịu cơn đau cơ xương khớp kéo dài và lên tới 60% trong số đó cho biết các cơn đau khớp kéo dài ba năm sau lần đầu lây nhiễm. Một nghiên cứu của Pháp về các ca lây nhiễm chỉ ra rằng 59% người bị mắc bệnh vẫn chịu chứng đau khớp sau hai năm kể từ khi lây nhiễm cấp tính. Tiếp đó là một vụ bùng phát dịch virut Chikungunya tại Ý, và 66% số người nhiễm có triệu chứng đau cơ, đau khớp, hoặc suy nhược trong vòng một năm sau khi lây nhiễm cấp tính. Các triệu chứng kéo dài không phải là một hiện tượng hoàn toàn mới; bệnh viêm khớp kéo dài đã xuất hiện sau đợt bùng phát dịch vào năm 1979. Các dấu hiệu dự báo các triệu chứng kéo dài có thể xuất hiện là tuổi cao và có tiền sử bệnh thấp khớp. Nguyên nhân gây ra các triệu chứng mãn tính này hiện chưa được hiểu biết một cách đầy đủ. Các dấu hiệu của bệnh tự miễn dịch hoặc thấp khớp không được tìm thấy ở những người mắc các triệu chứng mãn tính. Tuy nhiên, một vài bằng chứng từ người và mẫu động vật đã cho thấy sốt Chikungunya có thể gây ra các bệnh lây nhiễm mãn tính ở vật chủ. Kháng nguyên virut được phát hiện trong sinh thiết mẫu cơ của một người đang trong giai đoạn tái phát bệnh ba tháng sau lần đầu nhiễm bệnh. Ngoài ra, kháng nguyên virut và ARN đã được tìm thấy trong các đại thực bào hoạt dịch của một người trong thời kỳ tái phát của bệnh cơ xương khớp 18 tháng sau khi nhiễm bệnh lần đầu. Một vài mẫu thử ở động vật cũng đã cho thấy virut Chikungunya có thể gây ra sự lây nhiễm lâu dài. Ở chuột, ARN của virut được phát hiện chủ yếu trong các mô liên kết trong ít nhất 16 tuần sau khi tiêm, và có liên quan đến bệnh viêm màng hoạt dịch mãn tính. Tương tự, một nghiên cứu khác cũng đã phát hiện ra một gen báo cáo của virut trong mô khớp của chuột vài tuần sau khi tiêm. Ở mẫu inh trưởng không phải người, virut chikungunya đã được phát hiện tồn tại trong lá lách ít nhất sáu tuần.

Virut Chikungunya là loại alpha-virut có bộ gen ARN sợi đơn chiều dương dài khoảng 11,6kb. Đây là thành viên của chi virut Semliki Forest và liên quan chặt chẽ với virut Ross River, virut O'nyong'nyong và virut Semliki Forest. Ở Hoa Kỳ, nó được phân

loại là mầm bệnh loại C và khi nghiên cứu đòi hỏi các biện pháp phòng ngừa an toàn sinh học cấp III. Các tế bào biểu mô và nội mô của người, các nguyên bào sợi chính và các đại thực bào có nguồn gốc từ bạch cầu đơn nhân được phép tiếp xúc với virut chikungunya in vitro, và sự sao chép virut có khả năng gây bệnh tế bào rất cao nhưng lại dễ bị tổn thương với interferon loại I và II. In vivo, virut chikungunya có dấu hiệu sao chép tế bào trong các nguyên bào sợi, tế bào bào cơ cơ xương và các sợi cơ.

Virut Chikungunya là loại alpha-virut, giống như các virut gây ra bệnh viêm não ngựa miền đông và bệnh viêm não ngựa miền tây. Nói chung, Chikungunya lây truyền qua muỗi A. aegypti, nhưng các nghiên cứu gần đây của Viện Pasteur ở Paris đã chỉ ra rằng các chủng virut chikungunya trong đợt bùng phát dịch bệnh ở đảo Reunion năm 2005-2006 đã gây ra sự đột biến tạo điều kiện thuận lợi cho sự truyền nhiễm bởi muỗi vằn châu Á (A. albopictus).

Bệnh nhiễm virut Chikungunya qua muỗi A. albopictus bởi một đột biến điểm của một gen trong số các gen có màng bọc virut (E1). Khả năng lây truyền virut Chikungunya tăng do muỗi A. albopictus có thể làm tăng nguy cơ bùng phát dịch bệnh ở các khu vực khác, nơi có muỗi vằn châu Á. Đợt bùng phát dịch gần đây ở Ý có thể đã được phát tán bởi muỗi A. albopictus. Ở châu Phi, bệnh sốt chikungunya lây truyền trong một chu kỳ không đều, trong đó virut chủ yếu ký sinh bên trong các loài linh trưởng khác xen giữa các đợt bùng phát dịch ở người.

Khi bị nhiễm virut chikungunya, các nguyên bào sợi của vật chủ sản sinh ra interferon loại 1 (alpha và beta). Những con chuột thiếu hụt thụ thể interferon alpha sẽ chết trong 2-3 ngày kể từ khi tiếp xúc với 10^2 đơn vị gây hoại tử của virut chikungunya, trong khi chuột tự nhiên sống sót ngay cả khi tiếp xúc với 10^6 đơn vị gây hoại tử của virut này. Đồng thời, những con chuột thiếu hụt một phần (IFN α/β +/-) loại 1 bị ảnh hưởng nhẹ và trải qua các triệu chứng như suy nhược cơ và hôn mê. Partidos et al. (2011) đã cho thấy các kết quả tương tự với chủng virut giảm độc lực còn sống CHIKV181/25. Tuy nhiên, thay vì tử vong, những con chuột thiếu hụt interferon (IFN α/β -/-) loại 1 tạm thời bị liệt và những con chuột thiếu hụt một phần interferon loại 1 không gặp vấn đề gì.

Một vài nghiên cứu đã thử tìm ra các thành phần đầu nguồn của quá trình interferon loại 1 tham gia vào các phản ứng của vật chủ với sự lây nhiễm virut chikungunya. Cho đến nay, không ai biết được liệu mầm bệnh đặc hiệu chikungunya có

liên quan đến kiểu hình phân tử hay không. Tuy nhiên, IPS-1 còn được biết đến như là Cardif, MAVS, và VISA - đã được phát hiện ra là một yếu tố quan trọng. Trong năm 2011, White et al. phát hiện ra rằng sự can thiệp bằng IPS-1 làm giảm mức phosphoryl hóa của yếu tố điều hòa interferon 3 (IRF3) và sự sản sinh IFN-β. Các nghiên cứu khác đã phát hiện ra rằng IRF3 và IRF7 là thành phần quan trọng liên quan đến vấn đề tuổi lây nhiễm. Những con chuột trưởng thành thiếu hụt cả hai yếu tố điều hòa này sẽ tử vong khi bị nhiễm virut chikungunya. Mặt khác, trẻ sơ sinh sẽ không thể chống lại được virut nếu thiếu đi một trong các yếu tố này.

Chikungunya kháng lại phản ứng interferon loại 1 bằng cách sản sinh NS2, một protein không cấu trúc làm suy thoái RBP1 và vô hiệu hóa khả năng sao chép ADN của tế bào vật chủ. NS2 can thiệp vào quá trình truyền tín hiệu JAK-STAT và ngăn không cho STAT bị phosphoryl hóa.

Các thí nghiệm trong phòng thí nghiệm đối với virut chikungunya bao gồm phản ứng tổng hợp chuỗi theo thời gian thực, phân lập virut và xét nghiệm huyết thanh học. Việc phân lập virut cung cấp chẩn đoán chính xác nhất, nhưng mất từ một đến hai tuần để hoàn thành và phải được thực hiện trong các phòng thí nghiệm an toàn sinh học cấp III. Kỹ thuật này bao gồm việc cho các dòng tế bào cụ thể tiếp xúc với các mẫu thu được từ máu nguyên chất và xác định các phản ứng cụ thể của virut chikungunya. Phản ứng tổng hợp chuỗi theo thời gian thực sử dụng các cặp mồi lồng nhau được sử dụng để khuếch đại một vài gen cụ thể của virut chikungunya từ mẫu máu nguyên chất. Kết quả có thể được xác định trong thời gian từ một đến hai ngày.

Việc chẩn đoán huyết thanh cần một lượng máu lớn hơn các phương pháp khác và sử dụng xét nghiệm ELISA để đo lượng IgM đặc hiệu của virut chikungunya. Các kết quả cần hai đến ba ngày, và có khả năng dương tính giả với sự lây nhiễm của các virut liên quan khác, như virut o'nyong'nyong và virut Semliki Forest.

Việc chẩn đoán phân biệt có thể bao gồm sự lây nhiễm các loại virut khác gây ra bởi muỗi, như sốt xuất huyết dengue và cúm. Bệnh đặc hiệu viêm đa khớp mãn tính xảy ra ở ít nhất 20% bệnh nhân mắc chikungunya một năm sau khi lây nhiễm, trong khi đó các triệu chứng như vậy thường không thấy ở bệnh sốt xuất huyết dengue.

Hiện tại, chưa có phương pháp điều trị bệnh cụ thể. Các phương pháp có thể làm thuyên giảm các triệu chứng bao gồm việc sử dụng thuốc trị viêm không steroid (Nonsteroid Antiflamtory Drug – NSAID) như naproxen hoặc paraxetamol

(axetaminophen) và các dung dịch. Aspirin không được khuyến cáo sử dụng. Các ca bị viêm khớp hơn 2 tuần có thể sử dụng ribavirin. Ảnh hưởng của cloroquine là không rõ ràng. Thuốc này dường như không giúp chữa bệnh cấp tính, nhưng các bằng chứng tạm thời cho thấy thuốc này có thể giúp giảm triệu chứng viêm khớp mãn tính. Tương tự, Steroid cũng không hữu ích.

Chikungunya chủ yếu xuất hiện ở các nước đang phát triển. Về dịch tễ học, chikungunya liên quan đến loài muỗi, môi trường của chúng và hành vi của con người. Sự thích ứng của muỗi với sự thay đổi về khí hậu của Bắc Phi khoảng 5.000 năm trước khiến chúng phải tìm ra môi trường nơi con người trữ nước. Môi trường sống của người và môi trường của muỗi sau đó đã liên kết chặt chẽ với nhau. Trong thời gian bùng phát dịch bệnh, con người là vật chủ mang virut. Trong các thời điểm khác, khỉ, chim và động vật có xương sống khác trở thành vật chủ mang bệnh.

Ba kiểu gen đã được mô tả của virut này là: kiểu gen của Tây Phi, Đông/Trung/Nam Phi và Châu Á. Dịch bệnh bùng nổ ở Ấn Độ Dương vào năm 2005 và quần đảo Thái Bình Dương vào năm 2011, cũng như hiện tại ở Hoa Kỳ, biến chủng sẽ tiếp tục thay đổi sự phân bố các kiểu gen.

Vào ngày 28 tháng 5 năm 2009 tại Changwat Trang, Thái Lan, nơi mà virut này là đặc hữu, bệnh viện tỉnh đã quyết định sinh mổ lấy thai nhi nam từ người mẹ nhiễm virut chikungunya, Khwanruethai Sutmueang, 28 tuổi, người bản xứ Trang, để ngăn ngừa virut truyền từ bào thai mẹ sang thai nhi. Tuy nhiên, sau khi sinh mổ, các bác sĩ phát hiện ra bé trai đã bị nhiễm virut từ trước, và đưa em bé vào phòng chăm sóc đặc biệt vì virut đã khiến cho em bé không thể tự thở hoặc bú sữa. Các bác sĩ cho rằng virut có thể đã lây từ mẹ sang thai nhi, nhưng không có xác nhận từ phòng thí nghiệm.

Vào tháng 12 năm 2013, virut chikungunya đã được xác nhận xuất hiện trên đảo Saint Martin ở Caribe với 66 ca dương tính và số ca nghi ngờ rơi vào khoảng 181 ca. Đây là đợt bùng phát dịch đầu tiên ở Tây bán cầu mà dịch bệnh lây bệnh sang người từ quần thể muỗi đã bị nhiễm virut. Vào tháng 1 năm 2014, Cơ quan Y tế Công cộng của Canada thông báo xuất hiện các ca nhiễm trên Quần đảo Virgin thuộc Anh, Saint-Barthélemy, Guadeloupe, Dominica, Martinique và Guyana thuộc Pháp. Vào tháng 4 năm 2014, virut Chikungunya cũng đã xuất hiện ở Cộng hòa Dominica, xác nhận bởi Trung tâm Kiểm soát và Phòng ngừa dịch bệnh (CDC). Cho đến cuối tháng 4, virut đã lan rộng đến 14

quốc gia, kể cả Jamaica, St. Lucia, St. Kitts và Nevis, và Haiti, nơi tuyên bố virut trở thành đại dịch.

Vào cuối tháng 5 năm 2014, có hơn 10 ca lây nhiễm virut ở nước ngoài vào Hoa Kỳ đã di chuyển đến Florida từ các khu vực nơi mà virut này là đặc hữu. Các chủng chikungunya dễ lây lan nhất đến Hoa Kỳ từ vùng biển Caribe là từ muỗi A. aegypti. Nhiều người lo ngại rằng chủng virut chikungunya này có khả năng đột biến làm cho vật chủ trung gianloài côn trùng lây bệnh là muỗi A. albopictus lây nhiễm mạnh hơn. Nếu đột biến này xảy ra, virut chikungunya sẽ là một mối quan ngại đối với sức khoẻ cộng đồng tại Hoa Kỳ vì muỗi A. albopictus hay muỗi vằn châu Á rất phổ biến ở đây và hoạt động mạnh hơn muỗi A. aegypti.

Vào tháng 6 năm 2014, sáu ca mắc virut đã được xác nhận ở Brazil, hai ca ở thành phố Campinas thuộc bang São Paulo. Sáu ca trên là các binh lính của quân đội Brazil vừa trở về từ Haiti, nơi họ tham gia vào các nỗ lực giúp tái thiết với tư cách là thành viên của Lực lượng gìn giữ hòa bình của Liên Hợp Quốc tại Haiti. Thông tin này được chính thức thông báo bởi chính quyền Campinas mà họ cho rằng đã có các hành động thích hợp.

Vào ngày 16 tháng 6 năm 2014, Florida đã có tổng cộng 42 ca nhiễm virut. Tính đến ngày 11 tháng 9 năm 2014, số ca đã được xác nhận ở Puerto Rico trong năm là 1636. Đến ngày 28 tháng 10, con số này đã tăng lên 2974 ca với hơn 10000 ca nghi nhiễm. Vào ngày 17 tháng 6 năm 2014, các quan chức của Bộ Y tế tiểu bang Mississippi của Hoa Kỳ đã xác nhận rằng họ đang điều tra khả năng xuất hiện ca mắc đầu tiên ở một người dân Mississippi gần đây đã đến Haiti. Vào ngày 19 tháng 6 năm 2014, virut này đã lây lan sang bang Georgia, Hoa Kỳ. Vào ngày 24 tháng 6 năm 2014, một ca đã được xác nhận tại Poinciana, quận Polk, Florida, Hoa Kỳ. Vào ngày 25 tháng 6 năm 2014, Bộ Y tế của bang Arkansas Hoa Kỳ đã xác nhận rằng một người từ tiểu bang đang mang virut chikungunya. Vào ngày 26 tháng 6 năm 2014, một ca mắc xuất hiện tại bang Jalisco của Mexico.

Vào ngày 17 tháng 7 năm 2014, ca mắc chikungunya đầu tiên được phát hiện tại Hoa Kỳ được báo cáo từ bang Florida bởi Trung tâm Kiểm soát và Phòng ngừa dịch bệnh. Từ năm 2006, hơn 200 ca mắc đã được thông báo ở Hoa Kỳ, nhưng chỉ thuộc nhóm người đã đi du lịch trở về từ các nước khác. Đây là lần đầu tiên virut lây truyền từ muỗi sang người tại lục địa Hoa Kỳ. Vào ngày 2 tháng 9 năm 2014, Trung tâm Kiểm

soát và Phòng ngừa dịch bệnh thông báo đã có 7 ca mắc chikungunya được xác nhận tại Hoa Kỳ trong số các ca mắc bệnh tại địa phương.

Vào ngày 25 tháng 9 năm 2014, chính quyền ở El Salvador đã thông báo trên 30.000 ca nhiễm dịch bênh mới này. Dịch bệnh mới này cũng đang gia tăng ở Jamaica và Barbados. Nguy cơ cao là khách du lịch tại các nước này có thể mang virut gây bệnh về các quốc gia của họ. Tháng 11 năm 2014: Brazil có một ca lây nhiễm tại địa phương của một chủng khác (kiểu gen) của virut chikungunya chưa từng được ghi nhận ở châu Mỹ. Đây là kiểu gen từ châu Phi, nhưng kỳ lạ là không ai giải thích được đó là kiểu Nam Phi hay Tây Phi. Kiểu gen mới (ở châu Mỹ) nghiêm trọng hơn so với kiểu gen châu Á hiện đang lan rộng qua châu Mỹ, và miễn dịch với một kiểu gen không có nghĩa là miễn dịch đối với các kiểu gen khác. Vùng Polynesia thuộc Pháp là một trong số các khu vực khác đang chịu ảnh hưởng của dịch bệnh.

Vào ngày 7 tháng 11 năm 2014, Mexico thông báo một vụ bùng phát dịch chikungunya, ghi nhận lây nhiễm trong địa phương, ở bang Chiapas, miền nam Mexico. Dịch bệnh này lan rộng qua bờ biển từ biên giới Guatemala sang tiểu bang lân cận Oaxaca. Các cơ quan y tế đã thông báo tổng số 39 trường hợp đã được xác nhận trong phòng thí nghiệm (vào cuối tuần thứ 48). Không có trường hợp nghi nhiễm nào được thông báo. Vào tháng 1 năm 2015, có 90.481 ca mắc chikungunya đã được báo cáo ở Colombia.

II. Các kháng thể đơn dòng và phương pháp tạo ra chúng

A. Các phương pháp chung

Cần phải hiểu rằng các kháng thể đơn dòng liên kết với virut Chikungunya có một vài ứng dụng. Chúng bao gồm sản xuất bộ kit chẩn đoán dùng trong phát hiện và chẩn đoán nhiễm virut Chikungunya, cũng như điều trị bệnh này. Trong bối cảnh như vậy, chuyên gia có thể liên kết các kháng thể đó với các tác nhân chẩn đoán hoặc điều trị bệnh, sử dụng chúng làm các tác nhân bắt giữ hoặc các tác nhân cạnh tranh trong các xét nghiệm cạnh tranh hoặc sử dụng chúng riêng biệt mà không cần các tác nhân bổ sung được gắn vào chúng. Các kháng thể này có thể bị đột biến hoặc biến đổi, như được đề cập thêm dưới đây. Các phương pháp điều chế và xác định đặc điểm các kháng thể

được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực này (xem, ví dụ, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988, U.S. Patent 4.196.265).

Các phương pháp tạo ra các kháng thể đơn dòng (các MAb) nói chung bắt đầu theo cơ sở tương tự với các phương pháp tạo ra kháng thể đa dòng. Bước đầu tiên cho cả hai phương pháp trên là tạo miễn dịch cho một vật chủ thích hợp hoặc xác định các đối tượng miễn dịch do lây nhiễm tự nhiên trước đó. Như được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực kỹ thuật này, thành phần nhất định để tạo miễn dịch có thể thay đổi theo khả năng tạo miễn dịch của nó. Vì vậy, cần tăng cường hệ miễn dịch của vật chủ, có thể đạt được bằng cách ghép một peptit hoặc polypeptit miễn dịch với chất vận chuyển. Các chất vận chuyển điển hình và được ưu tiên là kháng nguyên protein miễn dịchcủa loài ốc biển keyhole limpet (keyhole limpet hemocyanin KLH) và albumin trong huyết thanh bò (bovine serum albumin BSA). Các albumin khác như ovalbumin, albumin trong huyết thanh chuột hoặc albumin trong huyết thanh thỏ cũng có thể được sử dụng làm các chất vận chuyển. Các phương tiện để ghép polypeptit với một protein vận chuyển được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực kỹ thuật này bao gồm glutaranđehyt, m-maleimidobencoyl-N-hydroxysucxinimit este, cacbodiimyt và benzidin bis-biazotiz hóa. Như cũng được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực kỹ thuật này, khả năng tạo miễn dịch của một thành phần miễn dịch cụ thể có thể được tăng cường bằng cách sử dụng các chất kích thích không đặc hiệu của phản ứng miễn dịch, được gọi là các tá dược. Các tá dược điển hình và được ưu tiên bao gồm tá dược Freund hoàn chỉnh (chất kích thích không đặc hiệu của phản ứng miễn dịch chứa vi khuẩn lao Mycobacterium đã chết), các tá dược Freund không hoàn chỉnh và tá dược nhôm hydroxyt.

Lượng chất sinh miễn dịch dùng trong sản xuất các kháng thể đa dòng tùy thuộc vào bản chất của chất sinh miễn dịch cũng như loài động vật được sử dụng để tạo miễn dịch. Có nhiều con đường có thể được sử dụng để tiêm các chất sinh miên dịch (tiêm dưới da, tiêm bắp, tiêm vào tĩnh mạch, trong tĩnh mạch và tiêm dưới bụng). Việc sản xuất các kháng thể đa dòng có thể được giám sát bằng cách lấy mẫu máu của động vật đã được tạo miễn dịch tại các thời điểm sau khi tạo miễn dịch. Việc tiêm lặp chuẩn lần hai cũng có thể được sử dụng. Quá trình lặp chuẩn và chuẩn hóa được lặp lại cho đến khi đạt được chuẩn độ phù hợp. Khi đạt được một mức độ tạo miễn dịch mong muốn, động vật đã được tạo miễn dịch có thể được lấy máu và huyết thanh sau đó được phân lập và cất giữ, và/hoặc động vật có thể được sử dụng để tạo ra các MAb.

Sau khi tạo miễn dịch, các tế bào soma có khả năng sản sinh các kháng thể, đặc biệt là các bạch huyết bào B (các tế bào B), được lựa chọn để sử dụng trong quy trình tạo MAb. Các tế bào này có thể được lấy từ lá lách sinh thiết hoặc hạch bạch huyết, hoặc từ máu lưu thông. Các bạch huyết bào B sản sinh ra kháng thể từ động vật đã được miễn dịch sau đó được dung hợp với các tế bào của tế bào u tủy bất tử, nói chung là một trong số các loài tương tự như động vật được tạo miễn dịch hoặc người hoặc các tế bào thể khảm ở người và/hoặc ở chuột. Tốt hơn là, các dòng tế bào u tủy phù hợp để sử dụng trong các quy trình dung hợp tạo tế bào lai không tạo kháng thể, có hiệu quả dung hợp cao và các sự thiếu hụt enzym khiến chúng không thể phát triển trong các môi trường chọn lọc nhất định mà hỗ trợ sự phát triển của chỉ các tế bào đã được dung hợp mong muốn (các tế bào lai). Tế bào bất kỳ trong số các tế bào U tủy có thể được sử dụng, là được biết đến đối với các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này (Goding, trang 65-66, 1986, Campbell, trang 75-83, 1984).

Các phương pháp tạo ra các tế bào lai của các tế bào lá lách sản sinh kháng thể hoặc các tế bào hạch bạch huyết và các tế bào u tủy thường bao gồm bước trộn các tế bào soma với các tế bào u tủy theo tỷ lệ 2:1, mặc dù tỷ lệ này có thể thay đổi trong khoảng từ 20:1 đến 1:1, khi có mặt một hoặc nhiều tác nhân (hóa học hoặc điện) thúc đẩy sự dung hợp màng tế bào. Các phương pháp dung hợp này sử dụng virut Sendai đã được mô tả bởi Kohler và Milstein (1975, 1976), và các phương pháp đó sử dụng polyetylen glycol (PEG), ví dụ, 37% (tỷ lệ thể tích v/v) PEG, bởi Gefter et al.(1997). Việc sử dụng các phương pháp dung hợp bằng điện cũng là rất phù hợp (Goding, trang 71-74, 1986). Các quy trình dung hợp thường tạo ra các tế bào lai có thể tồn tại ở tần số thấp, khoảng từ 1×10^{-6} đến 1×10^{-8}. Tuy nhiên, điều này không gây ra vấn đề vì các tế bào lai đã được dung hợp và có thể tồn tại được khác với các tế bào mẹ, đã dung hợp (cụ thể là các tế bào u tủy đã được dung hợp mà sẽ tiếp tục phân chia vô hạn) bằng cách nuôi cấy trong môi trường chọn lọc. Môi trường chọn lọc nói chung là một môi trường chứa một tác nhân ngăn chặn sự tổng hợp mới các nucleotit trong các môi trường nuôi cấy mô. Các tác nhân điển hình và được ưu tiên là aminopterin, methotrexat, và azaserin. Aminopterin và methotrexat ngăn chặn sự tổng hợp mới cả các purin và các pyrimidin, trong khi nazasin chỉ ngăn chặn sự tổng hợp purin. Nếu sử dụng aminopterin hoặc methotrexat, các môi trường này được bổ sung hypoxanthin và thymidin làm một nguồn nucleotit (môi trường HAT). Nếu sử dụng azaserin, các môi

trường này được bổ sung hypoxanthin. Ouabain được bổ sung vào nếu nguồn tế bào B là dòng tế bào B ở người đã được biến nạp bởi virut Epstein Barr (EBV), để loại bỏ các dòng đã được biến nạp bởi EBV mà chưa dung hợp với tế bào u tủy.

Môi trường được chọn lọc được ưu tiên là HAT hoặc HAT với ouabain. Chỉ các tế bào có khả năng vận hành các quá trình bảo tồn nucleotit có thể sống sót trong môi trường HAT. Các tế bào u tủy có khiếm khuyết các enzym quan trọng trong quá trình bảo tồn này, ví dụ, hypoxanthin photphoribosyl transferaza (HPRT), và chúng không thể sống sót. Các tế bào B có thể vận hành quy trình này, nhưng chúng có tuổi thọ hạn chế trong nuôi cấy và thường chết trong vòng hai tuần. Do đó, các tế bào duy nhất có thể sống sót trong môi trường chọn lọc là các tế bào lai đã được tạo ra từ các tế bào u tủy và các tế bào B. Nếu nguồn các tế bào B được sử dụng để dung hợp là một dòng các tế bào B đã bị biến nạp bởi EBV, như ở đây, ouabain cũng có thể được sử dụng để lựa chọn thuốc cho các tế bào lai vì các tế bào B đã bị biến nạp bởi EBV dễ bị giết chết do thuốc, trong khi tế bào u tủy đã sử dụng được chọn để kháng lại ouabain.

Việc nuôi cấy tạo ra một quần thể tế bào lai, từ đó các tế bào lai đặc hiệu được lựa chọn ra. Nói chung, việc lựa chọn các tế bào lai được thực hiện bằng cách nuôi cấy các tế bào bằng cách pha loãng tác dòng đơn trong các đĩa vi chuẩn độ, tiếp theo bằng cách xét nghiệm các dịch nổi trên bề mặt tác dòng riêng biệt (sau khoảng thời gian từ hai đến ba tuần) để có được độ phản ứng mong muốn. Xét nghiệm cần có sự chính xác, đơn giản và nhanh chóng, như xét nghiệm phóng xạ, xét nghiệm miễn dịch enzym, xét nghiệm độc tế bào, xét nghiệm mảng, xét nghiệm liên kết miễn dịch điểm, và các xét nghiệm tương tự. Các tế bào lai được chọn sau đó được pha loãng lần lượt hoặc được phân loại đơn bào bằng phân loại tế bào học dòng chảy và tách dòng vào các dòng tế bào sản sinh kháng thể riêng biệt, sau đó các tách dòng có thể được nhân giống vô hạn để tạo ra các mAb. Các dòng tế bào này có thể được khai thác để sản xuất MAb theo hai cách cơ bản. Một mẫu tế bào lai có thể được tiêm (thường vào khoang màng bụng) vào động vật (ví dụ, chuột). Tuỳ ý, các động vật được cho ăn thức ăn chứa hydrocacbon, đặc biệt là dầu như pristan (tetrametylpentadecan) trước khi tiêm. Khi tế bào lai ở người được sử dụng theo cách này, tuỳ ý tiêm cho các con chuột bị suy giảm miễn dịch, như các con chuột SCID, để ngăn chặn sự thải bỏ khối u. Con vật đã được tiêm sẽ phát triển các khối u tiết ra kháng thể đơn dòng đặc hiệu được sản sinh bởi tế bào lai đã được dung hợp. Các dịch thể của động vật đã được tiêm, như huyết thanh hoặc dịch cổ trướng, sau

đó có thể được chích ra để thu được các MAb với nồng độ cao. Các dòng tế bào riêng biệt cũng có thể được nuôi cấy in vitro, nếu các MAb được tiết ra một cách tự nhiên vào trong môi trường nuôi cấy từ đó chúng có thể thu được dễ dàng với nồng độ cao. Theo cách khác, các dòng tế bào lai ở người có thể được sử dụng in vitro để tạo ra globulin miễn dịch trong dịch nổi trên bề mặt tế bào. Các dòng tế bào có này thể thích ứng để sinh trưởng trong môi trường không có huyết thanh để tối ưu hóa khả năng phục hồi các globulin miễn dịch đơn dòng ở người có độ tinh khiết cao.

Các MAb đã được tạo ra bằng cả hai phương pháp có thể được tinh chế thêm, nếu muốn, bằng cách sử dụng phương pháp lọc, ly tâm và các phương pháp sắc ký khác nhau như FPLC hoặc sắc ký ái lực. Các mảnh của các kháng thể đơn dòng của sáng chế có thể thu được từ các kháng thể đơn dòng đã được tinh chế bằng các phương pháp bao gồm, phương pháp phân giải enzym, như pepsin hoặc papain, và/hoặc bằng cách phân cắt các liên kết disulfua bằng cách khử hóa học. Theo cách khác, các mảnh kháng thể đơn dòng của sáng chế có thể được tổng hợp bằng cách sử dụng một máy tổng hợp peptit tự động.

Phương pháp tách dòng phân tử có thể được sử dụng để tạo ra các đơn dòng. Đối với phương pháp này, ARN có thể được phân lập từ dòng tế bào lai và các gen kháng thể thu được bởi phản ứng tổng hợp chuỗi theo thời gian thực và được tách dòng vào vật chủ trung gian biểu hiện globulin miễn dịch. Theo cách khác, các nhóm phagemid globulin miễn dịch tổ hợp được điều chế từ ARN được phân lập từ các dòng tế bào và các phagemid biểu hiện các kháng thể thích hợp được chọn lọc bằng cách đãi bằng cách sử dụng các kháng nguyên virut. Ưu điểm của phương pháp này đối với các kỹ thuật tế bào lai thông thường là nhiều hơn khoảng hơn 10^4 lần lượng kháng thể có thể được sản xuất và sàng lọc trong một mẻ duy nhất, và các đặc tính mới được tạo ra bởi sự kết hợp chuỗi H và L làm tăng thêm khả năng tìm thấy các kháng thể thích hợp.

Các patent Hoa Kỳ khác, được viện dẫn vào đây, có phương pháp sản xuất các kháng thể hữu ích đối với sáng chế này bao gồm U.S. Patent 5.565.332, trong đó mô tả việc sản xuất các kháng thể khảm bằng cách sử dụng phương pháp tổ hợp; U.S. Patent 4.816.567 mô tả việc điều chế globulin miễn dịch tái tổ hợp; và U.S. Patent 4.867.973, trong đó mô tả các thể liên hợp kháng thể-tác nhân điều trị bệnh.

B. Các kháng thể theo Sáng chế

Các kháng thể theo sáng chế có thể được xác định, trong trường hợp thứ nhất, theo tính đặc hiệu liên kết của chúng, trong trường hợp này là đối với glycoprotein (GP) của virut Chikungunya. Các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này, bằng cách đánh giá tính đặc hiệu/ái lực liên kết của một kháng thể nhất định bằng cách sử dụng các kỹ thuật được biết đến rộng rãi với họ, có thể xác định ngay xem liệu các kháng thể đó có thuộc phạm vi của các điểm yêu cầu bảo hộ không. Theo một khía cạnh, một số kháng thể đơn dòng đã được tạo ra có CDR bắt cặp theo dòng từ các chuỗi nặng và nhẹ lần lượt được minh họa trong bảng 3 và 4. Các kháng thể như vậy có thể được tạo ra bởi các dòng tế bào được đề cập dưới đây trong phần các ví dụ thực hiện sáng chế bằng cách sử dụng các phương pháp được mô tả ở đây.

Theo khía cạnh thứ hai, các kháng thể này có thể được xác định bằng trình tự biến đổi của chúng, bao gồm các vùng "khung" bổ sung. Các vùng này được đưa ra trong bảng 1 và 2 được mã hoá hoặc là các vùng biến đổi đầy đủ. Hơn nữa, các trình tự của các kháng thể có thể thay đổi so với các trình tự này, tùy ý bằng cách sử dụng các phương pháp được đề cập chi tiết hơn dưới đây. Ví dụ, các trình tự axit nucleic có thể thay đổi so với các trình tự nêu trên ở (a) các vùng biến đổi có thể được tách ra khỏi các miền hằng định của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, (b) các axit nucleic có thể thay đổi so với các trình tự nêu trên mà không ảnh hưởng đến các phần dư được mã hoá, (c) axit nucleic có thể thay đổi so với các trình tự trên theo tỷ lệ phần trăm nhất định, ví dụ, mức độ đồng nhất là 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99%, (d) các axit nucleic có thể thay đổi so với các trình tự trên nhờ khả năng lai tạo trong các điều kiện có độ chính xác cao, ví dụ, các điều kiện ít muối và/hoặc nhiệt độ cao, như được tạo ra bởi NaCl có nồng độ nằm trong khoảng từ 0,02 M đến 0,15 M ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 50°C đến 70°C, (e) các axit amin có thể thay đổi so với các trình tự nêu trên theo tỷ lệ phần trăm nhất định, ví dụ, mức độ đồng nhất là 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99%, hoặc (f) các axit amin có thể thay đổi so với các trình tự trên bằng cách cho phép sự thế bảo toàn (được đề cập dưới đây). Mỗi trong số các áp dụng đã được đề cập trên đây đối với các trình tự axit nucleic được trình bày trong bảng 1 và các trình tự axit amin được trình bày trong bảng 2.

C. Thiết kế các trình tự của kháng thể

Theo các phương án khác nhau, có thể chọn để thiết kế các trình tự của các kháng thể xác định vì nhiều lý do khác nhau, như cải thiện mức độ biểu hiện, cải thiện tính phản ứng chéo hoặc giảm mức độ liên kết mục tiêu. Dưới đây là sự đề cập chung về các kỹ thuật có liên quan trong việc thiết kế kháng thể.

Các tế bào lai có thể được nuôi cấy, sau đó các tế bào được phân giải, và chiết xuất toàn bộ ARN. Các sản phẩm chuyển nhiễm ngẫu nhiên có thể được sử dụng với thời gian thực để tạo ra các bản sao cADN của ARN, và sau đó phản ứng tổng hợp chuỗi được thực hiện bằng cách sử dụng một hỗn hợp của các phản ứng tổng hợp chuỗi đoạn mồi có khả năng khuếch đại tất cả các trình tự gen biến đổi ở người. Sản phẩm phản ứng tổng hợp chuỗi có thể được tách dòng thành vectơ pGEM-T Easy, sau đó được giải trình tự bằng cách giải trình tự ADN tự động có sử dụng các đoạn mồi chuẩn vật chủ trung gian. Xét nghiệm liên kết và trung hòa có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các kháng thể thu được từ các dịch nổi trên bề mặt chứa tế bào lai và được làm sạch bằng FPLC bằng bằng sử dụng các cột Protein G.

Các kháng thể IgG tái tổ hợp có chiều dài đầy đủ được tạo ra bằng cách tái tách dòng các ADN Fv của chuỗi nặng và nhẹ từ vật chủ trung gian tách dòng vào một vật chủ trung gian plasmit IgG, được chuyển nhiễm vào các tế bào tự do 293 hoặc các tế bào CHO, và các kháng thể được thu hồi và làm sạch từ dịch nổi trên bề mặt chứa tế bào 293 hoặc tế bào CHO.

Việc liên tục sẵn có kháng thể đã được tạo ra trong cùng một tế bào chủ và quá trình nuôi cấy tế bào từ quá trình sản xuất cGMP cuối cùng có tiềm năng làm giảm thời gian của các quy trình phát triển. Lonza đã phát triển một phương pháp chung sử dụng các sản phẩm chuyển nhiễm nuôi trong môi trường CDACF, để nhanh chóng tạo ra các lượng nhỏ (tối đa 50g) các các kháng thể trong các tế bào CHO. Mặc dù chậm hơn một chút so với hệ thống tạm thời thực, các ưu điểm bao gồm nồng độ sản phẩm cao hơn và sử dụng cùng một vật chủ và quy trình như sản xuất dòng tế bào. Ví dụ về sự sinh trưởng và năng suất của hỗn lượng GS-CHO, biểu hiện ở một mô hình kháng thể, trong một máy phản ứng sinh học dùng một lần: trong môi trường nuôi cấy túi phản ứng sinh học dùng một lần (thể tích làm việc 5L) vận hành ở chế độ làm theo từng mẻ, đã đạt được nồng độ kháng thể 2 g/L trong vòng 9 tuần sau khi được chuyển nhiễm.

Các phân tử kháng thể sẽ chứa các mảnh (như F(ab'), F $(ab')_2$) được tạo ra, ví dụ, do sự phân cắt phân giải protein của các mAb, hoặc các globulin miễn dịch chuỗi đơn

có thể tổng hợp được, ví dụ, bằng phương pháp tái tổ hợp. Các dẫn xuất kháng thể như vậy là đơn trị. Theo một phương án, các mảnh này có thể được kết hợp với nhau, hoặc với các mảnh kháng thể khác hoặc các phối tử của thụ thể để tạo ra các phân tử liên kết "khảm". Điều quan trọng là, các phân tử khảm có thể chứa các nhóm thế có khả năng liên kết với các epitop khác nhau của cùng một phân tử.

Theo các phương án có liên quan, kháng thể này là dẫn xuất của các kháng thể đã được bộc lộ, ví dụ, một kháng thể chứa các trình tự CDR tương đồng với các kháng thể đã được bộc lộ (ví dụ, một kháng thể khảm hoặc kháng thể ghép mô CDR). Theo cách khác, chuyên gia có thể muốn sửa đổi, như đưa các thay đổi bảo toàn vào một phân tử kháng thể. Khi thực hiện các thay đổi như vậy, chỉ số thủy liệu pháp của các axit amin có thể cần được xem xét. Điều quan trọng của chỉ số thủy liệu pháp của axit amin trong việc tạo ra chức năng sinh học tương tác trên một protein thường đã được hiểu rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này (Kyte và Doolittle, 1982). Đặc điểm thủy liệu pháp tương đối của axit amin được chấp nhận góp phần vào cấu trúc bậc hai của protein thu được, từ đó xác định sự tương tác giữa protein với các phân tử khác, ví dụ, các enzym, các chất nền, các thụ thể, ADN, các kháng thể, các kháng nguyên, và các phân tử tương tự.

Trong lĩnh vực kỹ thuật này cũng cần phải hiểu rằng sự thế các axit amin tương tự có thể được thực hiện theo cách có hiệu quả trên cơ sở tính ưa nước. U.S. Patent 4.554.101, được viện dẫn ở đây, đã chỉ ra rằng độ ưa nước trung bình cục bộ lớn nhất của một protein, được chi phối bởi tính ưa nước của các axit amin liền kề của nó, có liên hệ mật thiết với đặc tính sinh học của protein. Như đã nêu một cách chi tiết trong U.S. Patent 4.554.101, các trị số ưa nước nêu dưới đây được gán cho các gốc axit amin: các axit amin có tính bazơ: arginin (+3,0), lysin (+3,0) và histidin (-0,5); các axit amin có tính axit: aspartat (+3,0 ± 1), glutamat (+3,0 ± 1), asparagin (+0,2), và glutamin (+0,2); các axit amin không ion, ưa nước: serin (+0,3), asparagin (+0,2), glutamin (+0,2), và threonin (-0,4), các axit amin chứa lưu huỳnh: xystein (-1,0) và methionin (-1,3); các axit amin không thơm, kỵ nước: valin (-1,5), leuxin (-1,8), isoleuxin (-1,8), prolin (-0,5 ± 1), alanin (-0,5), và glyxin (0); các axit amin thơm, kỵ nước: tryptophan (-3,4), phenylalanin (-2,5), và tyrosin (-2,3).

Cần phải hiểu rằng một axit amin có thể được thay thế cho một axit amin khác có tính ưa nước tương tự và tạo ra một protein được thay đổi về mặt sinh học hoặc miễn dịch học. Trong các thay đổi như vậy, sự thay thế của các axit amin có trị số ưa nước

trong khoảng ± 2 được ưu tiên, các axit amin có trị số ưa nước trong khoảng ± 1 được đặc biệt ưu tiên, và các axit amin có trị số ưa nước trong khoảng ± 0,5 còn được đặc biệt ưu tiên hơn nữa.

Như đã được trình bày trên đây, các sự thế axit amin dựa trên sự đồng nhất tương đối của các nhóm thế chuỗi bên của axit amin, ví dụ, tính kỵ nước, tính ưa nước, sự tích điện, kích thước, và các tính chất tương tự. Các sự thế điển hình mà có nhắc đến các đặc điểm khác nhau nêu trên được biết đến rộng rãi đối với các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm: arginin và lysin; glutamat và aspartat; serin và threonin; glutamin và asparagin; và valin, leuxin và isoleuxin.

Sáng chế cũng dựa trên kế hoạch sửa đổi kiểu tương đương. Bằng cách cải biến vùng Fc để có một kiểu tương đương khác, có thể có được các chức năng khác nhau. Ví dụ, việc thay đổi thành IgG1 có thể làm tăng tính độc tế bào phụ thuộc vào kháng thể, khi chuyển sang nhóm A có thể cải thiện sự phân bố mô, và việc chuyển sang lớp M có thể cải thiện hóa trị.

Các kháng thể đã được cải biến có thể được tạo ra bằng kỹ thuật bất kỳ đã biết đối với các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm biểu hiện thông qua các kỹ thuật sinh học phân tử chuẩn, hoặc tổng hợp hóa học các polypeptit. Các phương pháp biểu hiện tái tổ hợp được đề cập trong các phần khác trong bản mô tả này.

D. Các kháng thể chuỗi đơn

Mảnh biến đổi chuỗi đơn (ScFv) là một thể dung hợp của các vùng biến đổi của các chuỗi nặng và nhẹ của các globulin miễn dịch, được liên kết cùng với một phân tử liên kết ngắn (thường là serin, glyxin). Phân tử khảm này vẫn duy trì được tính đặc hiệu của globulin miễn dịch ban đầu, mặc dù đã loại bỏ các vùng hằng định và đưa phân tử liên kết peptit vào. Sự cải biến này thường giữ cho tính đặc hiệu không thay đổi. Các phân tử này đã được tạo ra trước đây để tạo thuận lợi biểu hiện thể thực khuẩn ở nơi rất thuận tiện để biểu hiện miền liên kết kháng nguyên của kháng thể như một peptit đơn. Theo cách khác, scFv có thể được tạo ra trực tiếp từ các chuỗi nặng và nhẹ đã được tái tách dòng thu được từ một tế bào lai. Các mảnh biến đổi chuỗi đơn không có vùng hằng định Fc được tìm thấy trong các phân tử kháng thể hoàn chỉnh, và vì thế, các vị trí liên kết thông thường (ví dụ, protein A/G) được sử dụng để tinh chế các kháng thể. Các mảnh này thường có thể được tinh chế/cố định bằng cách sử dụng Protein L vì Protein L tương tác với vùng biến đổi của các chuỗi nhẹ kappa.

Các phân tử liên kết linh hoạt nói chung bao gồm các phần dư axit amin thúc đẩy sự xoắn và sự xoay vòng như alain, serin và glyxin. Tuy nhiên, các phần dư khác cũng có thể có chức năng như vậy. Tang et al. (1996) đã sử dụng kỹ thuật biểu hiện trên thể thực khuẩn như một phương pháp nhanh chóng lựa chọn các phân tử liên kết tùy chỉnh đối với các kháng thể chuỗi đơn (scFvs) từ các nhóm liên kết protein. Một nhóm liên kết ngẫu nhiên đã được tạo ra, trong đó các gen dùng cho các miền biến đổi của chuỗi nặng và nhẹ đã được liên kết bởi một phân đoạn mã hoá một polypeptit có 18-axit amin của thành phần biến đổi. Danh mục scFv (khoảng 5 x 10^6 bộ phận khác nhau) đã được biểu hiện trên thể thực khuẩn dạng sợi và tùy thuộc vào sự lựa chọn ái lực với hapten. Số lượng của các biến thể được lựa chọn đã có sự gia tăng đáng kể trong hoạt động liên kết nhưng vẫn giữ được sự đa dạng trình tự đáng kể. Việc sàng lọc 1054 biến thể riêng biệt nhờ đó thu được một scFv hoạt tính xúc tác mà đã được tạo ra có hiệu quả ở dạng hòa tan. Việc phân tích trình tự cho thấy một prolin bảo toàn trong phân tử liên kết hai phần dư sau đầu C của V_H và một lượng lớn các arginin và các prolin ở các vị trí khác như là đặc điểm chung duy nhất của các chuỗi đã được lựa chọn.

Các kháng thể tái tổ hợp theo sáng chế cũng có thể chứa các trình tự hoặc các nhóm chức mà cho phép đime hóa hoặc multime hóa các thụ thể này. Các trình tự như vậy bao gồm các trình tự thu được từ IgA, cho phép tạo ra các multime cùng với chuỗi J. Một miền multime hóa khác là miền Gal4 đime hóa. Theo các phương án khác, các chuỗi có thể được cải biến bằng các chất như biotin/avidin mà cho phép kết hợp hai kháng thể.

Theo một phương án riêng biệt, một kháng thể chuỗi đơn có thể được tạo ra bằng cách kết hợp các chuỗi nhẹ và nặng của thụ thể bằng cách sử dụng phân tử liên kết không peptit hoặc đơn vị hoá học. Nói chung, các chuỗi nhẹ và nặng sẽ được tạo ra trong các tế bào riêng biệt, được tinh chế, và sau đó được liên kết với nhau theo cách thích hợp (ví dụ, đầu N của chuỗi nặng được gắn với đầu C của chuỗi nhẹ bằng một cầu hóa học thích hợp).

Các chất phản ứng liên kết chéo được sử dụng để tạo ra các cầu phân tử mà liên kết các nhóm chức của hai phân tử khác nhau, ví dụ, chất làm ổn định và làm đông tụ. Tuy nhiên, các đime hoặc multime của cùng một đồng phân hoặc các phức dị phân bao gồm các đồng phân khác nhau có thể được tạo ra. Để liên kết hai hợp chất khác nhau

theo từng bước, các chất liên kết chéo hai nhóm chức khác nhau có thể được sử dụng để loại bỏ sự tạo ra polyme đồng nhất không mong muốn.

Một chất liên kết chéo hai nhóm chức khác nhau điển hình chứa hai nhóm phản ứng: một nhóm phản ứng với nhóm amin bậc một (ví dụ, N-hydroxy sucxinimit) và một nhóm còn lại phản ứng khác với nhóm thiol (ví dụ, pyridyl disulfua, maleimit, halogen.v.v.). Thông qua nhóm phản ứng amin bậc một, chất liên kết chéo này có thể phản ứng với (các) phần dư lysin của một protein (ví dụ, kháng thể hoặc mảnh kháng thể đã được chọn) và thông qua nhóm phản ứng thiol, chất liên kết chéo này, đã được liên kết với protein thứ nhất, phản ứng với phần dư cystein (nhóm sulfhydryl tự do) của protein khác (ví dụ, tác nhân chọn lọc).

Tốt hơn là, một chất liên kết chéo có tính ổn định hợp lý trong máu sẽ được sử dụng. Có rất nhiều loại liên kết disulfua chứa các phân tử liên kết được biết đến có thể được sử dụng thành công để liên hợp các tác nhân hướng đích và các tác nhân điều trị/phòng bệnh. Các phân tử liên kết chứa một liên kết disulfua chịu trở ngại lập thể có thể cho thấy tính ổn định tốt hơn in vivo, ngăn ngừa sự giải phóng peptit hướng đích trước khi đến vị trí hoạt động. Vì thế, các phân tử liên kết này là một nhóm các tác nhân liên kết.

Một chất phản ứng liên kết chéo khác là SMPT, là chất liên kết chéo hai nhóm chức có chứa liên kết disulfua "chịu trở ngại lập thể" bởi một vòng benzen liền kề và các nhóm metyl. Trở ngại lập thể của liên kết disulfua có chức năng bảo vệ liên kết này khỏi bị tấn công bởi các anion thiolat như glutathion có thể có mặt trong các mô và máu, và nhờ đó giúp ngăn ngừa khả năng đứt liên kết của thể liên hợp trước khi chuyển các chất gắn đến vị trí đích.

Chất phản ứng liên kết chéo SMPT, cũng như nhiều chất phản ứng liên kết chéo đã biết khác, thêm vào khả năng liên kết chéo các nhóm chức như SH của cystein hoặc các amin bậc một (ví dụ, nhóm amino epsilon của lysin). Một chất liên kết chéo khác có thể bao gồm các phenylazit phản ứng quang hóa có hai nhóm chức khác nhau chứa liên kết disulfua có thể phân cắt như sulfosucxinimidyl-2-(p-azymido salixylamido) etyl-1,3'-dithiopropionat. Nhóm N-hydroxy-sucxinimidyl phản ứng với các nhóm amin bậc một và phenylazit (khi quang phân) phản ứng không chọn lọc với phần dư axit amin bất kỳ.

Ngoài các chất liên kết chéo chịu trở ngại, các phân tử liên kết không chịu trở ngại cũng có thể được sử dụng theo hướng dẫn này. Các chất liên kết chéo hữu ích khác, không được coi là chứa hoặc tạo ra một disulfua được bảo vệ, bao gồm SATA, SPDP và 2-iminothiolan (Wawrzynczak & Thorpe, 1987). Việc sử dụng các chất liên kết chéo như vậy đã được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực kỹ thuật này. Sáng chế theo một phương án khác bao gồm việc sử dụng các phân tử liên kết linh hoạt.

U.S. Patent 4.680.338, mô tả các phân tử liên kết có hai nhóm chức hữu ích cho việc tạo ra các thể liên hợp của các phối tử với các polyme và/hoặc các protein chứa amin, đặc biệt là để tạo ra các thể liên hợp kháng thể với các phức chất, các thuốc, các enzym, các chất đáng dấu có thể phát hiện được và các loại tương tự. U.S. Patents 5.141.648 và 5.563.250 bộc lộ các thể liên hợp có thể phân cắt chứa một liên kết không bền mà dễ phân cắt dưới các điều kiện mềm. Phân tử liên kết này là đặc biệt hữu ích ở chỗ chất được quan tâm có thể được liên kết trực tiếp với nó, thông qua sự phân cắt dẫn đến sự giải phóng chất hoạt tính. Các ứng dụng cụ thể bao gồm việc thêm một nhóm amino tự do hoặc sulfhydryl tự do vào một protein, như một kháng thể, hoặc một loại thuốc.

U.S. Patent 5.856.456 đưa ra các phân tử liên kết peptit để sử dụng trong việc kết nối các thành phần polypeptit nhằm tạo ra các protein dung hợp, ví dụ như các kháng thể chuỗi đơn. Phân tử liên kết này có chiều dài tối đa khoảng 50 axit amin, chứa ít nhất một axit amin tích điện (ưu tiên arginin hoặc lysin) tiếp theo là một prolin, và được đặc trưng bởi tính ổn định cao hơn và ít kết tủa. U.S. Patent 5.880.270 bộc lộ các phân tử liên kết chứa aminoxy hữu ích trong một loạt kỹ thuật chẩn đoán miễn dịch và kỹ thuật tách.

E. Nội bào

Theo một phương án cụ thể, kháng thể là một kháng thể tái tổ hợp thích hợp cho hoạt động bên trong tế bào - các kháng thể như vậy được gọi là "nội bào". Các kháng thể này có thể ảnh hưởng đến chức năng hướng đích bằng nhiều cơ chế khác nhau, như bằng cách thay đổi sự vận chuyển protein nội bào, can thiệp chức năng của enzym, và ngăn chặn các tương tác protein-protein hoặc protein-ADN. Theo nhiều cách khác nhau, các cấu trúc của chúng tương tự hoặc song song với các cấu trúc của các kháng thể đơn chuỗi và kháng thể đơn miền, như đã đề cập ở trên. Quả thực, phiên mã đơn/chuỗi đơn là một đặc tính quan trọng cho phép biểu hiện nội bào trong một tế bào đích và đồng

thời làm cho quá trình vận chuyển protein qua màng tế bào trở nên khả thi hơn. Tuy nhiên, các đặc tính bổ sung là cần thiết.

Hai vấn đề chính ảnh hưởng đến việc thực hiện liệu pháp điều trị nội bào là việc vận chuyển, bao gồm việc hướng đích tế bào/mô và sự ổn định. Về việc vận chuyển, có nhiều phương pháp đã và đang được sử dụng, như phân phối trực tiếp đến mô, sử dụng các gen khởi đầu đặc hiệu tế bào, phân phối dựa vào virut và sử dụng các peptit dịch chuyển thấm qua màng tế bào/màng tế bào. Về sự ổn định, phương pháp nhìn chung hoặc là sàng lọc bằng thuật toán, bao gồm các phương pháp liên quan đến kỹ thuật biểu hiện thể thực khuẩn và có thể bao gồm sự hoàn thiện hoặc phát triển các trình tự liên ứng, hoặc các biến đổi trực tiếp hơn như thêm các trình tự làm ổn định (ví dụ, các vùng Fc, các trình tự chaperone protein, dây kéo leuxin) và thay thế/cải biến disulfua.

Một tính năng bổ sung mà các nội bào có thể cần là một tín hiệu đối với hướng đích nội bào. Các vật chủ trung gian có thể hướng đích các nội bào (hoặc các protein khác) đến các vùng dưới mức tế bào như bào chất, hạt nhân, ty thể và ER đã và đang được thiết kế và có bán trên thị trường (Invitrogen Corp., Persic tạo et al., 1997).

Nhờ khả năng đi vào tế bào, các nội bào có thêm các tác dụng mà các loại kháng thể khác có thể không có. Đối với các kháng thể này, khả năng tương tác với miền bào chất MUC1 trong tế bào sống có thể ảnh hưởng đến các chức năng liên quan đến MUC1 CD, như các chức năng báo hiệu (liên kết với các phân tử khác) hoặc sự tạo thành oligome. Cụ thể, dự định rằng các kháng thể này có thể được sử dụng để ức chế sự tạo thành đime MUC1.

F. Làm sạch

Theo các phương án nhất định, các kháng thể của sáng chế có thể được làm sạch. Thuật ngữ "làm sạch", như được sử dụng ở đây, được dùng để chỉ một thành phần, dễ tách ra khỏi các thành phần khác, trong đó protein được làm sạch đến mức độ bất kỳ tùy theo trạng thái tự nhiên thu được của nó. Do đó, một protein đã được làm sạch cũng được dùng để chỉ một protein, tách ra khỏi môi trường mà nó có thể sinh ra theo cách tự nhiên. Trong môi trường mà thuật ngữ "làm sạch đáng kể" được sử dụng, thuật ngữ này sẽ được dùng để chỉ một thành phần trong đó protein hoặc peptit cấu thành nên thành phần chính của nó, ví dụ, thành phần được cấu thành từ khoảng 50%, khoảng 60%, khoảng 70%, khoảng 80% khoảng 90%, khoảng 95% protein hoặc nhiều hơn.

Các kỹ thuật làm sạch protein đã được biết đến rộng rãi đối với các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các kỹ thuật này liên quan đến, ở một mức độ, việc phân đoạn sơ bộ môi trường tế bào đến các phân đoạn polypeptit và không polypeptit. Sau khi tách polypeptit ra khỏi các protein khác, polypeptit được quan tâm có thể được làm sạch thêm bằng cách sử dụng các kỹ thuật sắc ký và điện di để đạt được việc làm sạch một phần hoặc toàn bộ (hoặc làm sạch đến đồng nhất). Các phương pháp phân tích đặc biệt phù hợp để tạo ra peptit tinh khiết là sắc ký trao đổi ion, sắc ký loại trừ theo kích thước; điện di gel polyacrylamit; phương pháp đẳng điện. Các phương pháp khác để làm sạch protein bao gồm, phương pháp kết tủa bằng amoni sulphat, PEG, các kháng thể và các chất tương tự hoặc bởi việc làm biến tính nhiệt, sau đó ly tâm; lọc gel, sắc ký pha đảo, sắc ký hydroxylapatit và sắc ký ái lực; và các sự kết hợp của các kỹ thuật này với các kỹ thuật khác.

Trong khi làm sạch một kháng thể của sáng chế này, việc biểu hiện polypeptit trong một hệ thống biểu hiện nhân sơ hoặc nhân thực và trích xuất protein bằng cách sử dụng các điều kiện làm biến tính có thể là điều mong muốn. Polypeptit có thể được làm sạch từ các thành phần tế bào khác bằng cách sử dụng một cột ái lực, liên kết với một phần được đánh dấu của polypeptit này. Như thường được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này, thứ tự thực hiện các bước làm sạch khác nhau được cho là có thể thay đổi, hoặc các bước nhất định có thể được bỏ qua, và vẫn cho ra một phương pháp phù hợp để điều chế một protein hoặc peptit được làm sạch đáng kể.

Nói chung, các kháng thể hoàn chỉnh được phân đoạn bằng cách sử dụng các tác nhân (tức là protein A) mà liên kết với phần Fc của kháng thể này. Theo cách khác, các kháng nguyên có thể được sử dụng để đồng thời làm sạch và chọn các kháng thể thích hợp. Các phương pháp như vậy thường sử dụng tác nhân lựa chọn liên kết với một dạng nền, như cột, bộ lọc hoặc hạt. Các kháng thể được liên kết với một nền, tạp chất được loại bỏ (ví dụ, được rửa sạch), và các kháng thể này được giải phóng bằng cách áp dụng các điều kiện (muối, nhiệt, v.v.).

Các phương pháp khác nhau để định lượng mức độ làm sạch protein hoặc peptit sẽ được hiểu bởi các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này khi đọc sáng chế này. Các phương pháp này bao gồm, ví dụ, xác định hoạt tính cụ thể của một phân đoạn hoạt tính, hoặc đánh giá lượng các polypeptit có trong một phân đoạn bằng phân tích SDS/PAGE. Một phương pháp khác để đánh giá mức độ tinh khiết của một phân đoạn là tính toán

hoạt tính cụ thể của phân đoạn này, để so sánh nó với hoạt tính cụ thể của phần chiết ban đầu và nhờ đó tính toán mức độ tinh khiết. Các đơn vị thực tế dùng để biểu thị lượng hoạt tính đương nhiên sẽ phụ thuộc vào kỹ thuật xét nghiệm cụ thể đã được lựa chọn để theo sau bước làm sạch này và dù protein hoặc peptit đã được biểu hiện có thể hiện hoạt tính đo được hay không.

Biết rằng con đường di chuyển của một polypeptit có thể thay đổi, đôi khi thay đổi đáng kể, với các điều kiện khác nhau của SDS/PAGE (Capaldi et al.,1977). Do đó, cần phải nhận thấy rằng dưới các điều kiện điện di khác nhau, trọng lượng phân tử biểu kiến của các sản phẩm biểu hiện đã được làm sạch hoặc làm sạch một phần có thể là khác nhau.

III. Tạo miễn dịch chủ động/thụ động và điều trị/ngăn ngừa bệnh nhiễm virut Chikungunya

A. Dược phẩm và sử dụng

Sáng chế đề xuất các dược phẩm chứa các kháng thể kháng virut Chikungunya và các kháng nguyên tạo ra các kháng thể này. Các dược phẩm như vậy chứa một lượng kháng thể hoặc một mảnh của nó hữu hiệu để ngăn ngừa hoặc điều trị, hoặc một chất sinh miễn dịch peptit, và một chất vận chuyển dược dụng. Theo một phương án cụ thể, thuật ngữ "dược dụng" nghĩa là được chấp thuận bởi cơ quan quản lý của Chính phủ liên bang hoặc chính phủ tiểu bang hoặc được liệt kê trong U.S. Pharmacopeia hoặc dược điển được công nhận rộng rãi khác dùng cho động vật, và cụ thể hơn là cho người. Thuật ngữ "chất vận chuyển" được dùng để chỉ một chất pha loãng, tá dược, hoặc tá dược lỏng dùng để điều trị. Các chất vận chuyển dược dụng này có thể là các chất lỏng vô trùng, như nước và dầu, bao gồm các loại dầu có nguồn gốc từ dầu mỏ, động vật, thực vật hoặc tổng hợp, như dầu lạc, dầu đậu nành, dầu khoáng, dầu vừng và các dầu tương tự. Nước là một chất vận chuyển đặc biệt khi dược phẩm này được tiêm tĩnh mạch. Các dung dịch nước muối và các dung dịch nước dextroza và glyxerin cũng có thể được sử dụng làm chất vận chuyển lỏng, đặc biệt là các dung dịch dùng để tiêm. Các tá dược dược dụng thích hợp khác bao gồm tinh bột, glucoza, lactoza, sucroza, gelatin, mạch nha, gạo, bột mì, phấn, gel silicoxit, natri stearat, glyxerin monostearat, talc, natri clorua, sữa gầy dạng bột, glyxerin, propylen, glycol, nước, etanol và các chất tương tự.

Dược phẩm này, nếu muốn, cũng có thể chứa một lượng nhỏ các chất thấm ướt hoặc các chất nhũ hóa, hoặc các chất đệm pH. Các dược phẩm này có thể ở dạng dung dịch, huyền phù, nhũ tương, viên nén, thuốc viên, viên nang, bột, các dược phẩm giải phóng kéo dài và các dạng tương tự. Dược phẩm uống có thể chứa các chất vận chuyển tiêu chuẩn như các loại dược dụng của manitol, lactoza, tinh bột, magie stearat, natri sacarin, xenluloza, magie cacbonat, v.v.. Các ví dụ về các dược phẩm phù hợp được mô tả trong "Remington's Pharmaceutical Sciences". Các dược phẩm như vậy sẽ chứa một lượng kháng thể hoặc một mảnh của nó hữu hiệu dùng để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh, tốt hơn là ở dạng tinh khiết, cùng với một lượng chất vận chuyển phù hợp để tạo ra dạng phù hợp để việc điều trị bệnh cho bệnh nhân. Dược phẩm này nên phù hợp với cách dùng thuốc, có thể là dùng dạng uống, đường tiêm tĩnh mạch, đường tiêm trong khoang qua miệng, đường tiêm dưới da, ống xông, hít qua đường phế quản, hoặc xông cơ học.

Các vắc xin hoạt tính cũng được mường tượng ra nơi các kháng thể giống các kháng thể được bộc lộ được sinh ra in vivo ở đối tượng có nguy cơ nhiễm virut Chikungunya. Các trình tự đối với E1 và E2 được liệt kê dưới dạng các trình tự được liệt kê là các SEQ ID NO: 253-276 trong danh mục trình tự thêm vào. Các vắc xin như vậy có thể được tạo thành dược phẩm dùng qua đường tiêm, ví dụ, tạo thành dược phẩm dùng để tiêm trong da, tiêm tĩnh mạch, tiêm bắp, tiêm dưới da, hoặc thậm chí là các đường tiêm qua màng bụng. Có thể sử dụng qua đường trong da và trong bắp. Theo cách khác, các vắc xin này có thể được dùng qua đường trực tiếp tại chỗ vào niêm mạc, ví dụ, nhỏ mũi, hít, hoặc qua máy xông. Các muối dược dụng bao gồm các muối axit và các muối được tạo ra với các axit vô cơ như axit clohydric hoặc axit photphoric hoặc các axit hữu cơ như axit axetic, oxalic, tartaric, mandelic, và các axit tương tự. Các muối được tạo ra với các nhóm cacboxyl tự do cũng có thể thu được từ các bazơ vô cơ, ví dụ, natri, kali, amoni, canxi hoặc sắt hydroxit và các bazơ hữu cơ như isopropylamin, trimetylamin, 2-etylamino etanol, histidin, procain, và các chất tương tự.

Việc tiêm thụ động các kháng thể, được biết đến là miễn dịch thụ động nhân tạo, nói chung sẽ bao gồm việc tiêm qua đường tĩnh mạch hoặc tiêm bắp. Các dạng kháng thể có thể là huyết tương hoặc huyết thanh của người hoặc động vật, dưới dạng globulin miễn dịch ở người hỗn hợp dùng để tiêm tĩnh mạch (Intravenous Immunoglobulin - IVIG) hoặc tiêm bắp (IG), như IVIG hoặc IG của người với hàm lượng cao từ người cho đã miễn dịch hoặc đã hồi phục sau bệnh và dưới dạng các kháng thể đơn dòng

(MAb). Tính miễn dịch này nói chung chỉ kéo dài trong một khoảng thời gian ngắn, và cũng có thể có nguy cơ xảy ra các phản ứng quá mẫn và bệnh huyết thanh, đặc biệt là từ globulin gama không phải của người. Tuy nhiên, tính miễn dịch thụ động tạo ra sự bảo vệ ngay lập tức. Các kháng thể này sẽ được tạo thành dược phẩm trong một chất vận chuyển thích hợp để tiêm, có nghĩa là, vô trùng và tiêm bằng bơm kim tiêm.

Nói chung, các thành phần của dược phẩm theo sáng chế được cung cấp riêng biệt hoặc pha trộn với nhau ở dạng liều đơn, ví dụ, bột đã được làm khô lạnh hoặc cô đặc không chứa nước trong một hộp kín như ống thuốc hoặc túi thuốc biểu thị lượng chất hoạt tính. Nếu dược phẩm này được sử dụng bằng phương pháp truyền, nó có thể được truyền với một chai truyền chứa nước hoặc nước muối dược dụng vô trùng. Nếu chế phẩm được sử dụng bằng cách tiêm, ống thuốc tiêm chứa nước vô trùng để tiêm hoặc nước muối có thể được tạo ra để trộn các thành phần này với nhau axit trước khi tiêm.

Các dược phẩm theo sáng chế có thể được tạo thành ở các dạng trung tính hoặc dạng muối. Các muối dược dụng bao gồm các muối được tạo ra với các anion như các muối thu được từ axit clohydric, phoyphoric, axetic, oxalic, tartaric, v.v., và các muối được tạo ra với các cation như các muối thu được từ kali, amoni, trietylamin, 2-etylamino etanol, histidin, procain, v.v.

IV Các thể liên hợp kháng thể

Các kháng thể của sáng chế có thể được liên kết với ít nhất một tác nhân để tạo ra một thể liên hợp kháng thể. Để tăng tính hiệu quả của các phân tử kháng thể như các tác nhân chẩn đoán hoặc điều trị bệnh, nó thường có liên kết hoặc liên kết cộng hóa trị hoặc phức hợp với ít nhất một phân tử hoặc một nhóm mong muốn. Một phân tử hoặc một nhóm này có thể là, nhưng không bị giới hạn ở, ít nhất một phân tử tác động hoặc phân tử thông báo. Các phân tử điều biến tế bào hiệu lực bao gồm các phân tử có hoạt tính mong muốn, ví dụ, hoạt tính gây độc tế bào. Các ví dụ không giới hạn về các phân tử điều biến tế bào hiệu lực mà đã được gắn vào các kháng thể bao gồm các chất độc, các tác nhân chống khối u, các enzym trị liệu, các đồng vị phóng xạ, các chất chống virut, các chất tạo phức, các cytokin, các yếu tố tăng trưởng, và oligo- hoặc các polynucleotit. Ngược lại, một phân tử thông báo được định nghĩa là nhóm bất kỳ mà có thể được phát hiện bằng cách sử dụng kỹ thuật xét nghiệm. Các ví dụ không giới hạn về

các phân tử thông báo đã được liên hợp với các kháng thể bao gồm các enzym, các chất đánh dấu phóng xạ, các hapten, các chất đánh dấu huỳnh quang, các phân tử lân quang, các phân tử phát quang hóa học, các phân tử các nhóm mang màu, các phân tử ái quang, các hạt có màu hoặc các phối tử như biotin.

Các thể liên hợp kháng thể nói chung được ưu tiên để sử dụng làm tác nhân chẩn đoán. Các chẩn đoán bằng kháng thể rơi vào hai nhóm, các chẩn đoán để sử dụng trong chẩn đoán in vitro như trong các xét nghiệm miễn dịch khác nhau và các chẩn đoán được sử dụng trong các quá trình chẩn đoán in vivo, nói chung được gọi là "chẩn đoán tạo ảnh hướng đích kháng thể". Nhiều tác nhân tạo ảnh thích hợp được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này, cũng như các phương pháp gắn chúng vào các kháng thể (xem, ví dụ, U.S. Patents 5.021.236, 4.938.948 và 4.472.509). Các nhóm chức tạo ảnh được sử dụng có thể là các ion thuận từ, các chất đồng vị phóng xạ, các chất phát huỳnh quang, các chất phát hiện NMR, và các tác nhân tạo ảnh bằng tia X.

Trong trường hợp các ion thuận từ, có thể kể các ion như, crom (III), mangan (II), sắt (III), sắt (II), coban (II), niken (II), đồng (II), neodym (III), samari (III), yterbi (III), gadolini (III), vanadi (II), terbi (III), dysprosi (III), holmi (III) và/hoặc erbi (III), với gadolini là được đặc biệt ưu tiên. Các ion hữu ích trong các tình huống khác, như chụp X-quang, bao gồm nhưng không giới hạn ở lantan (III), vàng (III), chì (II), và đặc biệt là bismut (III).

Trong trường hợp đồng vị phóng xạ dùng để điều trị và/hoặc chẩn đoán bệnh, có thể kể đến astatin^{211}, ^{14}cacbon, ^{51}crom, ^{36}clo, ^{57}coban, ^{58}coban, đồng^{67}, ^{152}Eu, galli^{67}, ^{3}hydro, iôt^{123}, iôt^{125}, iôt^{131}, indi^{111}, ^{59}sắt, ^{32}phospho, reni^{186}, reni^{188}, ^{75}selen, ^{35}lưu huỳnh, technici^{99m} và/hoặc ytri^{90}. ^{125}I thường được ưu tiên để sử dụng theo các phương án nhất định, và technici^{99m} và/hoặc indi^{111} cũng thường được ưu tiên hơn do năng lượng của chúng thấp và phù hợp để phát hiện từ xa. Các kháng thể đơn dòng được đánh dấu phóng xạ của sáng chế này có thể được tạo ra theo các phương pháp đã được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, các kháng thể đơn dòng có thể được iốt hóa khi tiếp xúc với natri và/hoặc kali iodua và một tác nhân oxy hóa hóa học như natri hypoclorit, hoặc một tác nhân oxy hóa enzym, như lactoperoxidaza. Các kháng thể đơn dòng theo sáng chế này có thể được đánh dấu techneti^{99m} qua quá trình trao đổi phối tử, ví dụ, bằng cách khử pertechnat bằng dung dịch chứa thiếc, tạo phức techneti đã được khử trên cột Sephadex và đưa kháng thể vào cột này. Theo cách khác, các kỹ thuật đánh dấu trực tiếp

có thể được sử dụng, ví dụ, bằng cách ủ pertechnat, chất khử như $SNCl_2$, dung dịch đệm như dung dịch natri-kali phtalat, và kháng thể. Các nhóm chức trung gian thường được sử dụng để liên kết các đồng vị phóng xạ tồn tại dưới dạng các ion kim loại với kháng thể là axit dietylentriaminpentaaxetic (DTPA) hoặc axit diamintetraxetic etylen (EDTA).

Trong số các chất đánh dấu huỳnh quang được dự định sử dụng làm các thể liên hợp bao gồm Alexa 350, Alexa 430, AMCA, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665, BODIPY-FL, BODIPY-R6G, BODIPY-TMR, BODIPY-TRX, Cascade Blue, Cy3, Cy5, 6-FAM, Isothioxyanate Fluorescein, HEX, 6-JOE, Oregon Green 488, Oregon Green 500, Oregon Green 514, Pacific Blue, REG, Rhodamine Green, Rhodamine Red, Renographin, ROX, TAMRA, TET, Tetrametylrhodamin, và/hoặc Texas Red.

Một loại các thể liên hợp kháng thể khác theo sáng chế là các thể liên hợp kháng thế được sử dụng chủ yếu in vitro, trong đó kháng thể này được liên kết với một phối tử liên kết thứ cấp và/hoặc với enzym (chất đánh dấu enzym) tạo ra một sản phẩm có màu khi tiếp xúc với chất nền sinh màu. Ví dụ về các enzym thích hợp bao gồm ureaza, phosphataza kiềm, (củ cải ngựa) hydro peroxidaza hoặc glucozơ oxidaza. Các phối tử liên kết thứ cấp được ưu tiên là các hợp chất biotin và avidin và streptavidin. Việc sử dụng các chất đánh dấu như vậy đã được biết đến rộng rãi với các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này và được mô tả, ví dụ, trong U.S. Patents 3.817.83, 3.850.752, 3.939.350, 3.996.345, 4.277.437, 4.275.149 và 4.366.241.

Một phương pháp khác nữa đã được biết đến để gắn đặc hiệu vị trí của các phân tử vào các kháng thể bao gồm phản ứng của các kháng thể với các chất đánh dấu ái lực trên cơ sở hapten. Về cơ bản, các chất đánh dấu ái lực trên cơ sở hapten phản ứng với các axit amin ở vị trí liên kết với kháng nguyên, nhờ đó phá hủy vị trí này và ngăn chặn phản ứng với kháng nguyên. Tuy nhiên, điều này có thể không có lợi vì nó dẫn đến mất liên kết với kháng nguyên bởi thể liên hợp kháng thể.

Các phân tử chứa các nhóm azido cũng có thể được sử dụng để tạo ra các liên kết cộng hóa trị với các protein thông qua các hợp chất trung gian nitren phản ứng mà được tạo ra bởi ánh sáng cực tím cường độ thấp (Potter and Haley, 1983). Cụ thể, các đồng phân 2- và 8-azido của các purin nucleotit đã và đang được sử dụng làm photoprobe định hướng vị trí tại chỗ để xác định các protein liên kết với nucleotit trong các phần chiết tế bào thô (Owens & Haley, 1987, Atherton et al., 1985). Các nucleotit 2- và 8-

azido cũng đã được sử dụng để sắp xếp các miền liên kết nucleotit của các protein đã được làm sạch (Khatoon et al., 1989, King et al., 1989. Dholakia tạo et al., 1989) và có thể được sử dụng làm các tác nhân liên kết với kháng thể.

Một vài phương pháp gắn kết hoặc liên hợp một kháng thể với nhóm liên hợp của nó đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này. Một vài phương pháp gắn kết bao gồm việc sử dụng phức hệ tạo phức kim loại bằng cách sử dụng, ví dụ, một tác nhân tạo phức hữu cơ như anhydrit axit dietylentriaminpentaaxetic (DTPA); etylentriamintetra axetic; N-clo-p-toluensulphonamit; và/hoặc tetraclo-3-6-diphenylglycouril-3 gắn vào kháng thể (U.S. Patents 4.472.509 và 4.938.948). Các kháng thể đơn dòng cũng có thể phản ứng với một enzym với sự có mặt của một chất liên kết như glutaraldehyt hoặc periodat. Các thể liên hợp với các chất đánh dấu huỳnh quang được điều chế với sự có mặt của các chất liên kết này hoặc bằng phản ứng với isothioxyanat. Trong U.S. Patent 4.938.948, việc chụp ảnh các khối u ở vú đã được thực hiện bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng và các nhóm chức tạo ảnh có thể phát hiện được liên kết với kháng thể bằng cách sử dụng các mối liên kết như metyl-p-hydroxybenzimidat hoặc N-sucxinimidyl-3- (4-hydroxyphenyl)propionat.

Theo các phương án khác, việc tạo dẫn xuất các globulin miễn dịch bằng cách đưa vào có chọn lọc các nhóm sulfhydryl trong vùng Fc của một globulin miễn dịch bằng cách sử dụng các điều kiện phản ứng mà không làm thay đổi vị trí kết hợp kháng thể được dự định. Các thể liên hợp kháng thể được tạo ra theo phương pháp này cho thấy tuổi thọ, độ đặc hiệu và độ nhạy được cải thiện (U.S. Patent 5196066, được viện dẫn ở đây). Sự gắn kết vị trí cụ thể của các phân tử điều biến tế bào hiệu lực hoặc thông báo, trong đó phân tử điều biến tế bào hiệu lực hoặc thông báo này được liên hợp với phần dư cacbohydrat trong vùng Fc cũng đã được đề cập trong tài liệu này (O'Shannessy et al., 1987). Phương pháp này đã được báo cáo có thể sản xuất kháng thể chẩn đoán và điều trị tiềm năng hiện đang được đánh giá lâm sàng.

V. Phương pháp phát hiện miễn dịch

Theo các phương án tiếp theo, sáng chế liên quan đến các phương pháp phát hiện miễn dịch để liên kết, làm sạch, loại bỏ, định lượng và nói chung là phát hiện virut Chikungunya và các kháng nguyên có liên quan của nó. Mặc dù các phương pháp này có thể được áp dụng theo cách truyền thống, ứng dụng khác là trong việc kiểm soát chất

lượng và giám sát vắc xin và các nguồn virut khác, trong đó các kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng để đánh giá số lượng hoặc tính toàn vẹn (ví dụ, sự ổn định trong thời gian dài) của các kháng nguyên H1 ở các virut. Theo cách khác, các phương pháp này có thể được sử dụng để sàng lọc các kháng thể khác nhau đối với các đặc tính phản ứng thích hợp/mong muốn.

Một vài phương pháp phát hiện miễn dịch được đề cập bao gồm phương pháp xét nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay - ELISA), xét nghiệm miễn dịch phóng xạ (Radioimmunoassay - RIA), xét nghiệm đo phóng xạ miễn dịch, xét nghiệm miễn dịch huỳnh quang, xét nghiệm miễn dịch hóa phát quang, xét nghiệm miễn dịch sinh phát quang, và Western blot. Cụ thể là, một xét nghiệm cạnh tranh đối với việc phát hiện và định lượng các kháng thể của virut Chikungunya hướng đến các epitop ký sinh đặc hiệu trong các mẫu cũng được đề xuất. Các bước của các phương pháp phát hiện miễn dịch hữu ích khác nhau đã và đang được mô tả trong các tài liệu khoa học, ví dụ như Doolittle và Ben-Zeev (1999), Gulbis và Galand (1993), De Jager et al. (1993), và Nakamura et al. (1987). Nói chung, các phương pháp liên kết miễn dịch bao gồm việc lấy mẫu nghi chứa virut Chikungunya, và cho mẫu này tiếp xúc với một kháng thể thứ nhất theo sáng chế, tùy theo từng trường hợp, trong điều kiện có hiệu quả để cho phép tạo ra các phức hợp miễn dịch.

Các phương pháp này bao gồm các phương pháp làm sạch virut Chikungunya hoặc các kháng nguyên có liên quan từ một mẫu. Tốt hơn là, kháng thể này sẽ được liên kết với một nền dạng rắn, như ở dạng ma trận cột, và mẫu nghi ngờ chứa virut Chikungunya hoặc thành phần kháng nguyên sẽ được đưa vào kháng thể cố định này. Các thành phần không mong muốn sẽ được rửa sạch ra khỏi cột này, để lại kháng nguyên của virut Chikungunya đã phức hợp miễn dịch với kháng thể cố định này, sau đó được gom lại bằng cách loại bỏ các sinh vật hoặc kháng nguyên ra khỏi cột.

Các phương pháp liên kết miễn dịch cũng bao gồm các phương pháp phát hiện và định lượng lượng virut Chikungunya hoặc các thành phần có liên quan trong một mẫu và việc phát hiện và định lượng các phức hợp miễn dịch bất kỳ đã được tạo ra trong suốt quá trình liên kết này. Ở đây, người ta muốn thu được mẫu nghi ngờ chứa virut Chikungunya hoặc các kháng nguyên của nó, và cho tiếp xúc mẫu này với một kháng thể liên kết virut Chikungunya hoặc các thành phần của nó, sau đó phát hiện và định lượng lượng các phức hợp miễn dịch đã được tạo ra trong điều kiện cụ thể. Về việc phát

hiện kháng nguyên, mẫu sinh học được phân tích có thể là mẫu bất kỳ nghi ngờ chứa virut Chikungunya hoặc kháng nguyên của virut Chikungunya, như một lát cắt hoặc mẫu xét nghiệm mô, một phần chiết mô đã được đồng nhất hóa, một chất lỏng sinh học, bao gồm máu và huyết thanh, hoặc một chất bài tiết, như phân hoặc nước tiểu.

Việc cho mẫu sinh học đã được chọn tiếp xúc với kháng thể trong điều kiện có hiệu quả và trong một khoảng thời gian đủ để cho phép tạo ra các phức hợp miễn dịch (các phức hợp miễn dịch ban đầu) nói một cách đơn giản chỉ là thêm thành phần kháng thể này vào mẫu đó và ủ hỗn hợp này trong một khoảng thời gian đủ dài để các kháng thể tạo ra các phức hợp miễn dịch với, nghĩa là, liên kết với virut Chikungunya hoặc các kháng nguyên có mặt. Sau đó, các thành phần mẫu-kháng thể này, như lát cắt mô, đĩa ELISA, chấm chấm hoặc Western blot, nói chung sẽ được rửa sạch để loại bỏ các loại kháng thể liên kết không đặc hiệu bất kỳ, cho phép chỉ phát hiện các kháng thể liên kết đặc hiệu trong các phức hợp miễn dịch ban đầu.

Nói chung, việc phát hiện sự tạo ra phức hợp miễn dịch đã được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể được thực hiện thông qua việc áp dụng nhiều phương pháp. Các phương pháp này nói chung dựa vào việc phát hiện một chất đánh dấu hoặc chất thông báo, như chất bất kỳ trong số các chất đánh dấu phóng xạ, huỳnh quang, sinh học và enzym. Các sáng chế liên quan đến việc sử dụng các chất đánh dấu đó bao gồm U.S. Patents 3.817.837, 3.850.752, 3.939.350, 3.996.345, 4.277.437, 4.275.149 và 4.366.241. Tất nhiên, có thể tìm thấy các ưu điểm khác thông qua việc sử dụng một phối tử liên kết thứ hai như một kháng thể thứ hai và/hoặc phối tử biotin/avidin sắp xếp liên kết, như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Kháng thể dùng trong việc phát hiện tự nó có thể được liên kết với một chất đánh dấu dễ phát hiện, trong đó người ta chỉ cần phát hiện chất đánh dấu, nhờ đó cho phép xác định được lượng các phức hợp miễn dịch ban đầu trong thành phần này. Theo cách khác, kháng thể thứ nhất được liên kết trong các phức hợp miễn dịch ban đầu có thể được phát hiện bằng một phối tử liên kết thứ hai mà có ái lực liên kết với kháng thể này. Trong các trường hợp này, phối tử liên kết thứ hai có thể được liên kết với một chất đánh dấu dễ phát hiện. Chính phối tử liên kết thứ hai này thường là một kháng thể, do đó có thể được gọi là kháng thể "thứ cấp". Các phức hợp miễn dịch ban đầu được cho tiếp xúc với phối tử liên kết thứ hai, được đánh dấu, hoặc kháng thể, trong các điều kiện có hiệu quả và trong một khoảng thời gian đủ dài để cho phép tạo ra các phức hợp miễn

dịch thứ hai. Sau đó, các phức hợp miễn dịch thứ hai này được rửa sạch để loại bỏ các kháng thể hoặc các phối tử thứ hai được đánh dấu liên kết không đặc hiệu bất kỳ, và sau đó chất đánh dấu còn lại trong các phức hợp miễn dịch thứ hai được phát hiện.

Các phương pháp bổ sung bao gồm việc phát hiện các phức hợp miễn dịch ban đầu theo hai bước. Một phối tử liên kết thứ hai, như một kháng thể mà có ái lực liên kết với kháng thể này, được sử dụng để tạo ra các phức hợp miễn dịch thứ hai, như được mô tả trên đây. Sau khi làm sạch, các phức hợp miễn dịch thứ hai được cho tiếp xúc với một phối tử hoặc kháng thể liên kết thứ ba có ái lực liên kết với kháng thể thứ hai này, một lần nữa trong các điều kiện có hiệu quả và trong một thời gian đủ dài để cho phép tạo ra các phức hợp miễn dịch (các phức hợp miễn dịch bậc ba). Phối tử hoặc kháng thể thứ ba này được liên kết với một chất đánh dấu dễ phát hiện, cho phép phát hiện các phức hợp miễn dịch bậc ba sau đó được tạo ra. Hệ thống này có thể cung cấp sự khuếch đại tín hiệu, nếu muốn.

Một phương pháp phát hiện miễn dịch sử dụng hai kháng thể khác nhau. Một kháng thể đã được biotinyl hóa thứ nhất được sử dụng để phát hiện ra kháng nguyên đích, và sau đó một kháng thể thứ hai được sử dụng để phát hiện ra biotin gắn vào biotin đã được tạo phức hợp. Trong phương pháp đó, mẫu được thử nghiệm đầu tiên được ủ trong dung dịch chứa kháng thể thu được ở bước đầu. Nếu kháng nguyên đích có mặt, một vài kháng thể sẽ liên kết với kháng nguyên này để tạo ra phức hợp kháng thể/kháng nguyên đã được biotinyl hóa. Sau đó, phức hợp kháng thể/kháng nguyên này được khuếch đại bằng cách ủ trong các dung dịch liên tiếp chứa streptavidin (hoặc avidin), ADN đã được biotinyl hoá, và/hoặc ADN đã được biotinyl hoá bổ sung, với mỗi bước được bổ sung thêm các vị trí biotin thêm vào phức hợp kháng thể/kháng nguyên này. Các bước khuếch đại này được lặp lại cho đến khi đạt được mức độ khuếch đại phù hợp, mà ở điểm đó mẫu được ủ trong dung dịch chứa kháng thể thu được ở bước thứ hai kháng biotin. Kháng thể thu được ở bước thứ hai này được đánh dấu, ví dụ, bằng một enzym có thể được sử dụng để phát hiện sự có mặt của phức hợp kháng thể/kháng nguyên bằng mô-enzym học bằng cách sử dụng chất nền tạo sắc tố. Với sự khuếch đại thích hợp, một thể liên hợp có thể được tạo ra mà có thể nhìn thấy được bằng mắt thường.

Một phương pháp phát hiện miễn dịch đã biết khác tận dụng phương pháp miễn dịch-PCR (phản ứng chuỗi Polymeraza). Phương pháp PCR tương tự như phương pháp Cantor cho đến bước ủ ADN đã được biotinyl hoá, tuy nhiên, thay vì sử dụng nhiều mẻ

ủ streptavidin và ADN đã được biotinyl hoá, phức hợp ADN/biotin/streptavidin/kháng thể được rửa sạch với dung dịch đệm muối có độ pH thấp hoặc cao giải phóng kháng thể này. Các dung dịch rửa thu được sau đó được sử dụng để thực hiện một phản ứng PCR với các đoạn mồi thích hợp với các sự giám sát phù hợp. Ít nhất về mặt lý thuyết, khả năng khuếch đại lớn và tính đặc hiệu của PCR có thể được tận dụng để phát hiện một phân tử kháng nguyên duy nhất.

A. Các xét nghiệm ELISA

Các xét nghiệm miễn dịch, theo nghĩa đơn giản nhất và trực tiếp, là các xét nghiệm liên kết. Các xét nghiệm miễn dịch được ưa tiên nhất định là các loại khác nhau của xét nghiệm hấp thụ miễn dịch được liên kết với enzym (ELISA) và các xét nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA) đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Phát hiện hoá mô miễn dịch bằng cách sử dụng các lát cắt mô cũng đặc biệt hữu ích. Tuy nhiên, dễ dàng nhận thấy rằng việc phát hiện không giới hạn ở các kỹ thuật như vậy, và Western blot, chấm chấm, các phân tích FACS, và các kỹ thuật tương tự cũng có thể được sử dụng.

Theo một ELISA điển hình, các kháng thể theo sáng chế được cố định trên bề mặt đã được lựa chọn thể hiện ái lực với protein, như một giếng trong đĩa vi chuẩn độ bằng polystyren. Sau đó, một chế phẩm thử nghiệm nghi chứa virut Chikungunya hoặc kháng nguyên virut Chikungunya được thêm vào các giếng này. Sau khi liên kết và rửa sạch để loại bỏ các phức hợp miễn dịch liên kết không đặc hiệu, kháng nguyên liên kết có thể được phát hiện. Việc phát hiện có thể được thực hiện bằng cách thêm một kháng thể kháng virut Chikungunya khác mà được liên quan với một chất đánh dấu dễ phát hiện. Loại thử nghiệm ELISA này là "ELISA sandwich" đơn giản. Việc phát hiện cũng có thể được thực hiện bằng cách bổ sung kháng thể kháng virut Chikungunya thứ hai, tiếp theo là bổ sung kháng thể thứ ba có ái lực liên kết với kháng thể thứ hai, với kháng thể thứ ba được liên kết với một chất đánh dấu dễ phát hiện.

Theo một ELISA điển hình khác, các mẫu nghi chứa virut Chikungunya hoặc kháng nguyên virut Chikungunya được cố định trên bề mặt giếng và sau đó cho tiếp xúc với các kháng thể kháng virut Chikungunya theo sáng chế. Sau khi liên kết và rửa sạch để loại bỏ các phức hợp miễn dịch có liên kết không đặc hiệu, các kháng thể kháng virut Chikungunya đã liên kết được phát hiện. Trường hợp các kháng thể kháng virut Chikungunya ban đầu được liên kết với một chất đánh dấu dễ phát hiện, các phức hợp

miễn dịch có thể được phát hiện trực tiếp. Một lần nữa, các phức hợp miễn dịch có thể được phát hiện bằng cách sử dụng một kháng thể thứ hai có ái lực liên kết với kháng thể kháng virut Chikungunya đầu tiên, với kháng thể thứ hai được liên kết với một chất đánh dễ phát hiện.

Bất luận cách nào được sử dụng, các ELISA có các đặc điểm chung nhất định, như phủ, ủ và liên kết, rửa sạch để loại bỏ các phần liên kết không đặc hiệu, và phát hiện các phức hợp miễn dịch đã được liên kết. Chúng được mô tả sau đây.

Trong quá trình phủ một đĩa bằng kháng nguyên hoặc kháng thể, một trong số đó nói chung sẽ ủ các giếng của đĩa bằng dung dịch chứa kháng nguyên hoặc kháng thể này, hoặc ủ qua đêm hoặc trong một vài giờ quy định. Sau đó, các giếng của đĩa sẽ được rửa sạch để loại bỏ các chất hấp phụ không hoàn toàn, các bề mặt còn lại bất kỳ của các giếng "được phủ" bằng một protein không đặc hiệu có tính kháng nguyên trung tính đối với thử nghiệm huyết thanh miễn dịch. Chúng bao gồm albumin huyết thanh bò (BSA), casein hoặc các dung dịch chứa sữa bột. Lớp phủ này cho phép ngăn chặn các vị trí hấp phụ không đặc hiệu trên bề mặt cố định và vì thế khử chất nền gây ra bởi sự kết hợp không đặc hiệu của huyết thanh miễn dịch trên bề mặt.

Trong các ELISA, thường người ta sử dụng phương tiện phát hiện bậc hai hoặc bậc ba hơn là quá trình trực tiếp. Vì thế, sau khi một protein hoặc kháng thể liên kết với giếng, phủ bằng một chất không phản ứng để khử chất nền, và rửa sạch để loại bỏ các chất không liên kết, bề mặt cố định được cho tiếp xúc với mẫu sinh học được thí nghiệm trong các điều kiện có hiệu quả cho phép tạo ra phức hợp miễn dịch (kháng nguyên/kháng thể). Sau đó, việc phát hiện phức hợp miễn dịch cần đến một phối tử hoặc kháng thể liên kết bậc hai đã được đánh dấu, và một phối tử hoặc kháng thể liên kết bậc hai đã kết hợp với một kháng thể bậc ba đã được đánh dấu hoặc phối tử liên kết bậc ba.

"Trong các điều kiện có hiệu quả cho phép tạo ra phức hợp miễn dịch (kháng nguyên/kháng thể)" có nghĩa là các điều kiện tốt hơn là bao gồm việc pha loãng các kháng nguyên và/hoặc kháng thể bằng các dung dịch như BSA, gama globulin của bò (BGG) hoặc muối đệm photphat (PBS)/Tween. Các chất bổ sung này cũng có xu hướng tham gia vào sự khử chất nền không đặc hiệu.

Các điều kiện "thích hợp" cũng bao gồm việc ủ ở một nhiệt độ hoặc trong khoảng thời gian đủ dài để cho phép liên kết có hiệu quả. Các bước ủ thường kéo dài từ 1 đến 2

giờ cho đến 4 giờ hoặc lâu hơn, ở nhiệt độ tốt hơn là trong khoảng 25°C đến 27°C, hoặc có thể ủ qua đêm ở khoảng 4°C.

Sau tất cả các bước ủ trong ELISA, bề mặt tiếp xúc được rửa sạch để loại bỏ chất không được tạo phức hợp. Một quy trình rửa được ưu tiên bao gồm bước rửa bằng dung dịch như PBS/Tween, hoặc dung dịch đệm borat. Sau khi tạo ra các phức hợp miễn dịch đặc hiệu giữa mẫu thử và chất liên kết ban đầu, và sau lần rửa tiếp theo, có thể xác định được cả sự xuất hiện số lượng phức hợp miễn dịch trong một phút.

Để tạo ra một phương tiện phát hiện, kháng thể thứ hai hoặc thứ ba sẽ có một chất đánh dấu được gắn để cho phép phát hiện. Tốt hơn, nếu nó sẽ là một enzym tạo ra sự phát triển màu khi ủ với một chất nền tạo màu thích hợp. Vì thế, ví dụ, người ta muốn cho các phức hợp miễn dịch thứ nhất và thứ hai tiếp xúc hoặc ủ với một ureaza, glucozơ oxidaza, photphataza kiềm hoặc kháng thể liên hợp hydro peroxidaza trong một khoảng thời gian và trong các điều kiện mà thuận lợi cho sự tạo ra phức hợp miễn dịch (ví dụ, ủ trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng trong dung dịch chứa PBS như PBS-Tween).

Sau khi ủ với kháng thể đã được đánh dấu, và sau đó rửa sạch để loại bỏ các chất không liên kết, lượng chất đánh dấu được định lượng, ví dụ như bằng cách ủ với chất nền tạo màu như ure, hoặc bromocresol tím, hoặc axit 2,2'-azino-di-(3-etyl-benzthiazolin-6-sulfonic (ABTS), hoặc H_2O_2, trong trường hợp peroxidaza là chất đánh dấu enzym. Sau đó, việc định lượng được thực hiện bằng cách đo mức độ màu đã được tạo ra, ví dụ, bằng cách sử dụng một máy quang phổ kế nhìn thấy được.

Theo phương án khác, sáng chế sử dụng các kiểu cạnh tranh. Điều này là đặc biệt hữu ích trong việc phát hiện các kháng thể virut Chikungunya có trong mẫu. Trong các thử nghiệm dựa trên sự cạnh tranh, một lượng chưa biết chất phân tích hoặc kháng thể được xác định bởi khả năng của nó thay đổi một lượng đã biết kháng thể hoặc chất phân tích đã được đánh dấu. Vì thế, sự hao hụt định lượng của một tín hiệu là dấu hiệu về lượng kháng thể hoặc chất phân tích chưa biết trong một mẫu.

Ở đây, các tác giả sáng chế đề xuất việc sử dụng các kháng thể đơn dòng của virut Chikungunya đã được đánh dấu để xác định lượng kháng thể của virut Chikungunya trong một mẫu. Kiểu cơ bản bao gồm việc cho tiếp xúc một lượng đã biết của kháng thể đơn dòng của virut Chikungunya (liên kết với một chất đánh dễ phát hiện) với kháng nguyên hoặc hạt của virut Chikungunya. Tốt hơn là, kháng nguyên hoặc vi sinh của virut Chikungunya được gắn với một chất hỗ trợ. Sau khi một kháng thể đơn

dòng đã được đánh dấu liên kết với chất hỗ trợ, mẫu này được thêm vào và ủ trong các điều kiện cho phép kháng thể chưa được đánh dấu bất kỳ trong mẫu này cạnh tranh, và sau đó thay thế, kháng thể đơn dòng đã được đánh dấu. Bằng cách đo lượng chất đánh dấu bị mất hoặc còn lại (và trừ đi lượng chất đánh dấu liên kết ban đầu), có thể xác định lượng kháng thể chưa được đánh dấu được liên kết với chất hỗ trợ này, và vì vậy xác định lượng kháng thể có mặt trong mẫu này.

B. Western blot

Western blot (hay còn được gọi là thấm tách miễn dịch protein) là một kỹ thuật phân tích dùng để phát hiện các protein cụ thể có trong một mẫu mô đồng thể hoặc phần chiết mô nhất định. Kỹ thuật này sử dụng điện di gel để tách các protein tự nhiên hoặc biến tính theo chiều dài của polypeptit (các điều kiện biến tính) hoặc bằng cấu trúc 3-D của protein này (các điều kiện tự nhiên/không biến tính). Sau đó, các protein này được chuyển sang một màng tế bào (thường là nitroxenluloza hoặc PVDF), nhờ đó chúng được thử nghiệm (phát hiện) bằng cách sử dụng các kháng thể đặc hiệu với protein đích.

Các mẫu có thể được lấy từ toàn bộ mô hoặc từ tế bào nuôi cấy. Trong hầu hết các trường hợp, các mô rắn đầu tiên được tách ra bằng máy trộn (đối với các thể tích mẫu lớn), bằng cách sử dụng một thiết bị đồng nhất hóa (đối với các thể tích nhỏ hơn) hoặc bằng kỹ thuật dùng sóng siêu âm. Các tế bào cũng có thể bị phá vỡ bằng một trong các kỹ thuật nêu trên. Tuy nhiên, cần lưu ý rằng các mẫu vi khuẩn, virut hoặc các mẫu từ môi trường có thể là nguồn protein và vì thế kỹ thuật Western blot không chỉ giới hạn ở các nghiên cứu tế bào. Hỗn hợp các chất tẩy rửa, muối, và chất đệm có thể được sử dụng để giúp phá vỡ các tế bào và hoà tan các protein. Các chất ức chế proteaza và photphataza thường được thêm vào để ngăn sự phân giải mẫu bởi chính các enzym của nó. Việc điều chế mô thường được thực hiện ở nhiệt độ lạnh để tránh làm biến tính protein.

Các protein của mẫu này được tách ra bằng cách sử dụng điện di gel. Việc tách protein có thể là từ điểm đẳng điện (pI), trọng lượng phân tử, điện tích, hoặc sự kết hợp của các yếu tố này. Bản chất của việc tách phụ thuộc vào việc xử lý mẫu và bản chất của gel. Đây là một cách rất hữu ích để xác định một protein. Cũng có thể sử dụng một gel hai chiều (2-D) mà trải đều các protein từ một mẫu duy nhất ra hai chiều. Các protein

được tách ra theo điểm đẳng điện (độ pH mà ở đó chúng có điện tích toàn phần trung tính) theo chiều đầu tiên, và theo trọng lượng phân tử của chúng theo chiều thứ hai.

Để giúp cho các protein tiếp cận được với bước phát hiện kháng thể, chúng được di chuyển từ bên trong gel lên màng được làm bằng nitroxenluloza hoặc polyvinyliden diflorua (PVDF). Màng này ở mặt trên của gel, và nhiều lớp giấy lọc được đặt trên mặt trên của nó. Các lớp được đặt trong một dung dịch đệm di chuyển lớp giấy bằng hoạt động của mao mạch, mang theo các protein. Một phương pháp khác để di chuyển các protein này được gọi là thấm tách bằng điện và sử dụng một dòng điện để kéo các protein từ gel vào PVDF hoặc màng nitroxenluloza. Các protein di chuyển từ bên trong gel lên màng trong khi duy trì cấu trúc chúng có trong gel. Nhờ quá trình thấm tách này, các protein được tiếp xúc trên một lớp bề mặt mỏng để phát hiện (xem dưới đây). Cả hai loại màng đều được chọn vì các đặc tính liên kết protein không đặc hiệu của chúng (tức là liên kết tất cả các protein đều như nhau). Sự liên kết protein dựa trên các tương tác kị nước, cũng như sự tương tác tích điện giữa màng và protein. Màng nitroxenluloza rẻ hơn PVDF, nhưng dễ hỏng và không bền vững với các lần thử nghiệm lặp đi lặp lại. Tính đồng nhất và hiệu quả tổng thể của việc di chuyển protein từ gel lên màng có thể được thí nghiệm bằng cách nhuộm màng bằng thuốc nhuộm Coomassie Brilliant Blue hoặc Ponceau S. Sau khi di chuyển, các protein được phát hiện bằng cách sử dụng các kháng thể ban đầu đã được đánh dấu, hoặc các kháng thể ban đầu không được đánh dấu, sau đó là phát hiện gián tiếp bằng cách sử dụng protein A đã được đánh dấu hoặc các kháng thể đã được đánh dấu thứ hai liên kết với vùng Fc của các kháng thể ban đầu.

C. Hóa mô miễn dịch

Các kháng thể theo sáng chế cũng có thể được sử dụng thể liên hợp với cả các khối mô nhúng parafin đã được làm đông lạnh tươi và/hoặc cố định focmalin được điều chế cho nghiên cứu bằng phương pháp hóa mô miễn dịch (immunohistochemistry - IHC). Phương pháp điều chế các khối mô từ các mẫu phân tử này đã và đang được sử dụng thành công trong các nghiên cứu IHC trước đây về các yếu tố nhuộm màu khác nhau và được biết đến rộng rãi đối với các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này (Brown *et al.*, 1990; Abbondanzo *et al.*, 1990. Allred *et al.*, 1990).

Tóm lại, các lát cắt đã được làm đông lạnh được điều chế bằng cách thủy hóa lại 50 ng mô "đã được nghiền" và làm đông lạnh ở nhiệt độ phòng trong dung dịch muối

đệm photphat (PBS) trong các viên nang dẻo nhỏ; tạo hạt bằng cách ly tâm; tạo huyền phù lại chúng trong một môi trường nhúng nhớt (OCT); đảo ngược các viên nang và/hoặc tạo hạt lại bằng cách ly tâm; làm lạnh cấp tốc trong isopentan ở -70°C; cắt các viên nang dẻo và/hoặc tháo các ống đông lạnh chứa mô; cố định ống mô trên mâm cặp máy cắt trên bản hiển vi điều lạnh; và/hoặc cắt 25-50 lát cắt liên tiếp từ viên nang này. Theo cách khác, toàn bộ mẫu mô đông lạnh có thể được sử dụng để cắt lát hàng loạt.

Các lát cắt cố định có thể được điều chế bằng phương pháp tương bao gồm việc thủy hóa lại 50mg mẫu trong ống vi ly tâm dẻo; tạo hạt; tạo huyền phù lại trong 10% focmalin để cố định trong 4 giờ; rửa sạch/tạo hạt; tạo huyền phù lại trong 2,5% thạch trắng ấm; tạo hạt; làm mát trong nước đá để làm cứng thạch trắng này; lấy khối mô/thạch trắng ra khỏi ống; thâm nhiễm và/hoặc nhúng khối này trong parafin; và/hoặc cắt đến 50 lát cắt cố định liên tiếp. Một lần nữa, tất cả các mẫu mô có thể được thay thế.

D. Bộ kit phát hiện miễn dịch

Theo các phương án nữa, sáng chế liên quan đến bộ kit phát hiện miễn dịch để sử dụng với các phương pháp phát hiện miễn dịch được mô tả ở trên đây. Vì các kháng thể này có thể được sử dụng để phát hiện virut Chikungunya hoặc các kháng nguyên của virut Chikungunya, các kháng thể này có thể được đưa vào bộ kit. Vì thế, bộ kit phát hiện miễn dịch sẽ bao gồm, trong phương tiện chứa phù hợp, một kháng thể thứ nhất liên kết với virut Chikungunya hoặc kháng nguyên của virut Chikungunya, và một thuốc thử phát hiện miễn dịch tùy ý.

Theo các phương án nhất định, kháng thể virut Chikungunya có thể được liên kết trước với một chất hỗ trợ dạng rắn, như ma trận cột và/hoặc giếng của một đĩa vi chuẩn độ. Chất thử phát hiện miễn dịch của bộ kit này có thể ở dạng bất kỳ trong số các dạng, bao gồm các chất đánh dấu dễ phát hiện được kết hợp hoặc liên kết với kháng thể nhất định. Các chất đánh dấu dễ phát hiện được kết hợp hoặc gắn vào một phối tử liên kết bậc hai cũng được đưa ra. Các phối tử bậc hai điển hình là các kháng thể thứ cấp mà có ái lực liên kết với kháng thể thứ nhất.

Các chất thử phát hiện miễn dịch phù hợp khác để sử dụng trong các bộ kit của sáng chế này bao gồm chất thử hai thành phần bao gồm một kháng thể thứ hai có ái lực liên kết với kháng thể thứ nhất, cùng với một kháng thể thứ ba mà có ái lực liên kết với kháng thể thứ hai, kháng thể thứ ba được liên kết với một chất đánh dấu dễ phát

hiện. Như nêu trên, có một vài chất đánh dấu điển hình đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này và tất cả các chất đánh dấu này có thể được sử dụng theo sáng chế.

Các bộ kit này có thể chứa thêm thành phần được phân ước phù hợp chứa virut Chikungunya hoặc các kháng nguyên của virut Chikungunya, cho dù có được đánh dấu hay không được đánh dấu, có thể được sử dụng để điều chế một đường cong chuẩn đối với một thử nghiệm phát hiện. Các bộ kit này có thể chứa các thể liên hợp kháng thể-chất đánh dấu hoặc ở dạng được liên hợp đầy đủ, ở dạng các hợp chất trung gian, hoặc dưới dạng các nhóm chức riêng biệt được liên hợp bởi người sử dụng kit này. Các thành phần của bộ kit này có thể được đóng gói trong môi trường nước hoặc dưới dạng được làm khô lạnh.

Nói chung, dụng cụ chứa bộ kit bao gồm ít nhất một lọ, ống nghiệm, bình, chai, ống tiêm hoặc phương tiện chứa khác mà có thể chứa kháng thể, hoặc tốt hơn là, được phân ước một cách phù hợp. Các bộ kit theo sáng chế cũng sẽ bao gồm một phương tiện để chứa kháng thể, kháng nguyên và các vật chứa thuốc thử khác để bán trên thị trường. Các vật chứa này có thể bao gồm dụng cụ tiêm hoặc các vật chứa bằng nhựa dẻo được đúc thổi thành các lọ để cất giữ.

VI. Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ được đưa ra sau đây để minh họa các phương án được ưu tiên theo sáng chế. Các kỹ thuật được bộc lộ trong các ví dụ này sẽ được các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này hiểu rằng là các kỹ thuật được phát hiện bởi các tác giả sáng chế để thực hiện sáng chế theo các phương án, và vì thế có thể được xem là cấu thành các phương thức được ưu tiên. Tuy nhiên, các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này, sau khi đọc kỹ bản mô tả sáng chế này, cần phải hiểu rằng nhiều thay đổi có thể được thực hiện theo các phương án cụ thể được bộc lộ và vẫn thu được một kết quả giống hoặc tương tự mà không chệch khỏi tinh thần và phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1 - Các chất và phương pháp

Tách các mAb ở người. Các PBMC thu được từ người khoảng 5 năm sau khi ghi nhận có triệu chứng nhiễm virut CHIKV ở Sri Lanka. Các tế bào B đã được biến nạp trong các đĩa có 384-giếng với EBV với sự có mặt của CpG. Các dung dịch trên bề mặt thu được từ các dòng tế bào lympho của tế bào B đã được sàng lọc để phát hiện sự có mặt của các kháng thể liên kết đặc hiệu với CHIKV của người bằng thử nghiệm ELISA

bằng cách sử dụng vắc xin virut CHIKV hoạt động chủng virut 181/25 làm kháng nguyên. Các tế bào B chuyển nhiễm đã được thu gom và dung hợp với một dòng tế bào u tủy, được phân bố vào các đĩa nuôi cấy và nhân rộng, và được chọn lọc thông qua sự tăng trưởng trong môi trường hypoxanthin-aminopterin-thymidin chứa ouabain. Các tế bào lai được tách dòng bằng cách phân loại đơn bào. Các dung dịch từ tế bào lai được tách dòng phát triển trong môi trường không có huyết thanh được thu gom, làm sạch và cô đặc từ môi trường đã được làm sạch bằng cách sắc ký protein G.

Thử nghiệm trung hòa. Các protein IgG mAb được làm sạch đã được thử nghiệm đối với hoạt tính trung hòa bằng cách sử dụng các hạt đơn vị sao chép virut CHKV (VRPs) hoặc mỗi trong số 4 chủng virut chikungunya sống đại diện cho đặc tính đa dạng di truyền và địa lý. Một VRP CHIKV mã hoá GFP đã được tạo ra bằng cách phát triển một hệ thống hỗ trợ sao chép virut CHIKV ba plasmit trên cơ sở một plasmit chứa ADN bổ trợ có chiều dài đầy đủ của trình tự gen của chủng virut CHIKV SL15649 (GenBank: GU189061.1), bằng cách sử dụng các phương pháp tách dòng trên cơ sở PCR. VRP được ủ với mAb trong các dung dịch loãng và sau đó được tiêm vào các đơn lớp tế bào Vero 81 trong 18 giờ; các tế bào nhiễm và tổng số tế bào (xác định được bằng chất đánh dấu hạt nhân) đã được xác định bằng một hệ thống tạo ảnh huỳnh quang. Để xác định chiều rộng và khả năng trung hoà của mAb, các tác giả sáng chế đã sử dụng bốn chủng virut súng đại diện với ít nhất một đại diện từ mỗi kiểu gen CHIKV, bao gồm một virut nguyên mẫu từ mỗi trong số ba kiểu gen này và một chủng từ đợt dịch bùng phát ở Caribe hiện nay. Hoạt tính trung hòa đã được xác định trong một thử nghiệm trung hoà giảm tập trung. Các dung dịch pha loãng theo thư tự chứa các mAb đã được làm sạch ở người được ủ với 100 đơn vị hình thành tập trung của virut CHIKV ở 37°C trong 1 giờ. Các phức hợp MAb-virut đã được thêm vào các tế bào Vero trong các đĩa có 96 giếng, và sau đó các mảng bám đã được phát hiện sau khi cố định tế bào bằng cách sử dụng thử nghiệm miễn dịch oxy hóa và định lượng bằng máy phân tích vĩ mô ImmunoSpot 5.0.37 (Cellular Technologies Ltd). Trị số EC_{50} này được tính toán bằng cách sử dụng phân tích hồi quy phi tuyến tính sau khi so sánh với các giếng đã được cấy virut CHIKV khi không có mặt kháng thể.

E2 ELISA. Protein vùng ngoại bào E2 của CHIKV tái tổ hợp (tương ứng với chủng CHIKV-LR2006) đã được tạo ra trong E. coli và được hấp phụ vào các đĩa vi

chuẩn độ. Các mAb ở người được đưa vào, sau đó các mAb liên kết đặc hiệu với CHKV đã được phát hiện với IgG của người kháng dê liên hợp với biotin.

Thử nghiệm liên kết cạnh tranh. Các tác giả sáng chế đã xác định các nhóm kháng thể gắn kết với cùng một vị trí của kháng nguyên qua cạnh tranh các cặp kháng thể để liên kết với protein vùng ngoại bào E2 của CHIKV-LR2006 chứa một chất đánh dấu polyhistidin được gắn vào đầu cảm biến sinh học Anti-Penta-His (ForteBio #18-5077) trong một cảm biến sinh học Red Octet (ForteBio).

Kỹ thuật đột biến quét alanin đối với ánh xạ epitop. Một cấu trúc biểu hiện protein có vỏ của virut CHIKV (chủng S27, Uniprot Reference #Q8JUX5) với một chất đánh dấu V5 đầu C đã được đột biến quét alanin để tạo ra một nhóm đột biến toàn diện. Các đoạn mồi làm nhiệm vụ gây đột biến mỗi nhóm trong các vùng E2, 6K, và E1 của các protein có vỏ (các nhóm Y326 đến H1248 trong polyprotein cấu trúc) thành alanin; các codon alanin đã được gây đột biến thành serin. Tổng cộng, có 910 thể đột biến của protein có vỏ của virut CHIKV đã được tạo ra. Sự mất liên kết của các mAb với mỗi cấu trúc đã được thử nghiệm bằng cách sử dụng một thử nghiệm liên kết miễn dịch huỳnh quang, sử dụng huỳnh quang tế bào phát hiện được với máy phân tích theo dòng chảy tế bào năng suất cao.

Cơ chế trung hòa. Các mAb được cho tương tác với các VRP trước hoặc sau khi gắn vào các tế bào Vero 81, sau đó các tế bào được nhuộm màu, chụp ảnh, và phân tích như đã được mô tả đối với các thử nghiệm trung hòa VRP để xác định trong giai đoạn nào các mAb có hiệu quả kháng virut. Các thử nghiệm dung hợp từ bên trong và dung hợp từ ngoài vào đã được thực hiện như đã mô tả chi tiết trong Supplemental Experimental Procedures.

Các nghiên cứu về tác dụng bảo vệ in vivo ở chuột. Những con chuột *Ifnar*$^{-/-}$ đã được nuôi trong các cơ sở nuôi động vật không có vật sinh bệnh và các xét nghiệm truyền nhiễm đã được thực hiện trong các cơ sở A-BSL3. Việc tiêm bàn chân được thực hiện để gây tê. Đối với các nghiên cứu dự phòng, các mAb ở người được tiêm vào màng bụng các con chuột *Ifnar*$^{-/-}$ 6 tuần tuổi 1 ngày trước khi tiêm dưới da trên bàn chân với 10 FFU virut CHIKV-LR. Đối với các nghiên cứu điều trị, 10 FFU virut CHIKV-LR đã được truyền 24, 48 hoặc 60 giờ trước khi dùng một liều duy nhất riêng hoặc kết hợp các mAb ở người với các liều quy định.

Đối tượng người và sự phân lập tế bào máu ngoại vi. Một người trưởng thành khỏe mạnh nhiễm CHIKV vào tháng 10 năm 2006. Các triệu chứng của bệnh nhiễm CHIKV trùng hợp với chuyến đi thăm Sri Lanka 1 năm trước đó, trong thời gian đó bệnh nhân này đã dành thời gian ở các khu vực thành thị (chủ yếu là Colombo) và các khu vực nông thôn, bao gồm rừng nhiệt đới và các khu vực ven biển. Bệnh nhân này bị côn trùng cắn nhiều lần trong chuyến đi, nhưng vẫn có sức khoẻ tốt trong suốt thời gian lưu trú. Khi trở về Hoa Kỳ, đối tượng được đưa tới bác sĩ gia đình với biểu hiện sốt (102°F – 39°C) trong ba ngày. Bệnh nhân này được báo cáo rằng có sự phát triển đồng thời của bệnh đau khớp ở khuỷu tay và ngón tay, và phát ban, không ngứa ở lưng và bụng, kèm theo "đau cơ thể" và nhức đầu. Khi được đưa tới, bệnh nhân có vẻ khá khỏe mạnh, và không có bất kỳ khó khăn nào. Phát ban nhẹ nổi lên, không ngứa và biến mất khi chạm mở rộng trên lưng, ngực và bụng (xem hình 4). Đau mắt đỏ nhẹ đã được ghi nhận. Quá trình xét nghiệm xương gây chú ý bởi có dấu hiệu sưng ngón tay, đầu gối và khuỷu tay, không có ban đỏ hoặc tràn mủ. Sức mạnh của cơ và phạm vi chuyển động của các khớp không gặp nhiều ảnh hưởng , nhưng sự vận động khớp gây ra đau.

Máu đã được lấy để xét nghiệm máu toàn bộ CBC, xét nghiệm huyết thanh và sốt rét, và bệnh nhân này được xuất viện. Số lượng tế bào bạch cầu là 4,0 x 10^4 tế bào/mm^3, dung tích hồng cầu là 41% và số lượng tiểu cầu là 180,000/mm^3. Tổng số bạch huyết bào là 1,0 x 10^4 tế bào/mm^3. Xét nghiệm sốt rét và huyết thanh là âm tính, và bệnh nhân này được chẩn đoán dự kiến là có bệnh do virut không rõ nguyên nhân.

Bệnh nhân này đã trở lại phòng khám hai tuần sau đó, dứt cơn sốt, nhưng với chứng đau khớp liên tục, nổi bật nhất là ở ngón tay. Bệnh nhân này chịu cơn đau đớn và cứng cơ không dứt, và thậm chí tệ hơn so với lần tới trước đó. Bệnh nhân này đã được thông báo rằng có một dịch bùng phát chikungunya đã xảy ra trong khu vực của chuyến đi. Máu đã được lấy và tách huyết thanh và gửi đến CDC để xét nghiệm phản ứng tổng hợp và xét nghiệm huyết thanh, nhằm xác nhận việc chẩn đoán nhiễm virut chikungunya.

Vào tháng 4 năm 2012, năm năm rưỡi sau ca lây nhiễm đầu tiên, các tế bào máu đơn nhân thuộc vùng ngoại vi (PBMCs) đã được phân lập bằng cách tách gradient mật độ trên Ficoll mà không biết rằng đã tiếp xúc với virut CHIKV hoặc các alphavirut gây bệnh viêm khớp khác trong thời gian can thiệp khi đang sống tại Hoa Kỳ. Các tế bào này đã được bảo quản lạnh và cất giữ trong nitơ lỏng cho đến khi nghiên cứu. Quy trình

chọn lọc và thu mẫu máu từ các đối tượng đã được phê duyệt bởi Hội Đồng Duyệt Xét Định Chế của Đại học North Carolina tại Chapel Hill và Trung tâm Y tế Đại học Vanderbilt.

Thế hệ các tế bào lai ở người. Các mẫu PBMC đã được bảo quản lạnh đã được làm rã đông nhanh ở 37°C và rửa sạch trước khi biến nạp bằng virut Epstein-Barr, như được mô tả (Smith tạo et al., 2012). Các mẻ nuôi cấy được ủ ở 37°C với 5% CO_2 trong 10 ngày và được sàng lọc cho sự có mặt của các tế bào sản sinh các kháng thể đặc hiệu với virut CHIKV trong dung dịch trên bề mặt bằng cách sử dụng thử nghiệm trung hòa VRP và ELISA. Các tác giả sáng chế đã thực hiện hai phép biến nạp độc lập bằng cách sử dụng các phần phân ước riêng biệt của cùng một mẫu máu.

Trong lần biến nạp đầu tiên, các tác giả sáng chế đã tạo ra được 3840 mẻ nuôi cấy (10 đĩa x 384-giếng) chứa trung bình 42 cụm tế bào B đã được biến nạp trên mỗi mẻ nuôi cấy, trong tổng số khoảng 161000 cụm tế bào B riêng biệt. Để sàng lọc các kháng thể thể hiện hoạt tính trung hòa chống lại virut CHIKV theo các điều kiện BSL2, các tác giả sáng chế đã phát triển một phương pháp trung hòa giảm huỳnh quang năng suất cao bằng cách sử dụng các đơn vị sao chép CHIKV (các VRP) mà biểu hiện protein huỳnh quang xanh làm chất thông báo. Các VRP là các virion mà biểu hiện các glycoprotein của virut nhưng không có bộ gen hoàn chỉnh của virut và vì vậy không có khả năng sinh ra tế bào nhiễm bệnh (Vander Veen et al., 2012). Các tác giả sáng chế đã sử dụng các VRP có nguồn gốc từ chủng SL15649 (Morrison et al., 2011), mà đã được phân lập từ chủng Sri Lanka năm 2006. Chủng SL15649 sinh ra đồng thời với chủng virut gây bệnh cho người hiến và có thể là rất giống về trình tự. Từ xét nghiệm này, các tác giả sáng chế đã xác định được 160 mẻ nuôi cấy tế bào B với dung dịch trên bề mặt mà trung gian trung hòa ở mức độ ức chế 90%, cho thấy tần suất 0,099% các tế bào B đặc hiệu với virut trên tổng số các tế bào B (khoảng 1 trên 1.000). Tổng cộng 60 dòng này được ức chế ở mức > 98%, và trong lần sàng lọc thứ hai, các dung dịch trên bề mặt từ 58 trong số 60 dòng chứa các kháng thể mà đã liên kết trong ELISA với virut CHIKV được sinh ra trong mẻ nuôi cấy tế bào (chủng 181/25) bắt được trên một đĩa thử miễn dịch. Các tác giả sáng chế đã lựa chọn 35 trong số 58 dòng có hoạt tính liên kết và trung hòa cao nhất đối với sự dung hợp tế bào lai, đã xác định 22 tế bào lai với dung dịch bề mặt liên kết với virut sau khi dung hợp và cấy, và đã phân lập thành công được 14 dòng để nghiên cứu thêm. Trong lần biến nạp thứ hai, các tác giả sáng chế đã tạo ra được 1536

mẻ nuôi cấy (4 đĩa x 384-giếng) chứa trung bình 38 cụm tế bào B đã được biến nạp trên mỗi mẻ nuôi cấy, trong tổng số khoảng 58000 cụm tế bào B riêng biệt được thử nghiệm, cho thấy một tế bào B đặc hiệu với virut có tần suất 0,1% (một lần nữa, khoảng 1 trên 1000). Trong thử nghiệm này, các tác giả sáng chế đã sử dụng một sàng lọc chính của thử nghiệm liên kết ELISA với virut CHIKV chủng 181/25 mà không có một thử nghiệm trung hòa trước đó. Các tác giả sáng chế đã xác định được 60 dòng với tín hiệu mật độ quang học ELISA lớn hơn 4 lần so với mức nền, đã lựa chọn 30 dòng tế bào B với tín hiệu mật độ quang cao nhất trong ELISA đối với sự dung hợp, đã xác định 18 tế bào lai với dung dịch trên bề mặt liên kết với virut sau khi dung hợp và cấy, và đã phân lập thành công 16 dòng để nghiên cứu thêm.

Dung hợp với các tế bào u tủy. Các tế bào thu được từ các giếng với dung dịch trên bề mặt có khả năng trung hòa sự lây nhiễm của virut CHIKV đã được dung hợp với các tế bào u tủy không sinh ra HMMA2.5 như được mô tả (Smith tạo et al., 2012). Các tế bào lai thu đã được lựa chọn bởi mức tăng trưởng trong môi trường hypoxantin-aminpterin-thymidin chứa ouabain, được tách dòng sinh học bằng FACS đơn bào bằng cách sử dụng một máy phân loại tế bào FACSAria III (BD Biosciences), và được mở rộng.

Tạo ra và làm sạch mAb ở người. Các Giếng chứa các tế bào lai sản sinh các kháng thể đặc hiệu với virut CHIKV đã được tách dòng bằng ba mẻ pha loãng có giới hạn hoặc bằng thiết bị ClonePix (các thiết bị phân tử) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Một khi thu được các dòng riêng biệt, mỗi tế bào lai được mở rộng cho đến mức hợp dòng 50% trong các bình thót cổ dung tích 75 cm^2. Đối với sự biểu hiện kháng thể, các tế bào đã được gom lại bởi một que gạt tế bào, rửa sạch trong môi trường không có huyết thanh (GIBCO Hybridoma-SFM từ Invitrogen, 12045084) và chia đều vào bốn bình thót cổ dung tích 225 cm^2 (Corning, 431082) chứa 250 mL môi trường không có huyết thanh. Các tế bào đã được ủ trong 21 ngày trước khi môi trường được làm sạch bởi quá trình ly tâm và đi qua một bộ lọc vô trùng có cỡ ống 0,2 μm. Các kháng thể đã được làm sạch từ môi trường tinh sạch bằng cách sắc ký protein G (GE Life Sciences, các cột Protein G HP).

Tế bào. Các tế bào BHK-21 (ATCC CCL-10) được duy trì trong môi trường thiết yếu tối thiểu alpha (αMEM; Gibco) được bổ sung để chứa 10% huyết thanh thai bò (FBS) và 10% tryptoza photphat (Sigma). Các tế bào Vero 81 (ATCC CCL-81) được

duy trì trong αMEM được bổ sung để chứa 5% FBS. Môi trường đối với tất cả các tế bào được bổ sung để chứa 0,29 mg/mL L-glutamin (Gibco), 100 U/ml penixilin (Gibco), streptomyxin 100 µg/ml (Gibco) và 500 mg/ml amphotericin B. Các tế bào đã được duy trì ở 37°C trong môi trường ẩm chứa 5% CO_2.

Tạo ra các cấu trúc plasmit của CHIKV VRP. Một hệ thống hỗ trợ đơn vị sao chép virut CHIKV ba plasmit thu được từ một plasmit chứa AND bổ trợ có chiều dài đầy đủ có trình tự gen của chủng SL15649 của virut CHIKV (GenBank: GU189061.1) bằng cách sử dụng phương pháp tách dòng trên cơ sở phản ứng chuỗi tổng hợp. Bộ gen của đơn vị sao chép CHIKV được tạo ra bằng cách sử dụng quy trình hai bước bao gồm việc tạo ra một vectơ tách dòng trung gian với cassette cấu trúc có chiều dài đầy đủ của virut CHIKV được thay thế bằng một vị trí đa tách dòng (vị trí đa tách dòng - MCS). Protein huỳnh quang xanh tăng cường (eGFP) được tái tách dòng vào vị trí đa tách dòng của plasmit này để tạo ra pMH41 (đơn vị sao chép CHIKV chủng SL15649 eGFP). Việc tạo ra một hệ thống hỗ trợ hai plasmit bao gồm một quá trình tách dòng đa bước mà đầu tiên gồm việc tạo ra một plasmit hỗ trợ gen cấu trúc có chiều dài đầy đủ nhờ việc loại bỏ phần chính (6.891 nt) của cassette phi cấu trúc CHIKV. Cassette cấu trúc có chiều dài đầy đủ được chia thành hai cấu trúc, pMH38 (vỏ protein của virut CHIKV SL15649 phụ), bao gồm trình tự gen vỏ protein tiếp theo là vị trí hạn chế AvrII duy nhất và pMH39 (trợ bào có glycoprotein của virut CHIKV SL15649), chứa đột biến xóa trong khung của miền liên kết vỏ protein ARN tiếp theo bởi trình tự mã hoá glycoprotein (E3-E1) có vỏ nguyên vẹn.

Tạo ra CHIKV p62-E1 tái tổ hợp. Một plasmit chứa CHIKV p62 (nghĩa là, E3 [aa S1-R64] - E2 [aa S1-E361] -16 liên kết axit amin - E1 [aa Y1-Q411] tiếp theo là một thẻ His) (Voss et al., 2010) đã được chuyển nhiễm vào các tế bào 293F bằng cách sử dụng thuốc thử 293fectin (Invitrogen). Sau 72 giờ ủ, dung dịch trên bề mặt đã được lấy ra, và các tế bào được nuôi cấy thêm trong 72 giờ. Các dung dịch trên bề mặt đã tổng hợp được đổ vào một cột chứa hạt agaroza niken (GoldBio) và được rửa giải bằng imidazol. Protein tiếp tục được làm sạch bằng cột lọc gel Superdex S200 (GE Life Sciences). Các phần phân ước chứa protein CHIKV p62-E1 được tập hợp lại, làm đông lạnh, và bảo quan ở -80°C.

Tạo ra các giống nuôi cấy VRP thu được từ chủng CHIKV SL15649. Các giống nuôi cấy VRP đã được khôi phục từ các plasmit tái tổ hợp CHIKV trong cơ sở có mức

độ an toàn sinh học cấp 3 (BSL3) đã được chứng nhận trong các tủ an toàn sinh học theo các quy trình được khoa Môi trường, sức khỏe và an toàn của trường Đại học Vanderbilt, thuộc ủy ban an toàn sinh học của tổ chức Vanderbilt. Ba hệ thống plasmit của đơn vị sao chép chủng SL15649 đã được làm thẳng mạch bởi sự phân giải bằng Noti-HF, làm sạch bằng cách chiết phenol-cloroform, và được dùng làm các mẫu trong các phản ứng phiên mã bằng cách sử dụng bộ kit phiên mã mMessage mMachine SP6 (Life Technologies) để tạo ra sản phẩm phiên mã ARN có chiều dài đầy đủ, kín in vitro. Các sản phẩm phiên mã ARN của virut đã được đưa vào các tế bào BHK21 bằng cách điện di bằng cách sử dụng một máy điện phân GenePulser. Các dung dịch trên bề mặt nuôi cấy chứa các VRP được thu thập sau 24 giờ sau khi điện di; các dung dịch trên bề mặt được làm trong bằng cách ly tâm ở tốc độ 855×g trong 20 phút, được tạo phân ước, và được bảo quản ở -80°C. Các giống nuôi cấy VRP đã được đánh giá đối với virut tái tổ hợp có khả năng nhân giống bằng cách cấy truyền theo bậc qua 20% các VRP và 10% cấy chuyển một dung dịch trên bề mặt nuôi cấy bằng cách sử dụng các tế bào Vero81, mà đã được kiểm tra hiệu ứng gây bệnh tế bào (CPE) 72 giờ sau khi truyền nhiễm. Các VRP được coi là đã vượt qua kiểm tra an toàn này khi CPE không được phát hiện trong mẻ cấy truyền cuối cùng. Sau đó, các VRP đã được loại bỏ ra khỏi phòng thí nghiệm BSL3.

Trung hòa VRP và thử nghiệm GFP thông báo. Các tế bào Vero 81 (2,25 x 10^3 tế bào/giếng) đã được nuôi cấy vào các giếng của đĩa 384-giếng và ủ ở 37°C trong 24 giờ. Dung dịch trên bề mặt tế bào lai thuần hoặc các dung dịch pha loãng theo bậc chứa các mAb được làm sạch đã được ủ với các VRP ở MOI khoảng 5 đơn vị truyền nhiễm/tế bào trong dung dịch đệm pha loãng chứa virut (VDB; môi trường RPMI chứa 20mM HEPES bổ sung để chứa 1% FBS) ở 37°C trong 1 giờ và sau đó được cho hấp phụ vào các tế bào. Các tế bào đã được ủ ở 37°C trong 18 giờ, nhuộm màu với chủng Hoechst để đánh dấu hạt nhân và lấy hình ảnh bằng cách sử dụng hệ thống tạo ảnh ImageXpress Micro XL (Molecular Devices) tại cơ sở sàng lọc năng suất cao Vanderbilt. Tổng số các tế bào và các tế bào bị nhiễm CHIKV (đã được đánh dấu bởi sự biểu hiện GFP) đã được định lượng bằng phần mềm MetaXpress (Molecular Devices) ở hai phạm vi trên mỗi giếng. Đối với mỗi kháng thể, trị số EC_{50} với 95% khoảng tin cậy được xác định bằng phương pháp hồi quy phi tuyến tính để phù hợp với các đường cong tăng trưởng logistic riêng biệt bằng cách sử dụng chương trình thống kê R (R.C. Team, 2014).

Các virut đã được tạo ra làm kháng nguyên cho thử nghiệm ELISA. Plasmit dòng lây nhiễm đối với chủng vắcxin CHIKV 181/25 (Levitt et al., 1986 và Mainou et al., 2013) đã được làm thẳng mạch với NotI-HF và được phiên mã in vitro bằng cách sử dụng bộ kit phiên mã mMessage mMachine SP6 (Biotechnology). ARN của virut đã được đưa vào các tế bào BHK21 bằng cách điện di. Các dung dịch trên bề mặt nuôi cấy đã được thu hoạch sau 24 giờ, làm trong bằng cách ly tâm ở tốc độ 855×g trong 20 phút, được phân ước, và được bảo quản ở -80°C.

Thử nghiệm ELISA bắt giữ virut để sàng lọc tế bào lai. Liên kết kháng thể với các hạt virut được thực hiện bằng cách phủ đĩa thử nghiệm với mAb CHK-187 ở chuột đã được làm sạch (Pal et al., 2013.), ở nồng độ 1µg/mL trong Na_2CO_3 0,1M và dung dịch đệm liên kết $NaHCO_3$ 0,1M, độ pH=9,3, đã được sử dụng để phủ các đĩa ELISA (Nunc 242757) và ủ ở 4°C qua đêm. Sau khi ủ các đĩa này trong 1 giờ với dung dịch đệm phong bế (1% sữa bột và 2% huyết thanh dê trong PBS với Tween 20 [PBS-T]), các đĩa đã được rửa sạch 5 lần bằng PBS-T và ủ với 25 µL dung dịch trên bề mặt nuôi cấy từ các lớp đơn tế bào BHK21 nhiễm virut CHIKV chủng 181/25. Sau khi ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ, các đĩa đã được rửa 10 lần bằng PBS, và 10 µL dung dịch trên bề mặt nuôi cấy tế bào B đã được thêm vào 25µL/giếng dung dịch đệm phong bế. Các đĩa được ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ trước khi rửa 5 lần bằng PBS-T. Một kháng thể thứ cấp liên hợp với photphataza kiềm (Fc kháng người ở dê; Meridian Life Science, W99008A) đã được sử dụng với độ pha loãng 1:5000 trong 25 µL/giếng dung dịch đệm phong bế, và các đĩa này đã được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Sau 5 lần rửa bằng PBS-T, dung dịch chứa chất nền photphataza (1mg/mL chất nền phosphataza trong Tris aminmetan 1M [Sigma, S0942]) được thêm vào ở 25 µL/giếng, và các đĩa này đã được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ trước khi xác định mật độ quang học ở bước sóng 405 nm bằng cách sử dụng máy đọc đĩa Biotek.

Các mAb ở người đối chứng đặc hiệu với CHIKV. Trong một vài thử nghiệm, hai mAb ở người đặc hiệu với CHIKV đã được mô tả trước đó, 5F10 và 8B10 (Warter et al., 2011), đã được sử dụng làm các đối chứng dương tính. Các mAb này đã được biểu hiện trong các tế bào 293F (Invitrogen) sau khi chuyển nhiễm với một plasmit biểu hiện IgG1 (Lonza) chứa ADN bổ trợ đã được tối ưu hóa trình tự của các vùng gen biến đổi của kháng thể 5F10 và 8B10 này trên cơ sở các trình tự được cung cấp bởi Cheng-I Wang và Alessandra Nardin (Singapore Immunology Network, A*STAR, Singapore).

Thử nghiệm ELISA đối với sự liên kết mAb với protein E2. Protein vùng ngoại bào CHIKV E2 tái tổ hợp (tương ứng với chủng CHIKV-LR2006) đã được tạo ra ở *E. coli* như đã được mô tả (Pal et al.,2013) và được hấp phụ vào các đĩa vi chuẩn độ (100µL dung dịch protein E2 2µg/mL trong dung dịch chứa Na_2CO_3 0,1M, $NaHCO_3$ 0,1M, và NaN_3 0,1% [độ pH=9,3]) ở 4°C qua đêm. Các đĩa đã được rửa 3 lần bằng PBS chứa 0,05% Tween-20, và ủ ở 37°C trong 1 giờ với dung dịch đệm phong bế (PBS, 0,05% Tween-20, và 2% [khối lượng/thể tích] BSA). mAb đầu tiên ở người (pha loãng đến 10µg/mL trong dung dịch đệm phong bế) được thêm vào giếng ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Các đĩa đã được rửa 3 lần bằng PBS chứa 0,05% Tween-20, và kháng thể thứ cấp (IgG kháng người ở dê đã liên hợp với biotin (chuỗi H và L) với tính phản ứng chéo tối thiểu với protein huyết thanh ở chuột (Phòng thí nghiệm Jackson ImmunoResearch) đã được pha loãng theo tỷ lệ 1/20.000 trong dung dịch phong bế) và peroxidaza ở củ cải ngựa đã được liên hợp với streptavidin (pha loãng trong PBS với 0,05% Tween-20, Phòng thí nghiệm Vector) đã được thêm tuần tự, mỗi lần ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ với việc rửa đĩa giữa các bước. Sau 4 lần rửa bằng PBS, các đĩa được ủ ở nhiệt độ trong phòng với 100µL dung dịch chứa chất nền sắc ký TMB (3,3',5,5'-tetrametylbenzidin) trong 5 phút, và phản ứng đã được dừng lại bằng cách thêm H_2SO_4 2N. Mật độ của sản phẩm đã được xác định bằng cách sử dụng máy đọc đĩa ELISA ở mật độ quang học của bước sóng 450 nm.

Phép đo ái lực bằng cộng hưởng plasmon bề mặt. Các tương tác giữa các mAb ở người đã được làm sạch và protein của virut CHIKV đã được phân tích bằng động lực bằng cách sử dụng thiết bị Biacore T100 như được mô tả (Austin et al., 2012). Đối với IgG nguyên vẹn với CHIKV p62-E1 hòa tan, các kháng thể IgG kháng người (GE Life Sciences) đã được cố định vào chip Series S CM5 và được sử dụng để bắt giữ kháng thể kháng CHIKV hoặc kháng thể đối chứng (hu-WNV E16). CHIKV p62-E1 được tiêm lên bề mặt chip với lưu lượng 65µL/phút trong 180 giây và được để phân ly trong 1000 giây trước khi tái tạo với dung dịch $MgCl_2$ 3M giữa các chu kỳ. Một vài kháng thể không liên kết với protein E1 đơn phân, do đó các tác giả sáng chế đã thử nghiệm chúng để liên kết với các VLP. Đối với các phép đo động lực với CHIKV VLP, các kháng thể IgG kháng chuột (GE Life Sciences) đã được cố định để bắt giữ một tập hợp các kháng thể kháng CHIKV ở chuột với các ái lực dưới nanomol, mà được sử dụng để bắt giữ các CHIKV VLP. IgG kháng CHIKV hoặc Fab được tiêm lên bề mặt chip với lưu lượng 65

µL/phút trong 180 giây và được để phân ly trong 1000 giây trước khi tái tạo với dung glyxin 10mM có độ pH=1,7 giữa các chu kỳ. Tất cả dữ liệu đã được xử lý bằng cách sử dụng phần mềm Biacore Evaluation Software (Phiên bản 1.1.1) và phù hợp với hằng số Langmuir theo tỷ lệ 1:1 của các đường cong. Các kết quả thu được từ ít nhất ba xét nghiệm độc lập.

Các chủng virut dùng trong các thử nghiệm trung hòa giảm ổ bệnh. Để xác định chiều rộng và khả năng trung hoà của mAb, các tác giả sáng chế đã sử dụng bốn chủng đại diện với ít nhất một đại diện từ mỗi kiểu gen CHIKV, bao gồm một virut nguyên mẫu từ mỗi trong số ba kiểu gen này và cũng là một chủng từ dịch bùng phát ở vùng Caribê hiện nay. Chủng LR2006_OPY1 (LR) (kiểu gen CHIKV Đông/Trung/Nam Phi [ECSA]) được cung cấp bởi Stephen Higgs (Manhattan, KS). Chủng NI 64 IBH 35 (kiểu gen Tây Phi) và các chủng RSU1 và 99659 (kiểu gen Châu Á; đã được phân lập vào năm 2014 từ một đối tượng ở quần đảo Virgin thuộc Anh (Lanciotti & Valadere, 2014)) được cung cấp bởi Robert Tesh (World Reference Center for Emerging Viruses and Arbovirut es, Galveston, TX).

Thử nghiệm trung hòa giảm ổ bệnh (FRNT) với CHIKV lây nhiễm. Các dung dịch pha loãng theo bậc chứa các mAb đã được làm sạch ở người được ủ với 100 đơn vị tạo mảng (FFU) chứa virut CHIKV ở 37°C trong 1 giờ. Các phức hợp mAb-virut đã được thêm vào các tế bào Vero trong các đĩa 96-giếng. Sau 90 phút ủ, các tế bào đã được phủ với 1% (trọng lượng/thể tích) metylxeluloza trong Modified Eagle Media (MEM) được bổ sung để chứa 2% FBS. Các tế bào đã được ủ trong 18 giờ và cố định với 1% parafocmaldehyt trong PBS. Các tế bào đã được ủ tuần tự với 500ng/mL CHK-11 ở chuột (Pal et al., 2013) và IgG kháng chuột ở dê đã được liên hợp với peroxidaza ở củ cải ngựa (HRP) trong PBS được bổ sung để chứa 0,1% saponin và 0,1% albumin huyết thanh bò (BSA). Các ổ bệnh bị nhiễm CHIKV được minh họa bằng cách sử dụng chất nền peroxidaza TrueBlue (KPL) và đã được định lượng bằng máy phân tích lớn ImmunoSpot 5.0.37 (Cellular Technologies Ltd). Trị số EC_{50} đã được tính toán bằng cách sử dụng phép phân tích hồi quy phi tuyến sau khi so sánh với các giếng đã được tiêm CHIKV không có mặt kháng thể.

Thử nghiệm giao thoa kế liên kết cạnh tranh lớp sinh học. Protein miền ngoài E2 của virut CHIKV-LR2006 chứa một thẻ polyhistidin (20 µg/mL) đã được cố định lên các đầu của máy cảm biến sinh học Anti-Penta-His (ForteBio #18-5077) trong 2

phút. Sau khi xác định tín hiệu cơ bản trong dung dịch đệm động lực (KB, 1X PBS, 0,01% BSA và 0,002% Tween 20) trong 1 phút, các đầu cảm biến sinh học này được nhúng vào trong các giếng chứa kháng thể ban đầu ở nồng độ 100µg/mL trong 5 phút và sau đó nhúng vào trong các giếng có chứa các mAb cạnh tranh ở nồng độ 100µg/mL trong 5 phút. Tỷ lệ phần trăm liên kết của mAb cạnh tranh khi có mặt mAb thứ nhất đã được xác định bằng cách so sánh các tín hiệu tối đa của mAb cạnh tranh được sử dụng sau khi phức hợp mAb ban đầu với tín hiệu tối đa của riêng mAb cạnh tranh. Các kháng thể đã được đánh giá để cạnh tranh liên kết với cùng một vị trí nếu liên kết tối đa của riêng mAb cạnh tranh giảm xuống dưới 30% ái lực liên kết riêng. Các kháng thể được coi là không cạnh tranh nếu liên kết tối đa của mAb cạnh tranh là > 70% của liên kết không cạnh tranh. Mức độ 30-70% của liên kết không cạnh tranh được coi là sự cạnh tranh trung gian.

Ánh xạ epitop đột biến. Một cấu trúc biểu hiện protein có vỏ của virut CHIKV (chủng S27, Uniprot Reference #Q8JUX5) với đầu C của thẻ V5 đã được đột biến quét alanin để tạo ra một nhóm gây đột biến đầy đủ. Các đoạn mồi đã được tạo ra để gây đột biến mỗi phần dư trong vùng E2, 6K, và E1 của các protein có vỏ (các phần dư Y326 đến H1248 trong polyprotein cấu trúc) với alanin; các codon alanin đã được gây đột biến với serin (Fong et al., 2014). Tổng cộng, có 910 biến thể protein có vỏ của virut CHIKV đã được tạo ra (98,5% diện tích phủ), trình tự đã được xác định và đã được xếp vào các đĩa có 384-giếng. Các tế bào HEK-293T đã được chuyển nhiễm bằng nhóm đột biến CHIKV trong các đĩa có 384-giếng và được ủ trong 22 giờ. Các tế bào đã được cố định trong parfocmaldehyt 4% (Electron Microscopy Sciences) trong PBS cộng thêm canxi và magie (PBS +/+) và nhuộm màu với các mAb đã được làm sạch ở nồng độ từ 0,25 đến 1,0µg/mL hoặc các mảnh Fab đã được làm sạch ở 2,5µg/mL pha loãng trong 10% huyết thanh dê thông thường (NGS, Sigma). Nồng độ kháng thể ban đầu đã được xác định bằng cách sử dụng một đường cong chuẩn độ miễn dịch huỳnh quang độc lập chống lại các protein có vỏ của virut CHIKV tự nhiên để đảm bảo rằng các tín hiệu nằm trong phạm vi phát hiện tuyến tính . Các kháng thể đã được phát hiện bằng cách sử dụng 3,75µg/mL kháng thể thứ cấp được liên hợp với AlexaFluor488 (Jackson ImmunoResearch Laboratories) trong NGS 10%. Các tế bào đã được rửa hai lần bằng PBS mà không có magie và canxi (PBS -/-) và được tạo huyền phù lại trong Cellstripper (Cellgro) với 0,1% BSA (Sigma). Huỳnh quang tế bào trung bình được phát hiện bằng

cách sử dụng một máy phân tích tế bào theo dòng năng suất cao (HTFC, Intellicyt). Hoạ tính của kháng thể chống lại mỗi dòng đột biến đã được tính toán có liên quan đến hoạt tính của protein tự nhiên bằng cách bỏ đi tín hiệu từ các đối chứng chuyển nhiễm giả và chuẩn hoá theo tín hiệu từ các đối chứng chuyển nhiễm tự nhiên. Axit amin đã được xác định là cần thiết đối với liên kết mAb nếu biến thể alanin tương ứng không phản ứng với mAb thử nghiệm nhưng phản ứng với các kháng thể của virut CHIKV khác. Chiến lược sàng lọc đối lập này tạo điều kiện cho việc loại trừ các biến thể mà bị cuộn gập sai hoặc có khiếm khuyết biểu hiện (Christian et al., 2013, Paes et al., 2009 và Selvarajah et al., 2013). Các axit amin cần thiết đối với liên kết kháng thể được minh họa trên cấu trúc tinh thể protein có vỏ của virut CHIKV (đơn phân PDB ID #3N41 và đoạn mồi PDB ID #2XFB) bằng cách sử dụng phần mềm PyMol.

Các thử nghiệm sự trung hòa trước và sau liên kết. Các tế bào Vero 81 (ATCC CCL-81; khoảng 7,5 x 10^3 tế bào/giếng) được cấy vào các giếng của các đĩa có 96-giếng và ủ ở 37°C trong khoảng 24 giờ. Đối với các thử nghiệm trước liên kết, các dung dịch pha loãng chứa mAb đã được giữ ở 4°C trong dung dịch đệm pha loãng virut (VDB) và ủ trước đó với các VRP ở 4°C trong 1 giờ. Các phức hợp kháng thể-virut đã được thêm vào các tế bào Vero 81 ướp lạnh trước ở 4°C trong 1 giờ. Virut không bị hấp phụ đã được loại bỏ bằng ba lần rửa bằng VDB, và các tế bào đã được ủ trong môi trường đầy đủ ở 37°C trong 18 giờ. Các thử nghiệm sau liên kết được thực hiện theo cách tương tự, trừ một đương lượng MOI của cácVRP đầu tiên được hấp phụ vào các tế bào Vero 81 ở 4°C trong 1 giờ, các VRP không liên kết đã được loại bỏ bằng ba lần rửa với dung dịch đệm pha loãng virut, và các tế bào đã được ủ với VDB được ướp lạnh từ trước chứa các dung dịch pha loãng theo bậc chứa mAb ở 4°C trong 1 giờ. Các mAb không liên kết được loại bỏ bằng ba lần rửa bằng VDB, và tế bào được ủ trong môi trường đầy đủ ở 37°C trong 18 giờ. Các tế bào đã được nhuộm màu, chụp ảnh, và phân tích như được mô tả với các thử nghiệm trung hòa VRP, với bốn phạm vi lấy mẫu mỗi giếng, thu được tổng cộng khoảng 800 đến 1000 tế bào đã được phân tích đối với biểu hiện GFP cho mỗi mẫu.

Thử nghiệm ức chế sự dung hợp. Việc Dung hợp virut vào màng tương bào đã được đánh giá bằng cách sử dụng một thử nghiệm FFWO (Edwards & Brown, 1986). Các tế bào Vero 81 (khoảng 3,75 x 10^3 tế bào/giếng) đã được cấy vào các giếng của các đĩa có 96-giếng và ủ ở 37°C trong khoảng 24 giờ. Các tế bào được rửa một lần bằng môi

trường liên kết (RPMI 1640 bổ sung để chứa 1% FBS, HEPES 25 mM [độ pH=7,4] và NH_4Cl 20mM để ngăn ngừa sự lây nhiễm thông qua sự dung hợp ngoại bào) và ủ trong môi trường liên kết ở 4°C trong 15 phút. Vật cấy chứa các VRP đã được pha loãng trong môi trường liên kết và ủ với các tế bào ở 4°C trong 1 giờ. Các VRP không liên kết được loại bỏ bởi hai lần rửa với môi trường liên kết. Các dung dịch pha loãng theo bậc chứa các mAb trong VDB được ủ với các tế bào ở 4°C trong 1 giờ, và mAb liên kết đã được loại bỏ bằng hai lần rửa bằng VDB. FFWO được tạo ra bởi việc bổ sung môi trường dung hợp được làm nóng trước đó (RPMI 1640, 1% FBS, HEPES 25 mM, và axit sucxinic 30mM ở độ pH = 5,5) ở 37°C trong 2 phút. Trong các giếng song song, môi trường đối chứng (RPMI 1640, 1% FBS, HEPES 25mM ở độ pH = 7,4) đã được thêm vào ở 37°C trong hai phút. Môi trường đã được loại bỏ và các tế bào được ủ trong DMEM bổ sung để chứa 5% FBS, NH_4Cl 20mM (để đảm bảo rằng việc lây nhiễm chỉ xảy ra thông qua sự dung hợp màng tương bào phụ thuộc vào độ pH) và HEPES 25mM [độ pH = 7,4]. Vào thời điểm 18 giờ sau khi nhiễm, các tế bào được nhuộm màu, chụp ảnh, và phân tích như đã được mô tả, với bốn phạm vi lấy mẫu mỗi giếng, thu được tổng cộng khoảng 800 đến 1000 tế bào đã được phân tích đối với biểu hiện GFP cho mỗi mẫu.

Các nghiên cứu về sự bảo vệ in vivo ở chuột. Nghiên cứu này đã được thực hiện theo đúng các khuyến cáo trong the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health. Các quy trình này đã được chấp thuận bởi Uỷ ban Chăm sóc và Sử dụng Động vật của Trường Đại học Dược Washington (Số hợp đồng bảo đảm: A3381-01). Chuột $Ifnar^{-/-}$ được nuôi tại các cơ sở chăn nuôi không mầm bệnh tại Trường Đại học Dược Washington, và các xét nghiệm nghiệm lây nhiễm được thực hiện tại các cơ sở A-BSL3 với chứng nhận của Ủy ban nghiên cứu động vật Đại học Washington. Tiêm bàn chân được thực hiện để gây tê được tạo ra và duy trì bởi ketamin hydroclorua và xylazin. Đối với các nghiên cứu phòng bệnh, các mAb ở người đã được tiêm qua màng bụng chuột $Ifnar^{-/-}$ 6 tuần tuổi 1 ngày trước khi tiêm dưới da tại bàn chân với 10 FFU CHIKV-LR pha loãng trong HBSS với 1% FBS bất hoạt bằng nhiệt. Đối với các nghiên cứu điều trị bệnh, 10 FFU CHIKV-LR đã được đưa vào cơ thể 24, 48 hoặc 60 giờ trước khi dùng một liều riêng duy nhất hoặc kết hợp các mAb ở người với các liều quy định.

Ví dụ 2 - Kết quả

Phân lập các các mAb ở người đặc hiệu với CHIKV. Các tác giả sáng chế đã phân lập một nhóm các mAb từ một cá thể bị nhiễm CHIKV ở Sri Lanka vào năm 2006 và đã được đưa đến với tình trạng sốt, đau khớp và phát ban (Hình. 4). Các tiến trình lâm sàng và biến đổi tế bào B và các quy trình sàng lọc được cung cấp trong Online Methods (phương pháp trực tuyến). Các tác giả sáng chế đã biến đổi tế bào B trong hai thử nghiệm riêng biệt từ một mẫu máu thu được từ người hiến tặng trong 5 năm rưỡi sau khi nhiễm virut tự nhiên. Họ quan sát thấy tần suất tế bào B đặc hiệu nhiễm virut trong khoảng 1 trong tổng số 1,000 tế bào B và đã tạo ra được 30 tế bào lai ổn định từ các dòng tế bào B sinh ra các kháng thể liên kết với virut. Nhóm mAb chứa các IgG của các phân lớp, với 24 IgG1, ba IgG2, và hai IgG3; một IgG không xác định do sự tăng trưởng tế bào lai kém (Bảng 5).

Đánh giá sự trung hoà mAb. Mười tám trong số các mAb đã thể hiện hoạt tính trung hòa kháng lại các hạt thông báo của virut chủng SL15649-GFP của CHIKV châu Á (VRPs) với trị số EC_{50} <40ng/mL, với mười một mAb thể hiện hoạt tính siêu ức chế (xác định khi trị số EC_{50} <10 ng / mL, Bảng 5). Bốn loại mAb có hoạt tính ức chế kém (EC_{50} nằm trong khoảng từ 0,1 đến 5μg/mL) và tám loại mAb không có hoạt tính ức chế ở nồng độ cao nhất được thử nghiệm (trị số EC_{50} > 10μg/mL).

Độ rộng của hoạt tính trung hòa. Các tác giả sáng chế xác định các trị số EC_{50} đối với mỗi kháng thể kháng lại các chủng CHIKV gây nhiễm đại diện cho các chủng có kiểu gen Đông/Trung/Nam Phi (ECSA) (chủng LR2006 OPY1 [LR]), kiểu gen Tây Phi (chủng NI 64 IbH 35), và Kiểu gen châu Á (chủng RSU1 và 99659 [2014 Caribê]) bằng cách sử dụng thử nghiệm trung hòa giảm tập trung cao (FRNT) (Pal et al., 2013). Hai mươi lăm trong số các mAb thể hiện hoạt tính trung hòa kháng lại ít nhất một chủng CHIKV (trị số EC_{50} <10μg/mL), với tám loại mAb thể hiện khả năng trung hòa trong phạm vi rộng (trị số EC_{50} nằm trong khoảng từ 10 đến 99ng/mL), và mười ba loại mAb thể hiện khả năng trung hòa trong phạm vi siêu rộng (trị số EC_{50} <10ng/mL) (Bảng 5). Nhằm mục đích so sánh, các tác giả sáng chế cũng đã thử nghiệm các loại mAb ở người là 5F10 và 8B10 đã gặp trước đây kháng lại các virut có cả ba kiểu gen, và trong mọi trường hợp, trị số EC_{50} >100ng/mL (nằm trong khoảng từ 161 đến 1337). Trong hầu hết các trường hợp, các mAb mà các tác giả sáng chế phân lập được thể hiện hoạt tính trung hòa tương tự kháng lại virut có cả ba kiểu gen. Sáu loại mAb (2B4, 2H1, 4J21, 4N12, 5M16 và 9D14) ức chế các virut có cả ba kiểu gen với siêu hoạt tính (trị số EC_{50}

<10ng/mL). Các dữ liệu này chỉ ra rằng một đối tượng có thể phát triển nhiều kháng thể đặc hiệu có khả năng vô hiệu hóa cao và rộng với CHIKV.

Liên kết với protein E2. Protein E2 của virut CHIKV là đích chính của sự đáp ứng miễn dịch ở chuột (Goh et al., 2013; Lum et al., 2013), ở động vật linh trưởng ngoài con người (Kam et al., 2014), và ở người (Fong et al., 2014; Kam et al., 2012a; Kam et al., 2012b; Selvarajah et al., 2013). Các tác giả sáng chế đã thử nghiệm các loại mAb ở người để gắn vào một dạng đơn phân của vùng ngoại bào của protein E2 đã được biểu hiện trong E. coli (Pal et al., 2013). Chín loại mAb liên kết chặt chẽ với vùng ngoại bào E2, sáu loại mAb thể hiện liên kết ở mức vừa phải, một mAb thể hiện liên kết yếu, và mười bốn mAb không liên kết được trên nền (Bảng 5). Khả năng liên kết với protein E2 đã được làm sạch in vitro không tương quan trực tiếp với khả năng trung hoà (Bảng 5). Một nhóm nhỏ 17 loại mAb ở người đã được thí nghiệm bằng cách sử dụng một thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt để gắn vào protein p62-E1 thu được từ các tế bào ở động vật có vú (Voss et al., 2010). Tất cả các mAb liên kết trong khoảng nM, với trị số K_D nằm trong khoảng từ 0,5 đến 20nM. Sự khác nhau trong động học liên kết không tương quan với tính đặc hiệu kháng nguyên hoặc hoạt tính chức năng (Bảng S1).

Nghiên cứu liên kết cạnh tranh. Để xác định các vùng kháng nguyên không chồng lặp trong protein E2 tái tổ hợp được nhận biết bởi các mAb trung hòa khác nhau, các tác giả sáng chế đã sử dụng một thử nghiệm liên kết cạnh tranh định lượng. Để so sánh, họ cũng đánh giá bốn loại mAb ở chuột đã được mô tả trước đó (CHK-84, CHK-88, CHK-141, và CHK-265) (Pal et al., 2013) và mAb 5F10 ở người đã mô tả trước đó (Warter et al., 2011) (Hình. 5). Mô hình cạnh tranh rất phức tạp, nhưng có ba nhóm cạnh tranh chính là rõ rệt, các tác giả sáng chế đã quy định nhóm 1 (hộp đỏ), nhóm 2 (các hộp màu xanh da trời) hoặc nhóm 3 (hộp màu xanh lá cây). Các tác giả sáng chế cũng đã xác định một nhóm thứ tư chứa một mAb ở người, 5F19 (hộp màu cam). Các nghiên cứu cạnh tranh này gợi ý rằng có ba vùng kháng nguyên chính được nhận biết bởi các kháng thể đặc hiệu với virut CHIKV.

Ánh xạ epitop bằng cách sử dụng sự đột biến quét alanin. Các tác giả sáng chế đã sử dụng một nhóm đột biến quét alanin kết hợp với sự biểu hiện trên cơ sở tế bào và đếm tế bào theo dòng chảy để xác định các axit amin trong các protein E2 và E1 của chủng virut CHIKV S27 (kiểu gen ECSA) cần thiết để liên kết kháng thể (Fong et al., 2014) (Hình. 6A-F). Các nhóm cần thiết cho kháng thể liên kết với các glycoprotein của

virut CHIKV đối với một nhóm nhỏ 20 loại mAb ở người được liệt kê trong Bảng 6. Các đột biến ảnh hưởng đến sự liên kết của 20 loại mAb này được biểu thị ở sự sắp xếp các trình tự E2 có chiều dài đầy đủ của chủng S27 và các chủng đại diện cho tất cả các kiểu gen của virut CHIKV đã được sử dụng trong nghiên cứu này (Hình. 1A). Các axit amin trong E2 ảnh hưởng đến sự liên kết chủ yếu nằm trong các vùng tiếp xúc với dung môi của các miền A và B và các cung 1 và 2 của đầu nối dải β liên kết các miền A và B (Voss et al., 2010) (Hình. 1A). So sánh các vị trí kháng nguyên đã được xác định bằng các thử nghiệm mất liên kết bằng cách sử dụng sự đột biến quét alanin với phân tích liên kết cạnh tranh (Hình. 5) cho thấy các nhóm cạnh tranh 1 và 2 thường tương ứng với các vị trí trong phạm vi miền A và các vòm, trong khi nhóm 3 tương ứng với các vùng trong miền B.

Phân tích cấu trúc của các vùng kháng nguyên. Một lượng lớn và đa dạng các phần dư trên bề mặt trong các miền A và B và các vòm được tiếp xúc bởi ít nhất một trong số các mAb (Hình. 1B-C). Hai vùng kháng nguyên chính trong E2 giải thích cho sự liên kết nhiều mAb. Vùng đầu tiên nằm trong miền A, giữa các axit amin 58 và 80, và chứa miền liên kết với thụ thể giả định (RBD) (Sun et al., 2014; Voss et al., 2010). Vùng thứ hai nằm trong miền B, giữa các axit amin 190 và 215. Cả hai vùng trình tự cách xa vỏ virut và nằm gần đỉnh đoạn mồi E2 (Hình. 6A-F và 7).

Cơ chế trung hòa. Các tác giả sáng chế đã thực hiện các thử nghiệm trung hòa trước và sau khi liên kết bằng cách sử dụng các mAb biểu hiện một dải các hoạt tính ức chế. Như kỳ vọng, tất cả 5 loại mAb thử nghiệm đã trung hòa sự nhiễm vi sinh một cách có hiệu quả khi ủ trước với các VRP (Hình. 2A). Tuy nhiên, mAb 4B8 không trung hòa các VRP hoàn toàn ngay cả ở nồng độ cao, cho thấy sự có mặt của một phần nhỏ các virion của virut CHIKV kháng mAb này; kiểu hình này cũng đã được quan sát trong các thử nghiệm sử dụng các chủng CHIKV sống tương ứng với ba kiểu gen khác biệt của virut CHIKV (dữ liệu không được thể hiện). Ngược lại, các mAb 3E23, 4J21, 5M16 và 9D14 trung hòa hoàn toàn sự nhiễm vi sinh khi được dùng trước khi liên kết. Tất cả năm loại mAb ở người đều trung hòa sự nhiễm CHIKV khi bổ sung vào sau khi liên kết, nhưng các tác giả sáng chế đã quan sát thấy ba kiểu hình hoạt tính khác nhau (Hình. 2A). MAb 4B8 không có khả năng trung hòa hoàn toàn khi được bổ sung vào sau khi liên kết, và một phần nhỏ các virion kháng lớn hơn so với phần nhỏ qua sát được sau sự trung hoà trước liên kết. MAb 9D14 trung hòa các VRP với hiệu quả như nhau cho dù

được thêm vào trước hoặc sau liên kết. Các mAb 3E23, 4J21 và 5M16 thể hiện sự trung hòa hoàn toàn các VRP, nhưng hiệu quả trung hòa sau liên kết thấp hơn so với sau sự trung hoà trước liên kết. Các mAb 2H1 và 4N12 cũng có hiệu quả trung hòa các VRP khi được thêm vào trước hoặc sau liên kết (Hình. 8).

Xét nghiệm dung hợp từ bên ngoài (FFWO) thử nghiệm năm loại mAb siêu trung hòa (3E23, 4B8, 4J21, 5M16 hoặc 9D14) cho thấy rằng tất cả đều ức chế sựu dung hợp (Edwards and Brown, 1986). Như dự kiến, khi các virion đã được xử lý trước bằng các mAb được ủ liên tục với môi trường đệm ở độ pH trung tính, có rất ít hoặc không hề có sự nhiễm vi sinh nào được quan sát thấy (Hình. 2B). Nếu không có phương pháp điều trị bằng kháng thể, một xung ngắn của môi trường đệm độ pH có tính axit sẽ dẫn đến các tế bào bị nhiễm vi sinh, thể hiện sự dung hợp giữa vỏ virut và màng tương bào. Điều đáng chú ý là, cả 5 loại mAb ở người đều ức chế sự dung hợp màng tương bào và sự nhiễm vi sinh, với mAb 9D14 thể hiện tính hiệu quả cao nhất trong thử nghiệm này. Các nghiên cứu này cho thấy các mAb có tính trung hòa cao ngăn chặn sự dung hợp CHIKV.

MAb phòng bệnh in vivo. Các tác giả sáng chế đã thử nghiệm nhóm nhỏ các mAb thể hiện các mức độ đa dạng khác nhau của hoạt tính trung hòa (Bảng 7) trong một mẫu lây nhiễm gây tử vong với các con chuột Ifnar$^{-/-}$ suy giảm miễn dịch cao 6 tuần tuổi. Các con chuột đã được điều trị trước một liều đơn 5 µg (khoảng 3mg/kg) các mAb kháng CHIKV ở người hoặc một mAb đối chứng isotyp đặc hiệu với mẫu virut Tây sông Nile (WNV hE16) 24 giờ trước khi tiêm dưới da với liều gây tử vong của CHIKV- LR2006. Tất cả chuột được điều trị bằng mAb đối chứng isotyp đã trải qua phơi nhiễm 4 ngày sau khi tiêm. Việc điều trị với các mAb 4B8, 4J21, hoặc 5M16 hoàn toàn bảo vệ các con chuột Ifnar$^{-/-}$, trong khi điều trị với các mAb 3E23 hoặc 9D14 chỉ bảo vệ một phần các con chuột bị nhiễm virut, với tỉ lệ sống sót 67% (Hình. 3A). Đáng ngạc nhiên là, mAb 2D12, có khả năng trung hòa yếu in vitro, lại bảo vệ được 83% số chuột.

MAb điều trị sau khi tiếp xúc in vivo. Các con chuột Ifnar$^{-/-}$ đã được tiêm một liều gây tử vong của virut CHIKV-LR2006 và sau đó tiêm một liều đơn các mAb đại diện 50µg (khoảng 3mg/kg) 24 giờ sau khi tiêm virut. Việc sử dụng các mAb để điều trị đã đem lại sự bảo vệ hoàn toàn, trong khi mAb đối chứng isotyp không đem lại sự bảo vệ nào (Hình. 3B). Để xác định rõ hơn một phương pháp điều trị có hiệu quả, các con chuột Ifnar$^{-/-}$ được cho dùng liều đơn các mAb đại diện 250µg (khoảng 14mg/kg) 48 giờ sau khi dùng liều với virut CHIKV-LR2006. Việc điều trị bằng 5M16, 4J21 và 4B8 đã

lần lượt bảo vệ 85%, 50% và 12,5% số chuột (Hình. 3C). Đáng lưu ý là, đơn liều trị liệu với 4N12 thời điểm sau 60 giờ đã bảo vệ 100% số chuột khi sử dụng ở liều 500 µg (khoảng 28 mg/kg) (Hình. 3D). Các dữ liệu này xác định rằng các mAb ở người có thể bảo vệ chống lại sự tử vong do CHIKV gây ra, ngay cả trong khoảng thời gian sau khi sự nhiễm virut được thiết lập.

Tương tự, các nghiên cứu được thực hiện ở chuột WT để đánh giá ảnh hưởng của các mAb ở người đến bệnh viêm khớp cấp và mãn tính do CHIKV gây ra. Các mAb đã được dùng vào ngày 1 hoặc 3 sau khi nhiễm virut và tải lượng virut hoặc ARN được phân tích ở ngày 3, ngày 5 hoặc ngày 28 sau khi bị nhiễm virut. Tùy thuộc vào mô và thời gian được kiểm tra, 1H12 hoặc 4J14 tạo ra sự bảo vệ kháng virut rõ rệt nhất. 4N12 cũng đem lại sự bảo vệ đáng kể trong các xét nghiệm này.

Liệu pháp kết hợp mAb in vivo. Do khả năng lựa chọn sự đề kháng in vivo ở vật nuôi đã được điều trị bằng một mAb kháng CHIKV (Pal et al., 2013), các tác giả sáng chế đã kiểm tra xem liệu sự kết hợp giữa hai loại mAb kháng CHIKV ở người có thể bảo vệ chuột chống lại sự tử vong do virut gây ra hay không. Các tác giả sáng chế chọn các cặp mAb trung hòa trên cơ sở hiệu lực của mỗi mAb in vitro. Chuột $ifnar^{-/-}$ đã được cho tiêm một liều điều trị kháng thể kết hợp duy nhất (250 µg mỗi liều, tổng cộng khoảng 28 mg/kg) chứa các mAb có hiệu quả nhất 60 giờ sau khi tiêm nhiễm. Mặc dù một vài kết hợp mAb ([4J21 + 2H1] và [4J21 + 5M16] tạo ra sự bảo vệ rất ít hoặc không có, các cặp khác ([4J21 + 4N12]) đem lại tỷ lệ sống sót 63% vào thời điểm rất muộn (Hình. 3D). Do đó, liệu pháp kết hợp mAb để bảo vệ chống lại sự lây nhiễm CHIKV gây tử vong ở các con chuột bị suy giảm miễn dịch ngay cả khi dùng lượng lớn trong khoảng thời gian từ 24 đến 36 giờ sau khi chúng chết. Trong bối cảnh này, 4N12 hoạt động kém hiệu quả hơn khi kết hợp với 4J21 hơn là trong liều đơn, mặc dù liều 4N12 trong các thử nghiệm liều đơn (500 µg) gấp đôi so với thành phần 4N12 trong liệu pháp kết hợp (250 µg).

Bảng S1: Động lực học của các kháng thể ở người kháng CHIKV liên kết với kháng nguyên đo được bằng SPR

Giá trị ka, kd, KD là giá trị trung bình có độ lệch chuẩn ±, KD = kd/ka; $t_{1/2}$= (ln(2)/kd)/60.

MAb của virut CHKV	Phối tử	ka (10^6M-1s-1)	kd (10^{-4}s-1)	KD (nM)	$t_{1/2}$(phút)
5M16	p62-E1	1,09 ± 0,02	1,13 ± 0,02	1,03 ± 0,01	102 ± 2
5M16 Fab	VLP	1,19 ± 0,01	0,84 ± 0,13	7,07 ± 1,06	137 ± 21
4J21	p62-E1	1,19 ± 0,02	0,62 ± 0,04	0,54 ± 0,31	188 ± 11
4J21 Fab	VLP	1,58 ± 0,03	14,2 ± 0,29	9,00 ± 0,03	8 ± 0,2
3E23	p62-E1	3,18 ± 2,43	2,67 ± 0,87	6,11 ± 1,41	43 ± 19
3E23 Fab	VLP	0,203 ± 0,03	3,93 ± 0,40	19,6 ± 3,16	29 ± 3
4B8	p62-E1	2,98 ± 2,98	5,06 ± 1,10	5,57 ± 1,10	23 ± 5
4B8 Fab	VLP	0,06 ± 0,04	3,33 ± 0,30	5,60 ± 0,46	35 ± 3
5N23	p62-E1	2,98 ± 0,75	2,40 ± 0,66	0,87 ± 0,37	48 ± 17
1L1	p62-E1	0,88 ± 0,44	2,73 ± 0,36	3,79 ± 2,10	42 ± 6
2C2	p62-E1	1,54 ± 0,65	6,08 ± 1,45	4,59 ± 2,32	19 ± 6
2D12	p62-E1	17,5 ± 1,64	5,41 ± 4,97	0,49 ± 0,08	13 ± 4
4N12	p62-E1	1,24 ± 0,02	1,18 ± 0,01	0,95 ± 0,02	98 ± 1
5O14	p62-E1	0,79 ± 0,02	9,11 ± 0,19	1,15 ± 0,01	13 ± 0,3
9D14	p62-E1	2,70 ± 0,90	2,82 ± 0,14	1,13 ± 0,40	41 ± 2
8G18	p62-E1	3,90 ± 0,21	1,88 ± 0,11	0,48 ± 0,02	62 ± 3
4J14	p62-E1	1,61 ± 0,47	15,3 ± 2,52	9,94 ± 2,64	8 ± 1
5F	p62-E1	2,61 ± 0,04	50,9 ± 0,75	19,5 ± 0,2	2 ± 0,03
3A2	p62-E1	2,12 ± 0,02	10,1 ± 0,12	4,78 ± 0,08	11 ± 0,1
1M9	p62-E1	1,86 ± 0,99	3,98 ± 0,26	2,48 ± 0,99	29 ±2
3B4	p62-E1	2,91 ± 0,09	1,56 ± 0,11	0,54 ± 0,02	74 ± 5
8B	p62-E1	0,99 ± 0,03	2,74 ± 0,10	2,77 ± 0,18	42 ± 2
8E22	p62-E1	0,48 ± 0,02	2,0 ± 0,13	4,22 ± 0,42	58 ± 4

Ví dụ 3 - Bàn luận

Các tác giả sáng chế đã chỉ ra việc phân lập một nhóm đa dạng các mAb có trong tự nhiên ở người từ một đối tượng đơn lẻ, đa số trong đó chấp nhận protein E2 CHIKV và biểu hiện hoạt tính trung hòa đáng kể in vitro và hiệu quả điều trị bệnh in vivo. Như một nhóm, các kháng thể ức chế nhất cũng thể hiện hoạt tính rộng, trung hòa các virut có cả ba kiểu gen CHIKV, bao gồm một chủng hiện đang bùng phát ở Caribê. Phần lớn các mAb ở người đặc hiệu với CHIKV đã được phân lập trong nghiên cứu này đã trung hòa virut ở nồng độ nhỏ hơn 100 ng/mL, và nhiều mAb thể hiện hoạt tính ức chế ở nồng độ nhỏ hơn 10 ng/mL. Hoạt tính này lớn hơn so với hoạt tính mà các tác giả sáng chế đã quan sát thấy trong các nghiên cứu trước đây về các mAb ở người chống lại các virut gây bệnh khác trên người, bao gồm các virút cúm H1, H2, H3 hoặc H5 (Hong et al., 2013; Krause et al., 2012; Krause to et al., 2011a; Krause et al., 2011b; Krause et al., 2010; Thornburg et al., 2013; Yu et al., 2008), virut sốt dengue (Messer et al., 2014; Smith et al., 2013a; Smith et al., 2014; Smith et al., 2013b; Smith et al., 2012), và các virut khác. Hiệu lực của nhiều loại mAb ở người kháng CHIKV có thể tương đương hoặc vượt trội so với các mAb ở chuột trung hòa tốt nhất CHIKV (Fong et al., 2014; Fric et al., 2013; Pal et al., 2013; Warter et al., 2011), được tạo ra sau khi tiêm lặp lại và sự chín muồi ái lực. Hầu hết các mAb trung hoà khác kháng CHIKV ít hiệu quả hơn (Fong et al., 2014; Selvarajah et al., 2013; Warter et al., 2011). Một mAb duy nhất ở người đặc hiệu với CHIKV đã được thông báo trước đây (IM-CKV063) thể hiện hoạt tính có thể tương đương với các mAb trung hòa cao được đề cập trong sáng chế này (Fong et al., 2014).

Các tác giả sáng chế đã quan sát thấy sự đa dạng của các kiểu hình mức độ đồng nhất epitop trong E2 bởi các mAb trung hòa CHIKV khác nhau đã được thử nghiệm. Sự ánh xạ epitop tốt với các glycoprotein CHIKV thay thế alanin cho thấy ba vùng cấu trúc trong E2 liên quan đến sự trung hòa trung gian mAb: miền A, chứa RBD giả định (Sun et al., 2013; Voss et al., 2010), miền B, tiếp xúc và che chắn vòng lặp dung hợp ở E1 (Voss et al., 2010), và vòm 1 và 2 của đầu nối dải β, chứa một vùng nhạy axit và liên kết miền A và B (Voss et al., 2010). Trong số các kháng thể đã ánh xạ lên epitop trong E2, nhóm lớn (các kháng thể có trong nhóm cạnh tranh 1 và 2) thường xuất hiện trong miền A và vòm 1 và 2, trong khi đó nhóm nhỏ hơn (trong nhóm cạnh tranh 3) ở các vị trí trong miền B. Các dữ liệu này gợi ý rằng các vùng tiếp xúc bề mặt trong miền A và các vòm là các vị trí kháng nguyên chủ yếu dẫn đến đáp ứng của kháng thể trung hòa ở

người. Các tác giả sáng chế kết luận rằng khu vực được bảo vệ cao trong miền A và vòm 2 có thể tạo ra một đáp ứng miễn dịch bảo vệ rộng và có chức năng phù hợp để thiết kế vắc-xin tập trung phát hiện kháng nguyên.

Điều đáng chú ý là, khoảng một phần tư các phần dư tiếp xúc với bề mặt trong các miền E2 quan trọng dường như được thực hiện bằng một hoặc nhiều mAb từ một đối tượng duy nhất. Sự có mặt của các kiểu liên kết đa dạng về mặt chức năng ở các vị trí kháng nguyên chủ yếu được hàm ý bởi hai quan sát: (a) một vài mAb liên kết với các epitop tương tự nhưng thể hiện hoạt tính ức chế thay đổi bởi các mức độ khuếch đại và (b) ít có sự tương quan giữa khả năng trung hòa và ái lực liên kết với protein E2. Bảy trong số các loại mAb ở người có khả năng trung hòa mạnh nhất (2H1, 3E23, 4B8, 4J21, 4N12, 5M16 và 9D14) đã ức chế sự lây nhiễm CHIKV ở một bước sau liên kết, có thể thông qua việc ngăn ngừa các sự thay đổi cấu trúc phụ thuộc vào độ pH, ngăn ngừa sự thâm nhập của nucleocapsit vào tế bào chất (Kielian et al., 2010).

Trong khi hiệu quả điều trị bệnh ở chuột dường như dự đoán các kết quả điều trị bệnh lây nhiễm virut gây ra bằng thí nghiệm và đau khớp ở các động vật linh trưởng ngoài con người (Pal et al., 2013; Pal et al., 2014), dữ liệu ở đây gợi ý rằng việc phòng bệnh cho người bằng các mAb ở người đặc hiệu với CHIKV sẽ ngăn ngừa lây nhiễm. Do lo ngại các biến thể chống chịu với liệu pháp đơn trị (Pal et al., 2013), liệu pháp kết hợp sử dụng các kháng thể siêu trung hòa hướng đích các vùng khác nhau của E2 có thể là cần thiết. Số lượng bệnh nhân có nguy cơ cao bị bệnh nặng có thể được nhắm tới trong khi dịch bùng phát, bao gồm những người có tình trạng sức khoẻ đặc biệt (ví dụ, phụ nữ trong thời kỳ mang thai tháng cuối, người suy giảm miễn dịch và người cao tuổi). Sẽ có thêm các xét nghiệm lâm sàng để xác định xem liệu mAb trung hòa ở người có thể ngăn ngừa hoặc làm thuyên giảm chứng bệnh về khớp đã xuất hiện ở người.

BẢNG 1 - CÁC TRÌNH TỰ NUCLEOTIT CHO CÁC VÙNG BIẾN ĐỔI CỦA KHÁNG THỂ

Dòng	Vùng trình tự biến đổi	SEQ ID NO:
1H12 nặng	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAG CCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCTCTGGTT ACAGCTTTACCAGCTACGGTATCAGCTGGGTGCGACAGGC CCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCAC	2

	TTACAAAGGTTACACACAGTATGCACAGAACTTCCAGGGC AGAGTCACCATCACCACAGACACACCCGCGACTACAGTCT ATATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCG TGTATTACTGCGCGAGAGTTCTTTCCGAGACTGGTTATTTC TACTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGA CCCTGGTCACCGTCTCCTCA	
1H12 nhẹ	CAGGCTGTGGTGACTCAGCCGCCCTCAGTGTCTGGGGCCC CAGGGCAGAGGGTCACCATCTCCTGTACTGGGAGCAGCTC CAACATCGGGGCAGATTATAATGTACACTGGTACCAGCTG CTTCCAGGAACAGCCCCCAAACTCCTCATCTATGGTAACA CCAATCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTC CAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCACTGGGCTC CAGGCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGCCAGTCCTATG ACAGCAGCCTGAGTGCTTCGGTATTCGGCGGAGGGACCA AACTGACCGTCCTAG	3
2B4 nặng	caggtgcagctggtgcaatctgggtctgagttgaagaagcctgggGCCTCAGTGAA GGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACAGTTTCACTAGCTATT CTATCAACTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCCTG AGTGGATGGGATGGATCGACACCAACACTGGGAACCCAA CCTATGCCCAGGACTTCGCAGGACGGTTTGTCTTCTCCTTG GACACCTCTGTCACCACGGCATATCTGCAGATCAGCAGCC TAAAGGCTGGGGACACTGCCGTTTATTACTGTGCAACATA TTATGTTGACCTTTGGGGGAGTTATCGCCAAGACTACTAC GGTATGGACGTCTGGGGCCAC	4
2B4 nhẹ	cagtctgtgctgactcagccaccctcagcgtctgggacccccgggcagagggtcaccatCTC TTGTTCTGGAGGGAGCTCCAACATCGGGAGTAATCCTGTA AATTGGTACCAGATGGTCCCAGGAACGGCCCCCAAACTCC TCCTCTATACTAATAATCAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGA CCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTG GCCATCAATGGACTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGATTATT ACTGTGCAGTATGGGATGACAGCCTGAGTGGCCGTTGGGT GTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGACCGTCCTA	5

2H1 nặng	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAG CCTGGGGCCTCAGTGAGGGTCTCCTGCAAGGCGTCTGGTT ACACCTTTACCAGTTATGGTATCAGCTGGGTGCGACAGGC CCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCAC TTACAATGGTGACACAAACTATGCACAGAAGTTCCAGGGC AGAGTCACCTTGACAACAGAGACATCCACGAGCACAGCC TACATGGAGCTGAGGCGCCTGAGATCTGACGACACGGCC GTTTACTACTGTGCGAGAGATTTTGAATTTCCCGGAGATT GTAGTGGTGGCAGCTGCTACTCCAGGTTCATCTACCAGCA CAACGACATGGACGTCTGGGGCCACGGGACCCTGGTCAC CGTCTCCTCAGCAAGC	6
2H1 nhẹ	CAGGCTGTGGTGACTCAGCCGCCCTCAGTGTCTGCGGCCC CAGGACAGAAGGTCACCATCTCCTGCTCTGGAAGCAGCTC CAACATTGGGAATCATTATGTATCCTGGTACCAGCACCTC CCGGGAACAGCCCCCAAACTCCTCATTTATGACAATTATA AGCGACCCTCAGTGATTCCTGACCGATTCTCTGCCTCCAA GTCTGGCGCGTCAGCCACCCTGGGCATCATCGGACTCCAG ACTGGGGACGAGGCCGATTATTACTGCGGAACATGGGAT AGCAGCCTGAGTGCTGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAG CTGACCGTCCTA	7
3E23 nặng	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAG CCTTCGGACACCCTGTCCCTCACCTGCAGTGTCTCAAGTG ACGCCCTCCGCAGCAGGAGTTATTACTGGGGCTGGGTCCG CCAGCCCCCCGGGAAGGGATTGGAGTGGATTGGGACTGT CTCTTATAGTGGGGGCACCTACTACAACCCGTCCCTCCAG AGTCGAGTCACCGTGTCGGTGGACACGTCCAAGAACCACT TCTCCCTGAGGTTGAACTCTGTGACCGCCGCAGACGCGGC TGTTTATTACTGTGCGAGATCTTATTTCTATGATGGCAGTG GTTACTACTACCTGAGCTACTTTGACTCCTGGGGCCAGGG AACCCTGGTCACCGTCTCCTCA	8
3E23 nhẹ	CAGGCTGTGGTGACTCAGGAGCCCTCACTGACTGTGTCCC CAGGAGGGACAGTCACTCTCACCTGTGCTTCCAGCACTGG	9

	AGCAGTCACCAGTGGTCACTATCCAAACTGGTTCCAGCAG AAACCTGGACAACCACCCAGGGCCCTGATTTATAGCACAG ACAACAAGCACTCCTGGACCCCTGCCCGGTTCTCAGGCTC CCTCCTAGGGGTCAAGGCTGCCCTGACACTGTCAGATGTA CAGCCTGAGGACGAGGCTGACTATTACTGCCTGCTCCATT TTGGTGGTGTCGTGGTCTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGAC CGTCCTA	
3N23 nặng	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAG CCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGTGTCTGGAT TCACCTTCAGTAACTATGCCATGCACTGGGTCCGCCAGGC TCCAGGCAAGGGGCTGGACTGGGTGGCAGTTATATGGTAT GATGGAAGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGC CGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGT ATCTGCAAGTGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTG TGTATTACTGTGCGAGGGGTGACTACGTTCTTGACTACTG GGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA	10
3N23 nhẹ	GACATTGTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATC TGTAGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCCGGGCCAGTCA GAGCATTCCCAGCTATTTAAATTGGTATCAACAGAAACCA GGGAAAGCCCCTAAGGTCCTGATCTATGCTACATCCACTT TGGAAGCTGGGGTCCCATCACGGTTCAGTGGCAGTGGATC TGGGACAGATTTCACTCTCACCATCACCAGTCTGCAACCT GAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAATA CGGGGATATTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATAT CAAA	11
4J14 nặng	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAG CCTGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAG GCACTTCCAGCACTTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGC CCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGCAGCATCCC TGTCTTTGCTACAGTAAACTACGCACAGAAGTTCCAGGGC AGACTCACGATTACCGCGGACGAATCCACGAGCACAGTTT ACATGGAACTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCG	12

	TTTATTTCTGTGCGAGCCCCTATTGTAGTAGTATGAACTGC TATACGACCTTTTACTACTTTGACTTCTGGGGCCAGGGAA CCCTGGTCACCGTCTCCTCA	
4J14 nhẹ	CAGGCTGTGGTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTTTGGGTTTCC TGGACAGTCGATCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGT GACTTTGGTACTTATAACTATGTCTCTTGGTACCAGCAAC ACCCAGGCCAAGCCCCCAAACTCATGATTTTTGATGTCAG TAATCGGCCCTCAGGGGTTTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCA AGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCA GGCTGAGGACGAGGCTTCTTATTACTGCAGCTCCTATACA AGCGGCAGCACTCTCTACGGCGGAGGGACCAAGCTGACC GTCCTG	13
4J21 nặng	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGTCTGAGTTGAAGAAGC CTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGGCTTCTGGATA CAGTTTCACTAGCTATTCTATCAACTGGGTGCGACAGGCC CCTGGACAAGGGCCTGAGTGGATGGGATGGATCGACACC AACACTGGGAACCCAACCTATGCCCAGGACTTCGCAGGA CGGTTTGTCTTCTCCTTGGACACCTCTGTCACCACGGCATA TCTGCAGATCAGCAGCCTAAAGGCTGGGGACACTGCCGTT TATTACTGTGCAACATATTATGTTGACCTTTGGGGGAGTT ATCGCCAAGACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCACGG GACCCTGGTCACCGTCTCCTCA	14
4J21 nhẹ	CAGTCTGTGGTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCTGGGACCC CCGGGCAGGGGGTCACCATCTCTTGTTCTGGAGGGAGCTC CAACATCGGGAGTAATCCTGTAAATTGGTACCAGATGGTC CCAGGAACGGCCCCCAAACTCCTCCTCTATACTAATAATC AGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAA GTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAATGGACTCCAG TCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGTATGGGATG ACAGCCTGAGTGGCCGTTGGGTGTTCggcggagggaccaagctgacc gtccta	15

4N12 nặng	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAG CCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGTTTCCGGAT ACATCCTCAGTAAATTATCCGTGCACTGGGTGCGACAGGC TCCTGGAAAAGGACTTGAATGGATGGGAGGTTCTGAACGT GAAGATGGCGAAACAGTCTACGCACAGAAGTTCCAGGGC AGAATCAGCTTGACCGAGGACACATCTATAGAGACAGCC TACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGTTCTGAGGACACGGCC GTGTATTATTGTGCAACAGGAGGCTTCTGGAGTATGATTG GGGGAAATGGAGTGGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGG TCACCGTCTCCTCA	16
4N12 nhẹ	CAGGCTGTGGTGACTCAGTCTCCATCGTCCCTGCCTGCAT CTGTAGGAGACAGGGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCA GGACATTAGAAATAATTTAGGCTGGTATCAGCAGAAACC AGGGAAAGCCCCTGAGCGCCTGATCTATGGAACCTCCAAT TTGCAGAGTGGGGTCCCGTCAAGGTTCAGCGGCAGTGGAT CTGGGACAGAATTCACTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCC TGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACAGCATAATAGTT ACCCTCCCACGTTCGGCCGCGGGACCAAGGTGGAAATCA AA	17
5M16 nặng	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAG CCTGGGGCCTCAGTGAGAGTTTCCTGCAAGGCATCTGGGT ACACCTTCACCAGTTACTTTATGCACTGGGTGCGACAGGC CCCTGGACAAGGACTTGAGTGGATGGCGATAACTTATCCT GGTGGTGGTAGCCCATCCTACGCACCGCAGTTCCAGGGCA GACTCACCATGACCGACGACACGTCCGCGACCACAGTCTA CATGGACCTGAGTGACCTGACTTCTAAAGACACGGCCGTG TATTACTGTGCGAGAGGTGCCCACCGTTCCATTGGGACGA CCCCCCTTGACTCGTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGT CTCCTCAGCAAGCTTCAAGGG	18
5O14 nặng	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGACGCGTGGTCCAG GCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGAT TCACCTTCAGTATGTATGGCGTCCACTGGGTCCGCCAGGC	19

	TCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGAA TGATGGATCTAAAGAATACTATGGAGACTCCGTGAAGGG CCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAGGAACACGTTG TATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGTCGACGACACGGCA GTGTATTTTTGTGCGAGAGATGGAATTCCTGACCCTGAAC GCGGTGACTACGGGGGCTTGGACTACTGGGGCCAGGGAA CCCTGGTCACCGTCTCCTCA	
5O14 nhẹ	CAGACTGTGGTGACTCAGTTTCCATCCTCCCCGTTTGCATC TGTAGGAGACGGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGGCA GAGCATTAGCAGTTATGTTAATTGGTATCAGCAGAAACCA GGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATTTACGCTACATCCAGTT TGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATA TGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCGGTCTGCAACCT GAAGATTTTGCAACATACTACTGTCAACAGAGTTACAGTT TTCCTCGAACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCA AAC	20
8G18 nặng	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTCAGGTGAAGAAG CCTGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGCCCTCTGGAG GCACCTTCAACAACAATGGGATCAGTTGGGTGCGACAGG CCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGCATCGTCCC GAACTTTGGAACCCCAACCTATGGACAAGACTTCCAGGGC AGAGTCACGATCACCGCGGACGAATCTACGAGCACAGTC TTCTTGGAGCTGACCAGACTGAGATCTGACGACACGGCCG TTTATTTCTGTGCGCGAGGTCGCACGGCGGTGACTCCGAT GCAATTGGGTTTACAGTTCTACTTTGACTTCTGGGGCCGG GGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA	21
8G18 nhẹ	cagactgtggtgactCAGGAGCCCTCACTGACTGTGTCCCCAGGAG GGACAGTCACTCTCACCTGTTCTGCCAACAGTGGAGCAGT CACCAGTGATTACTATCCAAACTGGTTCCAGCAGAAACCT GGACAAGCACCCAGGGCACTGATTTATAGTGCAAGCAAC AAATTCTCCTGGACGCCTGCCCGGTTCTCAGGCTCCCTCCT TGGGGGCAAAGCTGCCCTGACACTGTCAGGTGCGCAGCCT	22

	GAGGACGAGGCTGAGTATTACTGCCTGGTCTACTCTGGTG ATGGTGTGGTTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCC	
1I9 nặng	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAG CCCGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGACTTCTGGAT ATACGTTCACCGACAACTCTGTACACTGGGTGCGACAGGC CCCTGGACAAGGGTTTGAGTGGATGGGACGGATCAACCCT AACACTGGTGTCTCAACTTCTGCCCAGAAGTTTCAGGGCA GGGTCACCATGACCAGGGACACGTCCATCAGCACAACCT ACATGGAGCTGAGCAGTTTGAGATCTGACGACACGGCCGT CTATTACTGTGCGAGAGAGGAGAACGATAGTAGTGGGTA TTACCTTTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA	23
1I9 nhẹ	CAGATTGTGGTGACTCAGTCTCCATCCTCCCTGTTTGCATC TGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCA GAGCATTAGCACCTATTTAAATTGGTATCAGCAAAAACCA GGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTT TGGAGAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCGGTGGCAGTAGATC TGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT GAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGGA CCCCGTGGACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGACATCA AA	24
1L1 nặng	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGTCCTACGCTGGTGAAAC CCACACAGACCCTCACGCTGACCTGCACCTTCTCTGGGTT CTCACTCAGTATTAGTGGAGTGGGTGTGGGCTGGATCCGT CAGCCCCCAGGAAAGGCCCTGGAGTGGCTTGCACTCATTT ATTGGGATGATGATAAGCGCTACAGCCCATCTCTGAAGAG CAGGCTCACCATCACCAAGGACACCTCCGAAAACCAGGT GGTCCTTACAATGACCAACATGGACCCTGTGGACACAGCC ACATATTACTGTGCACACAGTATGACTAAAGGCGGGGCTA TCTATGGTCAGGCCTACTTTGAATACTGGGGCCAGGGAAC CCTGGTC	25
1L1 nhẹ	CCATCTCCTGCACTGGAACCAGACAGTGACGTTGGTGGTT ATAACTATGTCTCCTGGTACCAACAACACCCAGGCAAAGC	26

	CCCCAAACTCATCATTTATGATGTCACTGATCGGCCCTCA GGGGTTTCTAATCGCTTCTCTGCCTCCAAGTCTGCCAACAC GGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAG GCTGATTATTACTGCAGCTCATATACAAGCAGCAGCACTC TGGTTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA	
1M9 nặng	caggtccagctggtacagtctggggctgaggtgaagaagcctggGGCCTCAGTGAA GGTCTCCTGCAAGGTTTCCGGATACACCCTCACTGAATTA TCCATGCACTGGGTGCGACAGGCTCCTGGAAAAGGCCTAG AGTGGATGGGAGGTTTTGAGCCTGAAGATGGTGAAACAA TCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCG AGGACACATCTAGAGACACAGCCTACATGGAGCTGAGTA GCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTACAAC AGATCAGGTCTACTATCGTTCGGGGAGTTATTCTGGATAT GTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTC	27
1O5 nặng	caggtccagctggtgcagtctggggctgaggtgaagaagcctgggtCCTCAGTGAA GGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGACGCACCTTCAGCAGCTAT GTTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTG AGTGGATGGGAGGGATCATCCCTCTGTTTGGTACAGCAAA CTACGCACAGAAATTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGC GGACGAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAG CCTGAGATCTGACGACACGGCCGTCTATTACTGTGCGAGG GGCGCCCAGCTATATTACAATGATGGTAGTGGTTACATTT TTGACTACTGGGGCCAGGGAGCCCTGGTC	28
1O6 nặng	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCCTGAGGTGAAGAAG CCTGGGACCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAT TCAGCTTTATTAGCTCTGCTGTGCAGTGGGTGCGACAGGC TCGTGGACAACGCCTTGAGTGGATAGGATGGATCGTCGTT GCCAGTGCTAACACAAACTACGCACAGAAGTTCCGGGAA AGAGTCACCATTACTAGGGACATGTCCACAAACACAGCCT ATATGGAACTGACCAGCCTGAGATCCGAGGACACGGCCG TTTATTACTGTGCGGCAGAGCACCGGTCCCCTTGTAGTGG	29

	TGGTGATAGCTGCTACAGTCTCTACTACGGTATGGACGTC TGGGGCCAAGGGACCCTGGTCACCGTCTCCTCA	
2A2 nặng	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCTTGGTTCCGC CTGGGGGGTCCCTGAGACTGTCCTGTACAGCCTCTGGATT CACCGTTAGTAACTATGGCATGAGCTGGGTCCGCCAGACT CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAACTATTAGTACTA GTAGTGGTAGAACATTCTACGCAGACTCCGTGGAGGGCCG GTTCACCATCTCCGGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGTCGAAGACACGGCCGTA TATTACTGTGCGAAAGGCCCGTTCGGGGGCGACTTTGACT ACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA	30
2A2 nhẹ	CAGGCTGTGGTGACTCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTC TCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCA GAGTGTTGCCATCTACTTAGCCTGGTATCAACAGAAACCT GGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACA GGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTC TGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCT GAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGCGTGGCAACT GGCAGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAACTGGAGATCA AA	31
2C2 nặng	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCCTGGTACAG CCTGGCAGGTCCCTGACACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAT TCACCTTTGATGTTTATGCCATGCACTGGGTCCGGCAAGC TCCAGGGAAGGGCTTGGAGTGGGTCGCAGGTATTAGTTGG AATAGTGGTAGCGTAGGCTATGCGGACTCTATGAAGGGCC GATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTA TCTGCAAATTAACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCCTTA TATTACTGTGCAAAAGCATTCTGGTTCGGGGAGTTATCGG GTTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCCTGGTCAC CGTCTCCTCA	32

2C2 nhẹ	CAGGCTGTGGTGACTCAGCCTCCCTCCGCGTCCGGGTTTC CTGGACAGTCAGTCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAG TGACGTTGGTAGTTATAACTATGTCTCCTGGTACCAACAG CACCCAGGCAAAGCCCCCAAACTCATAATTTATGCGGTCA CTAGGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGAGCGCTTCTCTGGCTC CAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGACCGTCTCTGGGCTC CAGGCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGCACCTCATATG CAGGCAACAACAAGGATGTCTTCGGAACTGGGACCAAGG TCACCGTCCTA	33
2D12 nặng	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAG CCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTT ACAGCTTTAACATCTATGGTATCAGCTGGGTGCGACAGGC CCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCGC TTACAATGGTAACACAAACTATGCACAGAAACTCCAGGG CAGAGTCACCATGACCACAGACACATCCACGAGCACAGC CTACATGGAACTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGC CGTGTATTACTGTGCGAGACCACTTTGGGGGGAATTTTAC TATGATATCTGGGGCCAAGGGACCCTGGTCACCGTCTCCT CA	34
2D12 nhẹ	CAGGCTGTGGTGACTCAGTCTCCAGGCACCCTGTCCTTGT CTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCTTGCAGGGCCAGTCA GAGTGTTAGCAGCGGGTACTCAGCCTGGTACCAGCAGAA ACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCC AAAAGGGCCGCTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGT GGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGG AGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCTGTTTGCT ACCTCACCTCCGCCCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGA TTAAA	35
3A2 nặng	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAG CCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAT	36

	TCACCTTCAGTAATTATGTTATGGAGTGGGTCCGCCAGGC TCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATAT GATGGAAGCAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGC CGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGTTGT ATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTG TGTATTACTGTGCGAGATCAGAGTGGGAGTCTTCCTATGG TTCGGGGAATTATTATACAGATTACTTCTACTACTACGCTA TGGACGTCTGGGGCCCAGGGACCCTGGTCACCGTCTCCTC A	
3A2 nhẹ	CAGGCTGTGGTGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCA CCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAATCA GAGCCTCCTGCGTGGTATTAGATACAACTATTTGGATTGG TACCTGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCT ATTTGGGTTCTAATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTT CAGTGGCAGTGGATCAGCCACAGATTTTACACTGAAAATC AGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCA TGCAAGCTCTACAAACTCCTACCACCTTCGGCCAAGGGAC ACGACTGGAGATTAAA	37
3B4 nặng	CAGGTGCAGCTGGAGGAGTCTGGTCCTACGCTGGTGAAAC CCACACAGACCCTCACGCTGACCTGTTCCTTCTCTGGGTTC TCACTCACCACTACTGGAGTGACTGTGGGCTGGATCCGTC AGCCCCCAGGAAAGGCCTTGGAGTGGCTTGCACTCATTTA TTGGGATGATGATAAGCGCTACAGCCCATCTCTGAAGAGC AGGCTCACCATCACCAAGGACACCTCCAAAAACCAGGTG GTCCTTACCATGACCAACATGGACCCTGTGGACACTGCCA CATATTACTGTGCGCACTCCACCGGCTACTATGATAGTAG TGGCTATCGAGGGGCCCTTGATGCTTTTGCTGTCTGGGGC CAAGGGACCCTGGTCACCGTCTCCTCA	38
3B4 nhẹ	CAGATTGTGGTGACTCAGTTTCCAGACTCCCCGGCTGTGT CTTTGGGCGAGAGGGCCACCATCAACTGCAAGTCCAGCCA GAGTGTTTTATACCACTCCAACAATAAAAACTACTTAGCT TGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAACCTGCTCA	39

	TTTACTGGGCATCTGCCCGACAATCCGGGGTCCCTGACCG ATTCAGTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCACTCTCACC ATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTACT GTCAGCAATATTATAGTACTCCGTACACTTTTGGCCAGGG GACCAAGCTGGAGATCAAA	
3E23 nặng	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAG CCTTCGGACACCCTGTCCCTCACCTGCAGTGTCTCAAGTG ACGCCCTCCGCAGCAGGAGTTATTACTGGGGCTGGGTCCG CCAGCCCCCCGGGAAGGGATTGGAGTGGATTGGGACTGT CTCTTATAGTGGGGGCACCTACTACAACCCGTCCCTCCAG AGTCGAGTCACCGTGTCGGTGGACACGTCCAAGAACCACT TCTCCCTGAGGTTGAACTCTGTGACCGCCGCAGACGCGGC TGTTTATTACTGTGCGAGATCTTATTTCTATGATGGCAGTG GTTACTACTACCTGAGCTACTTTGACTCCTGGGGCCAGGG AACCCTGGTCACCGTCTCCTCA	40
3E23 nhẹ	CAGGCTGTGGTGACTCAGGAGCCCTCACTGACTGTGTCCC CAGGAGGGACAGTCACTCTCACCTGTGCTTCCAGCACTGG AGCAGTCACCAGTGGTCACTATCCAAACTGGTTCCAGCAG AAACCTGGACAACCACCCAGGGCCCTGATTTATAGCACAG ACAACAAGCACTCCTGGACCCCTGCCCGGTTCTCAGGCTC CCTCCTAGGGGTCAAGGCTGCCCTGACACTGTCAGATGTA CAGCCTGAGGACGAGGCTGACTATTACTGCCTGCTCCATT TTGGTGGTGTCGTGGTCTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGAC CGTCCTA	41
3H5 nặng	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAG CCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTTCAACGTCTGGAT TCACCTTCAGGATGTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGC TCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCGTTATTTTTAAC GATGGAGTTAAGAAATATTATGGAGACGCCGTGAAGGGC CGATTCACCGTCTCCAGAGACAATTCCAGGAACACCCTGT ATCTGGAAATGAAAAGCCTGAGAGTCGACGACACGGCTG CCTACTACTGTGCGAGAGACGGGATTCCTGACCCCGAACG	42

	CGGTGACTACGGGGGCTTGGACTACTGGGGCCAGGGAAC CCTGGTCACCGTCTCCTCA	
3H5 nhẹ	CAGACTGTGGTGACTCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATC TGTAGGAGACACAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAG AGCATTACCAGTTATTTAAACTGGTATCAGCAGAAACCAG GAAAAGCCCCAAAGCTCCTCATCTATGCTACATCCAGTTT GCAAAGTGGGCTCCCCTCAAGGTTCAGTGGCAGTGGCTAT GGGACAGAATTCACTCTCACCATCAGTGGTCTGCAACCTG AAGATTTTGCAACATACTACTGTCAACAGAGTTACAGTTT TCCTCGAACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATGGA TA	43
3I21 nặng	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAG CCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAACCTCTGGAT TCATCTTTGATGATTATGCCATGTACTGGGTCCGGCAAGC TCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGG AATAGTGGAAACATAGCCTATGCGGACTCTGTGAAGGGC CGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTGT ATTTGGAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCCTT GTATTACTGTGTAAAAGATCTTTACGGGTACGATATTTTG ACTGGTAATGGATATGATTACTGGGGCCAGGGAACCCTGG TCACCGTCTCCTCA	44
3I21 nhẹ	CAGGCTGTGGTGACTCAGTCTTCACTCTCCCTGCCCGTCAC CCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAG AGCCTCCTGCAAAGTAATGGATACAACTATTTGGATTGGT ACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTA TTTGGGTTCTAATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTC AGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTACACTGAAAATCA GCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCAT GCAAGCTCTACAAACTCCTCCGACGTTCGGCCAAGGGACC AAGGTGGAAATCAAAA	45
3K11 nặng	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAG CCTGGGTCCTCGGTGAAGGTCCCCTGCAAGGCTTCTGGAG	46

	ACACCCTCAGTTACTACGGAATCACTTGGGTGCGACGGGC CCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGACAGATCATCCCT TTCTTTGCTACAACAATCTCCGCACAGAAGTTCCAGGGCA GACTCACCATGACCGCGGAAGAATCCACGAGCACTGGCT ACATGGAGCGCACATTTTACATGGACTTGAGTAGCCTTAG ACCTGAGGACACGGCCGTATACTACTGTGCGGGGGGCTAC TATGGTTCGGGGAGTTCGGGCGACTACGGTTTGGACGTCT GGGGCCAAGGGACCCTGGTCACCGTCTCCTCA	
3K11 nhẹ	CAGGCTGTGGTGACTCAGCCGCCCTCAGTGTCTGGGGCCC CAGGGCAGAGGGTCACCATCTCCTGCACTGGGAGCAGCTC CAACATCGGGGCAGGTTATGATGTAAACTGGTACCAGCA GCTTCCAGGAACAGCCCCCAAACTCCTCATCTATGGTAAC AACAATCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCT CCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCACTGGGCT CCAGGCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGCCAGTCCTAT GACAGCAGCCTGAGTGGTTCGGGAGTCTTCGGAACTGGG ACCGAGGTCACCGTCCTA	47
4B8 nặng	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAG CCTTCGGAGACCCTGTCCCTGACGTGCGCTGTTTCTGGTG ACTCCATCGGCAGTAGAAGTTTCTACTGGGGCTGGATCCG CCAGCCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGAAGTAT CTATTATAATGGGACCACCTACTACAAGCCGTCCCTCAAG AGTCGAGTCACCATATCCCTAGACACGTCCAAGAACCAGT TCTCCCTGAGGCTGAGCTCTCTGACCGCCACAGACACGGG TGTCTATTACTGTGCGCGGGCGCCAACCTACTGTAGTCCTT CCAGCTGCGCAGTTCACTGGTACTTCAATCTCTGGGGCCG TGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCA	48
4B10 nặng	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGCTGAAGAAG CCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTT ACATATTTACCAAATATGGTATCAGTTGGCTGCGACAGGC CCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGGTGGGATGGATCAGCGC TTACAATGAAAACACAAACTATGCAGAGAAGTTCCAGGG	49

	CAGAGTCACCTTGACCACAGATGCATCCACGAGCACGGCC TACATGGAGCTGAGGAACCTGAGATCTGACGACACGGCC GTATACTTCTGTGCGAGAGAAGTCTGGTTCGCGGAGTATA TTTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA	
8E22 nhẹ	CAGGCTGTGGTGACTCAGGAGCCCTCACTGACTGTGTCCC CAGGAGGGACAGTCACTCTCACCTGTTCTGCCAACAGTGG AGCAGTCACCAGTGATTACTATCCAAACTGGTTCCAGCAG AAACCTGGACAAGCACCCAGGGCACTGATTTATAGTGCA AGCAACAAATTCTCCTGGACGCCTGCCCGGTTCTCAGGCT CCCTCCTTGGGGGCAAAGCTGCCCTGACACTGTCAGGTGC GCAGCCTGAGGACGAGGCTGAGTATTACTGCCTGGTCTAC TCTGGTGATGGTGTGGTTTTC GGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAA	50
9A11 nhẹ	CAGTCTGTGGTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCC TGGACAGTCGATCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGT GACGTTGGTGCTTATAACTATGTCTCCTGGTACCAACAAC ACCCAGGCAAAGCCCCCAAACTCGTGATTTATGATGTCGC TAATCGGCCCTCAGGGATTTCTGACCGCTTCTCTGGCTCCA AGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCA GGCTGAGGACGAGGCTGATTATTACTGCGGCTCATATACC AGCGACGTCTCGCCGGTTTTCAGCGGGGGGACCAAGCTGA CCGTCCTCA	51
9D14 nặng	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGTCTGAGTTGAAGAAGC CTGGGGCCTCAGTGAAGCTTTCCTGCAAGGCTTCTGGATA CACCTTCACAAGTCATCCTATGAATTGGGTGCGACAGGCC CCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAACACC AAGACTGGGAACCTAACTTATGCCCAGGGCTTCACAGGAC GGTTTGTCTTCTCCTTGGACACCTCTGTCAGGACGGCGTAT CTGCAGATCAGCGGCCTAAAGGCTGAGGACACTGCCATTT ATTACTGTGCGAGAGATGAGTATAGTGGCTACGATTCGGT AGGGGTGTTCCGTGGTTCTTTTGACGACTTCTACGGTATG GACGTCTGGGGCCAAGGGACCCTGGTCACCGTCTCCTCA	52

BẢNG 2 – CÁC TRÌNH TỰ PROTEIN CHO CÁC VÙNG BIẾN ĐỔI CỦA KHÁNG THỂ

Dòng	Trình tự biến đổi	SEQ ID NO:
1H12 nặng	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTSYGISWVRQAP GQGLEWMGWISTYKGYTQYAQNFQGRVTITTDTPATTVYM ELRSLRSDDTAVYYCARVLSETGYFYYYYYGMDVWGQGTL VTVSS	53
1H12 nhẹ	QAVVTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGADYNVHWYQLL PGTAPKLLIYGNTNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAED EADYYCQSYDSSLSASVFGGGTKLTVL	54
2B4 nặng	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYSFTSYSINWVRQAP GQGPEWMGWIDTNTGNPTYAQDFAGRFVFSLDTSVTTAYL QISSLKAGDTAVYYCATYYVDLWGSYRQDYYGMDVWGH	55
2B4 nhẹ	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGGSSNIGSNPVNWYQMVPG TAPKLLLYTNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAINGLQSEDE ADYYCAVWDDSLSGRWVFGGGTKVTVL	56
2H1 nặng	QVQLVQSGAEVKKPGASVRVSCKASGYTFTSYGISWVRQAP GQGLEWMGWISTYNGDTNYAQKFQGRVTLTTETSTSTAYM ELRRLRSDDTAVYYCARDFEFPGDCSGGSCYSRFIYQHNDM DVWGHGTLVTVSSAS	57
2H1 nhẹ	QAVVTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNHYVSWYQHLPG TAPKLLIYDNYKRPSVIPDRFSASKSGASATLGIIGLQTGDEA DYYCGTWDSSLSAVVFGGGTKLTVL	58
3E23 nặng	QVQLVQSGPGLVKPSDTLSLTCSVSSDALRSRSYYWGWVRQ PPGKGLEWIGTVSYSGGTYYNPSLQSRVTVSVDTSKNHFSLR LNSVTAADAAVYYCARSYFYDGSGYYYLSYFDSWGQGTLV TVSS	59
3E23 nhẹ	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGHYPNWFQQK PGQPPRALIYSTDNKHSWTPARFSGSLLGVKAALTLSDVQPE DEADYYCLLHFGGVVVFGGGTKLTVL	60

3N23 nặng	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAVSGFTFSNYAMHWVRQA PGKGLDWVAVIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLY LQVNSLRAEDTAVYYCARGDYVLDYWGQGTLVTVSS	61
3N23 nhẹ	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTISCRASQSIPSYLNWYQQKPGK APKVLIYATSTLEAGVPSRFSGSGSGTDFTLTITSLQPEDFAT YYCQQSYNTGIFTFGPGTKVDIK	62
4J14 nặng	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTSSTYAISWVRQAP GQGLEWMGGSIPVFATVNYAQKFQGRLTITADESTSTVYME LSSLRSEDTAVYFCASPYCSSMNCYTTFYYFDFWGQGTLVT VSS	63
4J14 nhẹ	QAVVTQPASVFGFPGQSITISCTGTSSDFGTYNYVSWYQQHP GQAPKLMIFDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAED EASYYCSSYTSGSTLYGGGTKLTVL	64
4J21 nặng	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYSFTSYSINWVRQAP GQGPEWMGWIDTNTGNPTYAQDFAGRFVFSLDTSVTTAYL QISSLKAGDTAVYYCATYYVDLWGSYRQDYYGMDVWGHG TLVTVSS	65
4J21 nhẹ	QSVVTQPPSVSGTPGQGVTISCSGGSSNIGSNPVNWYQMVPG TAPKLLLYTNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAINGLQSEDE ADYYCAVWDDSLSGRWVFGGGTKLTVL	66
4N12 nặng	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYILSKLSVHWVRQA PGKGLEWMGGSEREDGETVYAQKFQGRISLTEDTSIETAYM ELSSLSSEDTAVYYCATGGFWSMIGGNGVDYWGQGTLVTV SS	67
4N12 nhẹ	QAVVTQSPSSLPASVGDRVTITCRASQDIRNNLGWYQQKPG KAPERLIYGTSNLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFAT YYCLQHNSYPPTFGRGTKVEIK	68
5M16 nặng	QVQLVQSGAEVKKPGASVRVSCKASGYTFTSYFMHWVRQA PGQGLEWMAITYPGGGSPSYAPQFQGRLTMTDDTSATTVY MDLSDLTSKDTAVYYCARGAHRSIGTTPLDSWGQGTLVTVS SASFK	69

5O14 nặng	QVQLVQSGGRVVQAGRSLRLSCAASGFTFSMYGVHWVRQA PGKGLEWVAVIWNDGSKEYYGDSVKGRFTISRDNSRNTLYL QMNSLRVDDTAVYFCARDGIPDPERGDYGGLDYWGQGTLV TVSS	70
5O14 nhẹ	QTVVTQFPSSPFASVGDGVTITCRARQSISSYVNWYQQKPGK APKLLIYATSSLQSGVPSRFSGSGYGTDFTLTISGLQPEDFAT YYCQQSYSFPRTFGQGTKVEIK	71
8G18 nặng	QVQLVQSGAQVKKPGSSVKVSCKPSGGTFNNNGISWVRQA PGQGLEWMGGIVPNFGTPTYGQDFQGRVTITADESTSTVFLE LTRLRSDDTAVYFCARGRTAVTPMQLGLQFYFDFWGRGTL VTVSS	72
8G18 nhẹ	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSANSGAVTSDYYPNWFQQK PGQAPRALIYSASNKFSWTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPE DEAEYYCLVYSGDGVVFGGGTKLTV	73
1I9 nặng	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGYTFTDNSVHWVRQA PGQGFEWMGRINPNTGVSTSAQKFQGRVTMTRDTSISTTYM ELSSLRSDDTAVYYCAREENDSSGYYLWGQGTLVTVSS	74
1I9 nhẹ	QIVVTQSPSSLFASVGDRVTITCRASQSISTYLNWYQQKPGK APKLLIYAASSLESGVPSRFGGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQSYRTPWTFGQGTKVDIK	75
1L1 nặng	QVQLVQSGP.TLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSISGVGVGWIRQP PGKALEWLALIYWDDDKRYSPSLKSRLTITKDTSENQVVLT MTNMDPVDTATYYCAHSMTKGGAIYGQAYFEYWGQGTLV	76
1L1 nhẹ	PSPALEPDSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLIIYDVTDRPSG VSNRFSASKSANTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSST	77
1M9 nặng	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQA PGKGLEWMGGFEPEDGETIYAQKFQGRVTMTEDTSRDTAY MELSSLRSEDTAVYYCTTDQVYYRSGSYSGYVDYWGQGTL V	78
1O5 nặng	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGRTFSSYVISWVRQAP GQGLEWMGGIIPLFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYME LSSLRSDDTAVYYCARGAQLYYNDGSGYIF	79

	DYWGQGALV	
1O6 nặng	QVQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCKASGFSFISSAVQWVRQAR GQRLEWIGWIVVASANTNYAQKFRERVTITRDMSTNTAYM ELTSLRSEDTAVYYCAAEHRSPCSGGDSCYSLYYGMDVWG QGTLVTVSS	80
2A2 nặng	QVQLVQSGGGLVPPGGSLRLSCTASGFTVSNYGMSWVRQTP GKGLEWVSTISTSSGRTFYADSVEGRFTISGDNSKNTLYLQM NSLRVEDTAVYYCAKGPFGGDFDYWGQGTLVTVSS	81
2A2 nhẹ	QAVVTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVAIYLAWYQQKPG QAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAV YYCQQRGNWQYTFGQGTKLEIK	82
2C2 nặng	QVQLVQSGGGLVQPGRSLTLSCAASGFTFDVYAMHWVRQA PGKGLEWVAGISWNSGSVGYADSMKGRFTISRADNKNSLYL QINSLRAEDTALYYCAKAFWFGELSGYGMDVWGQGTLVTV SS	83
2C2 nhẹ	QAVVTQPPS.ASGFPGQSVTISCTGTSSDVGSYNYVSWYQQH PGKAPKLIIYAVTRRPSGVPERFSGSKSGNTASLTVSGLQAED EADYYCTSYAGNNKDVFGTGTKVTVL	84
2D12 nặng	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFNIYGISWVRQAP GQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAY MELRSLRSDDTAVYYCARPLWGEFYYDIWGQGTLVTVSS	85
2D12 nhẹ	QAVVTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSGYSAWYQQKP GQAPRLLIYGASKRAAGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF AVYYCQLFATSPPPFGQGTRLEIK	86
3A2 nặng	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYVMEWVRQA PGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVK.GRFTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARSEWESSYGSGNYYTDYFYYYAM DVWGPGTLVTVSS	87
3A2 nhẹ	QAVVTQSPLSLPVTPGEPASISCRSNQSLLRGIRYNYLDWYL QKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSATDFTLKISRVEA EDVGVYYCMQALQTPTTFGQGTRLEIK	88

3B4 nặng	QVQLEESGPTLVKPTQTLTLTCSFSGFSLTTTGVTVGWIRQPP GKALEWLALIYWDDDKRYSPSLKSRLTITKDTSKNQVVLTM TNMDPVDTATYYCAHSTGYYDSSGYRGALDAFAVWGQGT LVTVSS	89
3B4 nhẹ	QIVVTQFPDSPAVSLGERATINCKSSQSVLYHSNNKNYLAW YQQKPGQPPNLLIYWASARQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISS LQAEDVAVYYCQQYYSTPYTFGQGTKLEIK	90
3E23 nặng	QVQLVQSGPGLVKPSDTLSLTCSVSSDALRSRSYYWGWVRQ PPGKGLEWIGTVSYSGGTYYNPSLQSRVTVSVDTSKNHFSLR LNSVTAADAAVYYCARSYFYDGSGYYYLSYFDSWGQGTLV TVSS	91
3E23 nhẹ	QAVVTQEPS.LTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGHYPNWFQQK PGQPPRALIYSTDNKHSWTPARFSGSLLGVKAALTLSDVQPE DEADYYCLLHFGGVVVFGGGTKLTVL	92
3H5 nặng	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCSTSGFTFRMYGMHWVRQA PGKGLEWVAVIFNDGVKKYYGDAVKGRFTVSRDNSRNTLY LEMKSLRVDDTAAYYCARDGIPDPERGDYGGLDYWGQGTL VTVSS	93
3H5 nhẹ	QTVVTQSPSSLSASVGDTVTITCRASQSITSYLNWYQQKPGK APKLLIYATSSLQSGLPSRFSGSGYGTEFTLTISGLQPEDFATY YCQQSYSFPRTFGQGTKVEMD	94
3I21 nặng	QVQLVQSGGGLVQPGRSLRLSCATSGFIFDDYAMYWVRQA PGKGLEWVSGISWNSGNIAYADSVKGRFTISRADNKNSLYL EMNSLRAEDTALYYCVKDLYGYDILTGNGYDYWGQGTLVT VSS	95
3I21 nhẹ	QAVVTQSSLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLQSNGYNYLDWYL QKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDVGVYYCMQALQTPPTFGQGTKVEIK	96
3K11 nặng	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVPCKASGDTLSYYGITWVRRAP GQGLEWMGQIIPFFATTISAQKFQGRLTMTAEESTSTGYMER TFYMDLSSLRPEDTAVYYCAGGYYGSGSSGDYGLDVWGQG	97

	TLVTVSS	
3K11 nhẹ	QAVVTQPPS.VSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVNWYQQL PGTAPKLLIYGNNNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAE DEADYYCQSYDSSLSGSGVFGTGTEVTVL	98
4B8 nặng	QVQLVQSGPGLVKPSETLSLTCAVSGDSIGSRSFYWGWIRQP PGKGLEWIGSIYYNGTTYYKPSLKSRVTISLDTSKNQFSLRLS SLTATDTGVYYCARAPTYCSPSSCAVHWYFNLWGRGTLVT VSS	99
4B10 nặng	QVQLVQSGAELKKPGASVKVSCKASGYIFTKYGISWLRQAP GQGLEWVGWISAYNENTNYAEKFQGRVTLTTDASTSTAYM ELRNLRSDDTAVYFCAREVWFAEYIYWGQGTLVTVSS	100
9A11 nhẹ	QSVVTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGAYNYVSWYQQHP GKAPKLVIYDVANRPSGISDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDE ADYYCGSYTSDVSPVFSGGTKLTVL	101
9D14 nặng	QVQLVQSGSELKKPGASVKLSCKASGYTFTSHPMNWVRQA PGQGLEWMGWINTKTGNLTYAQGFTGRFVFSLDTSVRTAY LQISGLKAEDTAIYYCARDEYSGYDSVGVFRGSFDDFYGMD VWGQGTLVTVSS	102

BẢNG 3 - CÁC TRÌNH TỰ CỦA CHUỖI NẶNG CDR

Kháng thể	CDRH1 (SEQ ID NO:)	CDRH2 (SEQID NO:)	CDRH3 (SEQ ID NO:)
1H12	GYSFTSYG (103)	ISTYKGYT (104)	ARVLSETGYFYYYYYGMDV (105)
2B4	GYSFTSYS (106)	IDTNTGNP (107)	ATYYVDLWGSYRQDYYGMDV (108)
2H1	GYTFTSYG (109)	ISTYNGDT (110)	ARDFEFPGDCSGGSCYSRFIYQHNDMD V (111)

3E23	SDALRSRSYY (112)	VSYSGGT (113)	ARSYFYDGSGYYYLSYFDS (114)
3N23	GFTFSNYA (115)	IWYDGSNK (116)	ARGDYVLDY (117)
4J14	GGTSSTYA (118)	SIPVFATV (119)	ASPYCSSMNCYTTFYYFDF (120)
4J21	GYSFTSYS (121)	IDTNTGNP (122)	ATYYVDLWGSYRQDYYGMDV (123)
4N12	GYILSKLS (124)	SEREDGET (125)	ATGGFWSMIGGNGVDY (126)
5M16	GYTFTSYF (127)	TYPGGGSP (128)	ARGAHRSIGTTPLDS (129)
5O14	GFTFSMYG (130)	IWNDGSKE (131)	ARDGIPDPERGDYGGLDY (132)
8G18	GGTFNNNG (133)	IVPNFGTP (134)	ARGRTAVTPMQLGLQFYFDF (135)
1I9	GYTFTDNS (136)	INPNTGVS (137)	AREENDSSGYYL (138)
1L1	GFSLSISGVG (139)	IYWDDDK (140)	AHSMTKGGAIYGQAYFEY (141)
1M9	GYTLTELS (142)	FEPEDGET (143)	TTDQVYYRSGSYSGYVDY (144)
1O5	GRTFSSYV (145)	IIPLFGTA (146)	ARGAQLYYNDGSGYIFDY (147)
1O6	GFSFISSA (148)	IVVASANT (149)	AAEHRSPCSGGDSCYSLYYGMDV (150)
2A2	GFTVSNYG (151)	ISTSSGRT (152)	AKGPFGGDFDY (153)

2C2	GFTFDVYA (154)	ISWNSGSV (155)	AKAFWFGELSGYGMDV (156)
2D12	GYSFNIYG (157)	ISAYNGNT (158)	ARPLWGEFYYDI (159)
3A2	GFTFSNYV (160)	ISYDGSNK (161)	ARSEWESSYGSGNYYTDYFYYYAMDV (162)
3B4	GFSLTTTGVT (163)	IYWDDDK (164)	AHSTGYYDSSGYRGALDAFAV (165)
3E23	SDALRSRSYY (166)	VSYSGGT (167)	ARSYFYDGSGYYYLSYFDS (168)
3H5	GFTFRMYG (169)	IFNDGVKK (170)	ARDGIPDPERGDYGGLDY (171)
3I21	GFIFDDYA (172)	ISWNSGNI (173)	VKDLYGYDILTGNGYDY (174)
3K11	GDTLSYYG (175)	IIPFFATT (176)	TAVYYCAGGYYGSGSSGDYGLDV (177)
4B8	GDSIGSRSFY (178)	IYYNGTT (179)	ARAPTYCSPSSCAVHWYFNL (180)
4B10	GYIFTKYG (181)	ISAYNENT (182)	AREVWFAEYIY (183)
9D14	GYTFTSHP (184)	INTKTGNL (185)	ARDEYSGYDSVGVFRGSFDDFYGMDV (186)

BẢNG 4 - CÁC TRÌNH TỰ CỦA CHUỖI NHẸ CDR

Kháng thể	CDRL1 (SEQ ID NO:)	CDRL2 (SEQ ID NO:)	CDRL3 (SEQ ID NO:)
1H12	SSNIGADYN (187)	GNT (188)	QSYDSSLSASV (189)
2B4	SSNIGSNP (190)	TNN (191)	AVWDDSLSGRWV (192)
2H1	SSNIGNHY (193)	DNY (194)	GTWDSSLSAVV (195)
3E23	TGAVTSGHY (196)	STD (197)	LLHFGGVVV (198)
3N23	QSIPSY (199)	ATS (200)	QQSYNTGIFT (201)
4J14	SSDFGTYNY (202)	DVS (203)	SSYTSGSTLYGGG (204)
4J21	SSNIGSNP (205)	TNN (206)	AVWDDSLSGRWV (207)
4N12	QDIRNN (208)	GTS (209)	LQHNSYPPT (210)
5O14	QSISSY (211)	ATS (212)	QQSYSFPRT (213)
8G18	SGAVTSDYY (214)	SAS (215)	LVYSGDGVV (216)
1I9	QSISTY (217)	AAS (218)	QQSYRTPWT (219)
1L1	DSDVGGYNY (220)	DVT (221)	SSYTSSSTLV (222)
2A2	QSVAIY (223)	DAS (224)	QQRGNWQYT (225)
2C2	SSDVGSYNY (226)	AVT (227)	TSYAGNNKDV (228)

2D12	QSVSSGY (229)	GAS (230)	QLFATSPPP (231)
3A2	QSLLRGIRYNY (232)	LGS (233)	MQALQTPTT (234)
3B4	QSVLYHSNNKNY (235)	WAS (236)	QQYYSTPYT (237)
3E23	TGAVTSGHY (238)	STD (239)	LLHFGGVVV (240)
3H5	QSITSY (241)	ATS (242)	QQSYSFPRT (243)
3I21	QSLLQSNGYNY (244)	LGS (245)	MQALQTPPT (246)
3K11	SSNIGAGYD (247)	GNN (248)	QSYDSSLSGSGV (249)
9A11	SSDVGAYNY (250)	DVA (251)	GSYTSDVSPV (252)

BẢNG 5 - CÁC ĐẶC TÍNH CỦA KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG Ở NGƯỜI ĐẶC HIỆU VỚI VIRUT CHIKUNGUNYA

mAb[1]	Dưới lớp[2] IgG	Chuỗi nhẹ[2] λ/κ	Liên kết ELISA với vùng ngoại bào E2 (10 µg/mL)[3]	Sự Trung hòa kháng CHIKV VRP (chủng SL15649)[4] EC_{50} bằng ng/mL[5] [95% khoảng tin cậy]
2H1	IgG2	λ	++	8 [6 - 10]
4N12	IgG2	κ	-	8 [7 - 10]
2B4	IgG1	λ	++	14 [11 - 17]
4J21	IgG1	λ	++	5 [4 - 6]
5M16	IgG1	κ	+++	5 [4 - 6]
9D14	IgG1	λ	+++	6 [5 - 7]
1H12	IgG1	λ	+++	17 [14 - 20]

8E22	IgG1	λ	++	17 [14 - 19]
8G18	IgG1	λ	++	17 [14 - 19]
10N24	IgG1	κ	-	21 [17 - 26]
8I4	IgG1	κ	+++	8 [5 - 14]
3N23	IgG1	κ	-	25 [21 - 30]
5O14	IgG1	κ	+++	38 [30 - 47]
4J14	IgG1	λ	++	23 [20 - 26]
3E23	IgG2	λ	-	11 [9 - 13]
1L1	IgG1	λ	+/-	18 [15 - 22]
3B4	IgG3	κ	-	>
4B8	IgG1	λ	+++	0,6 [0,4 - 0,8]
4G20	IgG1	λ	-	95 [60 - 160]
1O5	IgG1	λ	-	138 [110 - 170]
1O6	IgG3	λ	-	5.200 [4.100 – 6.600]
2L5	NT	NT	-	4.600 [2.400 – 9.500]
3A2	IgG1	κ	+++	1.300 [830 – 1.900]
5F19	IgG1	λ	+++	>
1M9	IgG1	κ	-	>
1I9	IgG1	κ	-	>
4B10	IgG1	κ	-	>
2C2	IgG1	λ	-	>
2D12	IgG1	κ	-	>
5N23	IgG1	λ	+++	>
CHK-152 ở chuột	IgG2c	κ	-	3 [2 - 4]

[1]Thứ tự của các kháng thể phản ánh mức độ hiệu quả và độ rộng của các kháng thể trong các thử nghiệm trung hòa kháng các thể phân lập CHIKV lâm sàng của các kiểu gen đa dạng.

[2]Việc sử dụng globulin miễn dịch isotyp, dưới kiểu và chuỗi nhẹ được xác định bởi phương pháp ELISA. NT nghĩa là không được thử nghiệm do sự tăng trưởng kém của dòng tế bào B.

[3](-) nghĩa là không có liên kết phát hiện được [OD < 0,1]; (+/-) nghĩa là liên kết yếu [OD 0,31-0,499]; (++) có nghĩa là liên kết trung bình [OD 0,5-0,99]; (+++) nghĩa là liên kết mạnh [OD> 1,0].

[4]Các trị số thể hiện dữ liệu kết hợp đại diện từ hai hoặc nhiều thử nghiệm độc lập.

[5]Nồng độ (ng/mL) tại đó 50% virut đã được trung hòa (EC_{50}). (>) biểu thị giá trị EC_{50} lớn hơn nồng độ cao nhất của mAb được thử nghiệm (10 µg/ml). N.D. = Không hoàn thành.

BẢNG 6 - CÁC VỊ TRÍ CHÍNH CỦA KHÁNG NGUYÊN CỦA CÁC KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG Ở NGƯỜI ĐẶC HIỆU VỚI VIRUT CHIKUNGUNYA

mAb[1]	Nhóm liên kết cạnh tranh đối với protein E2 đã được làm sạch[2]	Ánh xạ đột biến	
		Miền E2[3]	Các phần dư E2 nhờ đó mà giảm liên kết đã được ghi nhận khi biến đổi thành alanin
2H1	Liên kết kém	E2-Miền A	R80, T116
4N12	NT	Vòm	D250
2B4	Liên kết kém	Không giảm ##	-
4J21	Liên kết kém	Không giảm	-
5M16	2	Vòm	G253
9D14	2	Không giảm	-
1H12	1/2	Miền A/B, Vòm	T58, D59, D60, R68, D71, I74, D77, T191, N193, K234

8E22	Liên kết kém	Miền A, Vòm	H62, W64, R68, H99, D117, I255
8G18	Liên kết kém	Miền A	H62, W64, D117
10N24	NT	Miền A,B	W64, D71, R80, T116, D117, I121, N187, I190
8I4	NSF Ab	Miền B, Vòm	M171, Q184, I190, N193, V197, R198, Y199, G209, L210, K215, K234, V242, I255
3N23	NT	Miền A, Vòm	D60, R68, G98, H170, M171, K233, K234
5O14	2	Không giảm	-
4J14	Liên kết kém	Miền A/B	D63, W64, T65, R80, I121, A162, N193
3E23	NT	Miền A	W64
1L1	Liên kết kém	Vòm	G253
3B4	NT	Miền B	V192, Q195
4B8	2	Không giảm	-
4G20	NT	Miền B	D174, R198, Y199, K215
1O5	NT	Miền A	W64, T65
1O6	2	Miền A	R80
2L5	NT	Không giảm	-
3A2	3	Miền B	I190, R198, Y199, G209, L210, T212
5F19	4	Miền A	H18
1M9	NT	Miền A, Vòm	R36, H62, R80, Q146, E165, E166, N231, D250, H256

1I9	NT	E2	Không kết luận
4B10	NT	Không giảm	-
2C2	NT	Không giảm	Không kết luận
2D12	NT	E2	Không kết luận
5N23	1	Miền A, Vòm	E24, D117, I121
CHK-152 ở chuột	NT	E2-Miền A, E2-Miền B	D59, W235, A11, M74, G194, N193, T212, H232[4]

[1]Thứ tự của các kháng thể phản ánh mức độ hiệu quả và độ rộng của các kháng thể trong các thử nghiệm trung hòa kháng các thể phân lập CHIKV lâm sàng của các kiểu gen đa dạng.

[2]Các trị số thể hiện dữ liệu kết hợp đại diện từ hai thử nghiệm độc lập. Liên kết kém biểu thị liên kết mAb không hoàn toàn với E2 trên cảm biến sinh học để đánh giá sự cạnh tranh. NT nghĩa là không được thử nghiệm vì Ab không liên kết vùng ngoại bào E2 trong ELISA; NSF Ab nghĩa là không đủ hàm lượng mAb.

[3]NotReact nghĩa là mAb không phản ứng với các protein có vỏ tự nhiên và không thể được thử nghiệm trong hệ thống này.

NoReduct nghĩa là mAb đã liên kết với các protein E tự nhiên, nhưng không giảm được ghi nhận có thể tái sản xuất cho thể đột biến bất kỳ. DA là miền A; DB là miền B; Vòm có thể là vòm 1, vòm 2, hoặc cả hai.

[4] Các nhóm đã được xác định bằng cách cho tiếp xúc với mAb trong khi tái tạo cryo-EM trước đó.

BẢNG 7 - TÍNH HIỆU QUẢ VÀ ĐỘ RỘNG IN VITRO CỦA CÁC KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG Ở NGƯỜI ĐẶC HIỆU VỚI VIRUT CHIKUNGUNYA

mAb[1]	Trung hòa kháng CHKV kháng lại kiểu gen và chủng* EC_{50}, ng/mL[2] (95% khoảng tin cậy)

	Kiểu gen Tây Phi	Kiểu gen ECSA	Kiểu gen châu Á	
	Chủng NI 64 IbH 35	Chủng LR2006 OPY1 (LR)	Chủng RSUI	Chủng 99659 Caribê 2014
2H1	3,7 (3,3-4,3)	5,6 (4,9-6,3)	5,9 (5,3-6,7)	5,5 (4,7-6,5)
4N12	2,5 (2,0-3,1)	4,0 (3,3-5,0)	6,5 (5,7-7,3)	7,3 (5,9-9,2)
2B4	3,2 (2,8-3,7)	5,6 (4,6-6,7)	6,5 (5,6-7,7)	7,0 (6,0-8,2)
4J21	5,2 (4,3-6,4)	7,4 (6,6-8,3)	7,7 (7,0-8,6)	7,2 (5,3-9,8)
5M16	6,0 (5,5-6,6)	5,9 (5,0-6,8)	8,4 (6,7-10,4)	11,7 (9,7-14,1)
9D14	2,1 (1,6-2,7)	2,9 (2,3-3,7)	6,3 (4,7-8,4)	86,0 (31,5-235)
1H12	3,0 (2,5-3,5)	7,5 (6,7-8,4)	11,7 (9,3-14,8)	11,6 (8,2-16,2)
8E22	8,2 (7,0-9,7)	7,2 (6,4-8,3)	42,5 (30,8-58,5)	138,9 (64,7-298)
8G18	4,7 (4,1-5,3)	7,3 (6,3-8,4)	34,9 (24,9-48,9)	52,4 (24,1-114)
10N24	7,9 (6,9-9,0)	9,5 (8,2-11,0)	15,9 (13,2-19,2)	23,6 (18,3-30,5)
8I4	6,9 (3,8-12,3)	6,2 (4,5-8,4)	153 (78-299)	>
3N23	6,0 (5,0-7,2)	10,1 (8,9-11,5)	14,1 (11,6-17,1)	8,7 (7,0-10,9)
5O14	6,7 (5,5-8,3)	12,1 (10,9-13,5)	17,3 (14,2-21,1)	6,2 (5,3-7,2)
4J14	12,9 (11,2-15,0)	17,7 (16,1-19,4)	23,1 (20-27)	23,0 (18,5-28,4)
3E23	19,4 (15,2-25,0)	18,7 (16,3-21,5)	36,0 (30,3-42,9)	38,0 (30,3-47,5)
1L1	18,6 (15,5-22,4)	24,2 (21,3-27,5)	34,3 (29-40,7)	N.D.
3B4	18,7 (10,7-32,8)	29,6 (18,7-46,8)	271 (144-511)	N.D.

4B8	22,8 (12,4-41,8)	28,1 (19,8-39,9)	234 (142-386)	N.D.
4G20	22,3 (17,3-29,0)	34,9 (28,2-43,8)	131,4 (88,5-195)	N.D.
1O5	30,1 (22,6-35,3)	37,6 (32,6-43,4)	48,9 (37,8-63,2)	N.D.
1O6	61,7 (50,8-74,8)	57,5 (48,8-68,1)	N.D.	N.D.
2L5	1.076 (748-1.548)	2.361 (1.460-3.819)	5.632 (3.904-8.128)	N.D.
3A2	1.566 (1.111-2.207)	1.396 (952-2.046)	>	N.D.
5F19	>	9.064 (2.911-28.249)	>	N.D.
1M9	>	>	6.187 (2.795-13.709)	N.D.
1I9	>	>	>	N.D.
4B10	>	>	>	N.D.
2C2	>	>	>	N.D.
2D12	>	>	>	N.D.
5N23	>	>	>	N.D.
CHK-152 ở chuột				

[1]Thứ tự của các kháng thể phản ánh mức độ hiệu quả và độ rộng của các kháng thể trong các thử nghiệm trung hòa kháng các thể phân lập CHIKV lâm sàng của các kiểu gen đa dạng.

[2]Nồng độ (ng/mL) mà ở đó 50% virut đã được trung hòa (EC_{50}). (>) biểu thị trị số EC_{50} lớn hơn nồng độ mAb cao nhất đã được thử nghiệm (10µg/ml). N.D. = Không hoàn thành.

* * * * * * * * * * * * * * * * * *

Tất cả các dược phẩm và phương pháp được bộc lộ và yêu cầu bảo hộ ở đây có thể được tạo ra và thực hiện mà không cần phải thử nghiệm quá mức sau khi đọc bản mô tả sáng chế này. Trong khi các dược phẩm và phương pháp theo sáng chế đã được mô tả theo các phương án được ưu tiên, sẽ là rõ ràng với các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này rằng các biến thể có thể được áp dụng với các dược phẩm và các phương pháp này và trong các bước hoặc theo trình tự các bước của phương pháp đã được mô tả ở đây mà không chệch khỏi ý tưởng, tinh thần và phạm vi của sáng chế. Cụ thể hơn, sẽ là rõ ràng rằng một vài chất nhất định có liên quan đến cả hóa học và vật lý có thể được thay thế cho các chất được mô tả trong bản mô tả này trong khi đạt được kết quả y hệt hoặc tương tự. Tất cả các thay thế và sửa đổi tương tự như vậy rõ ràng với các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này thấy rằng là nằm trong phạm vi ý tưởng và khái niệm của sáng chế như được xác định bởi các yêu cầu kèm theo.

VII. TÀI LIỆU THAM KHẢO

Các tài liệu tham khảo sau, ở chừng mực mà chúng cung cấp các quy trình điển hình hoặc các chi tiết khác bổ sung cho các nội dung được đưa ra ở đây, được đưa vào bản mô tả này đặc biệt bằng cách viện dẫn.

"Antibodies: A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1988.

Abbondanzo et al., Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol., 12(4), 480-489, 1990.

Allred et al., Arch. Surg., 125(1), 107-113, 1990.

Atherton et al., Biol. of Reproduction, 32, 155-171, 1985.

Austin et al., PLoS Pathog 8, e1002930, 2012.

Brehin, et al., Virology 371:185-195, 2008.

Brown et al., J. Immunol. Meth., 12;130(1), :111-121, 1990.

Campbell, Trong :Monoclonal Antibody Technology, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 13, Burden và Von Knippenberg, Eds. pp. 75-83, Amsterdam, Elsevier, 1984.

Capaldi et al., Biochem.Biophys. Res. Comm., 74(2):425-433, 1977.

CDC, Chikungunya in the Americas. (Atlanta, GA: Bộ Y tế và Dịch vụ Nhân sinh Hoa Kỳ). địa chỉ website tại *cdc.gov/chikungunya/geo/americas.html, 2014.*

CDC, Chikungunya virus (Atlanta, GA: Bộ Y tế và Dịch vụ Con người Mỹ). địa chỉ web site tại *cdc.gov/media/releases/2013/p1218-chikungunyas.html, 2013.*

Christian et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 110:18662-18667, 2013.

Chu et al., Deciphering the protective role of adaptive immunity to CHIKV/IRES a novel candidate vaccine against Chikungunya in the A129 mouse model. Vaccine 31:3353-3360, 2013.

Couderc et al., J. Infect. Dis. 200, 516-523, 2009.

De Jager et al., Semin. Nucl. Med. 23(2), 165-179, 1993.

Dholakia et al., J. Biol. Chem., 264, 20638-20642, 1989.

Doolittle and Ben-Zeev, Methods Mol. Biol., 109, :215-237, 1999.

Edwards & Brown, J. Gen. Virol. 67 (Pt 2), 377-380, 1986.

Edwards et al., J. Gen. Virol. 67 (Pt 2), 377-380, 1986.

Fong et al., J. Virol. 88:14364-14379, 2014.

Fric et al., J. Infect. Dis. 207:319-322, 2013.

Gefter et al., Somatic Cell Genet., 3:231-236, 1977.

Goh et al., Clin. Immunol. 149:487-497, 2013.

Gulbis and Galand, Hum. Pathol. 24(12), 1271-1285, 1993.

Guo et al., Sci. Transl. Med. 3:99 ra85, 2001.

Hallengard et al., J. Virol. 88:13333-13343, 2014.

Hawman et al., J. Virol. 87, 13878-13888, 2013.

Hong et al., J. Virol. 87:12471-12480, 2013.

Kam et al., EMBO Mol. Med. 4, 330-343, 2012b.

Kam et al., J. Virol. 86, 13005-13015, 2012a.

Kam et al., PLoS One 9, e95647, 2014.

Khatoon et al., Ann. of Neurology, 26, 210-219, 1989.

Kielian et al., Virut es 2:796-825, 2010.

King et al., J. Biol. Chem., 269, 10210-10218, 1989.

Kohler and Milstein, Eur. J. Immunol., 6, 511-519, 1976.

Kohler and Milstein, Nature, 256, 495-497, 1975.

Krause et al., J. Immunol. 187:3704-3711, 2011b.

Krause et al., J. Virol. 84:3127-3130, 2010.

Krause et al., J. Virol. 85:10905-10908, 2011a.

Krause et al., J. Virol. 86:6334-6340, 2012.

Kyte and Doolittle, J. Mol. Biol., 157(1):105-132, 1982.

Lanciotti & Valadere, Emerg Infect Dis 20, 2014.

Lee et al., PLoS Pathog. 7:e1002390, 2011.

Levitt et al., Vaccine 4, 157-162, 1986.

Lum et al., J. Immunol. 190:6295-6302, 2013.

Mainou et al., MBio 4, 2013.

Masrinoul et al., Virology 464-465, 111-117, 2014.

Messer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 111:1939-1944, 2014.

Morrison et al., Am J Pathol, 178:32-40, 2011.

Nakamura et al., In: Enzyme Immunoassays: Heterogeneous and Homogeneous Systems, Chapter 27, 1987.

O'Shannessy et al., J. Immun. Meth., 99, 153-161, 1987.

Paes et al., J. Am. Chem. Soc., 131:6952-6954, 2009.

Pal et al., J. Virol. 88:8213-8226, 2014.

Pal et al., PLoS Pathog 9, e1003312, 2013.

Persic et al., Gene 187:1, 1997

Potter and Haley, Meth. Enzymol., 91, 613-633, 1983.

Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Ed., 3:624-652, 1990.

R.C. Team, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2014.

Schilte et al., PLoS Negl. Trop. Dis. 7:e2137, 2013.

Selvarajah et al., PLoS Negl. Trop. Dis. 7:e2423, 2013.

Sissoko et al., PLoS Negl. Trop. Dis. 3:e389, 2009.

Smith et al., J. Virol. 86, 2665-2675, 2012.

Smith et al., J. Virol. 88, 12233-12241, 2014.

Smith et al., J. Virol., 86:2665-2675, 2012.

Smith et al., MBio 4, e00873-00813, 2013a.

Smith et al., J. Infect. Dis. 207, 1898-1908, 2013b.

Staples et al., Clin. Infect. Dis., 49, 942-948, 2009.

Sun et al., Elife, 2:e00435, 2013.

Sun et al., J. Steroid Biochem., 26(1):83-92, 1987.

Sun et al., J. Virol., 88:2035-2046, 2014.

Tang et al., J. Biol. Chem., 271:28324-28330, 1996.

Thornburg et al., J. Clin. Invest., 123:4405-4409, 2013.

U.S. Patent 3.817.837

U.S. Patent 3.850.752

U.S. Patent 3.939.350

U.S. Patent 3.996.345

U.S. Patent 4.196.265

U.S. Patent 4.275.149

U.S. Patent 4.277.437

U.S. Patent 4.366.241

U.S. Patent 4.472.509

U.S. Patent 4.554.101

U.S. Patent 4.680.338

U.S. Patent 4.816.567

U.S. Patent 4.867.973

U.S. Patent 4.938.948

U.S. Patent 5.021.236

U.S. Patent 5.141.648

U.S. Patent 5.196.066

U.S. Patent 5.563.250

U.S. Patent 5.565.332

U.S. Patent 5.856.456

U.S. Patent 5.880.270

Vander Veen et al., Anim Health Res Rev, 13:1-9, 2012.

Voss et al., Nature, 468:709-712, 2010.

Warter et al., J. Immunol., 186:3258-3264, 2011.

Wawrzynczak & Thorpe, In: Immunoconjugates, Antibody Conuugates In Radioimaging And Therapy Of Cancer, Vogel (Ed.), NY, Oxford University Press, 28, 1987.

Yu et al., Nature 455:532-536, 2008.

Yêu cầu bảo hộ

1. Kháng thể đơn dòng tái tổ hợp hoặc mảnh kháng thể liên kết miễn dịch với virut Chikungunya, trong đó kháng thể hoặc mảnh kháng thể có các trình tự CDR của chuỗi nặng và nhẹ được bắt cặp tạo dòng như nêu dưới đây:

dòng vô tính 1H12 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 103-105; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 187-189);

dòng vô tính 4N12 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 124-126; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 208-210);

dòng vô tính 2H1 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 109-111; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 193-195);

dòng vô tính 4J14 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 118-120; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 202-204);

dòng vô tính 3N23 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 115-117; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 199-201);

dòng vô tính 5O14 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 130-132; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 211-213); hoặc

dòng vô tính 3E23 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 112-114; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 196-198).

2. Kháng thể đơn dòng tái tổ hợp hoặc mảnh kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh kháng thể này được mã hoá bởi các trình tự biến đổi của chuỗi nhẹ và nặng theo các trình tự được bắt cặp tạo dòng như nêu trong Bảng 1.

3. Kháng thể đơn dòng tái tổ hợp hoặc mảnh kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh kháng thể này được mã hoá bởi các trình tự biến đổi của chuỗi nhẹ và nặng có mức độ tương đồng ít nhất là 70%, 80% hoặc 90% với các trình tự được bắt cặp tạo dòng như nêu trong Bảng 1 và có các trình tự CDR của chuỗi nặng và nhẹ được bắt cặp tạo dòng như nêu dưới đây:

dòng vô tính 1H12 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 103-105; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 187-189);

dòng vô tính 4N12 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 124-126; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 208-210);

dòng vô tính 2H1 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 109-111; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 193-195);

dòng vô tính 4J14 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 118-120; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 202-204);

dòng vô tính 3N23 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 115-117; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 199-201);

dòng vô tính 5O14 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 130-132; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 211-213); hoặc

dòng vô tính 3E23 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 112-114; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 196-198).

4. Kháng thể đơn dòng tái tổ hợp hoặc mảnh kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh kháng thể này được mã hoá bởi các trình tự biến đổi của chuỗi nhẹ và nặng có mức độ tương đồng ít nhất là 95% với các trình tự được bắt cặp tạo dòng dòng như nêu trong Bảng 1 và có các trình tự CDR của chuỗi nặng và nhẹ được bắt cặp tạo dòng như nêu dưới đây:

dòng vô tính 1H12 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 103-105; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 187-189);

dòng vô tính 4N12 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 124-126; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 208-210);

dòng vô tính 2H1 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 109-111; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 193-195);

dòng vô tính 4J14 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 118-120; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 202-204);

dòng vô tính 3N23 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 115-117; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 199-201);

dòng vô tính 5O14 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 130-132; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 211-213); hoặc

dòng vô tính 3E23 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 112-114; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 196-198).

5. Kháng thể đơn dòng tái tổ hợp hoặc mảnh kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh kháng thể này có các trình tự biến đổi của chuỗi nhẹ và nặng theo các trình tự được bắt cặp tạo dòng như nêu trong Bảng 2.

6. Kháng thể đơn dòng tái tổ hợp hoặc mảnh kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh kháng thể này có các trình tự biến đổi của chuỗi nhẹ và nặng có mức độ tương đồng là 95% với các trình tự được bắt cặp tạo dòng như nêu trong Bảng 2 và có các trình tự CDR của chuỗi nặng và nhẹ được bắt cặp tạo dòng như nêu dưới đây:

dòng vô tính 1H12 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 103-105; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 187-189);

dòng vô tính 4N12 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 124-126; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 208-210);

dòng vô tính 2H1 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 109-111; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 193-195);

dòng vô tính 4J14 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 118-120; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 202-204);

dòng vô tính 3N23 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 115-117; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 199-201);

dòng vô tính 5O14 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 130-132; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 211-213); hoặc

dòng vô tính 3E23 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 112-114; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 196-198).

7. Kháng thể đơn dòng tái tổ hợp hoặc mảnh kháng thể theo điểm 1, trong đó mảnh kháng thể là kháng thể ScFv tái tổ hợp (mảnh biến đổi chuỗi đơn), mảnh Fab, mảnh $F(ab')_2$ hoặc mảnh Fv.

8. Kháng thể đơn dòng tái tổ hợp hoặc mảnh kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể là kháng thể khảm, hoặc kháng thể đặc hiệu kép mà hướng đích một kháng nguyên của virut Chikungunya không phải glycoprotein.

9. Kháng thể đơn dòng tái tổ hợp hoặc mảnh kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này là IgG.

10. Kháng thể đơn dòng tái tổ hợp hoặc mảnh kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh kháng thể này chứa thêm peptit thâm nhập tế bào và/hoặc nội bào.

11. Tế bào lai hoặc tế bào nhân tạo có axit nucleic mã hoá kháng thể hoặc mảnh kháng thể, trong đó kháng thể hoặc mảnh kháng thể có các trình tự CDR của chuỗi nặng và nhẹ được bắt cặp tạo dòng như nêu dưới đây:

dòng vô tính 1H12 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 103-105; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 187-189);

dòng vô tính 4N12 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 124-126; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 208-210);

dòng vô tính 2H1 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 109-111; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 193-195);

dòng vô tính 4J14 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 118-120; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 202-204);

dòng vô tính 3N23 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 115-117; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 199-201);

dòng vô tính 5O14 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 130-132; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 211-213); hoặc

dòng vô tính 3E23 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 112-114; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 196-198).

12. Kháng thể đơn dòng tái tổ hợp hoặc mảnh kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh kháng thể chứa:

- CDRH1 có trình tự SEQ ID NO:103;
- CDRH2 có trình tự SEQ ID NO:104;
- CDRH3 có trình tự SEQ ID NO:105;
- CDRL1 có trình tự SEQ ID NO:187;
- CDRL2 có trình tự SEQ ID NO:188;
- CDRL3 có trình tự SEQ ID NO:189.

13. Kháng thể đơn dòng tái tổ hợp hoặc mảnh kháng thể theo điểm 1, trong đó vùng biến đổi của chuỗi nặng của nó chứa hoặc có trình tự SEQ ID NO:53 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của nó chứa hoặc có trình tự SEQ ID NO:54.

14. Dược phẩm chứa kháng thể đơn dòng tái tổ hợp hoặc mảnh kháng thể theo điểm 1.

15. Dòng tế bào sản sinh ra kháng thể đơn dòng hoặc mảnh kháng thể có các trình tự CDR của chuỗi nặng và nhẹ được bắt cặp tạo dòng như nêu dưới đây:

dòng vô tính 1H12 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 103-105; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 187-189);

dòng vô tính 4N12 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 124-126; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 208-210);

dòng vô tính 2H1 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 109-111; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 193-195);

dòng vô tính 4J14 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 118-120; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 202-204);

dòng vô tính 3N23 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 115-117; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 199-201);

dòng vô tính 5O14 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 130-132; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 211-213); hoặc

dòng vô tính 3E23 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 112-114; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 196-198).

16. Phương pháp sản xuất kháng thể đơn dòng hoặc mảnh kháng thể, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

(a) nuôi cấy dòng tế bào sản sinh ra kháng thể đơn dòng hoặc mảnh kháng thể;

(b) tinh chế kháng thể đơn dòng hoặc mảnh kháng thể đã được sản sinh; và tuỳ ý

(c) lập công thức kháng thể đơn dòng hoặc mảnh kháng thể này thành dược phẩm,

trong đó kháng thể hoặc mảnh kháng thể được đặc trưng bởi các trình tự CDR của chuỗi nặng và nhẹ được bắt cặp tạo dòng như nêu dưới đây:

dòng vô tính 1H12 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 103-105; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 187-189);

dòng vô tính 4N12 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 124-126; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 208-210);

dòng vô tính 2H1 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 109-111; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 193-195);

dòng vô tính 4J14 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 118-120; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 202-204);

dòng vô tính 3N23 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 115-117; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 199-201);

dòng vô tính 5O14 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 130-132; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 211-213); hoặc

dòng vô tính 3E23 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 112-114; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 196-198).

17. Bộ kit chứa kháng thể đơn dòng tái tổ hợp hoặc mảnh kháng thể theo điểm 1 và tùy ý có vật liệu đóng gói.

18. Dược phẩm theo điểm 14, trong đó kháng thể hoặc mảnh kháng thể chứa:

- CDRH1 có trình tự SEQ ID NO:103;
- CDRH2 có trình tự SEQ ID NO:104;
- CDRH3 có trình tự SEQ ID NO:105;
- CDRL1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO:187;
- CDRL2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO:188;
- CDRL3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO:189.

19. Dược phẩm theo điểm 14, trong đó vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa hoặc có trình tự SEQ ID NO:53 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa hoặc có trình tự SEQ ID NO:54.

20. Tế bào lai hoặc tế bào nhân tạo theo điểm 11, trong đó kháng thể hoặc mảnh kháng thể được mã hoá bởi các trình tự biến đổi của chuỗi nhẹ và nặng theo các trình tự được bắt cặp tạo dòng như nêu trong Bảng 1.

21. Tế bào lai hoặc tế bào nhân tạo theo điểm 11, trong đó kháng thể hoặc mảnh kháng thể được mã hoá bởi các trình tự biến đổi của chuỗi nhẹ và nặng có mức độ tương đồng ít nhất là 70%, 80%, hoặc 90% với các trình tự được bắt cặp tạo dòng như nêu trong Bảng 1 và có các trình tự CDR của chuỗi nặng và nhẹ như nêu dưới đây:

dòng vô tính 1H12 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 103-105; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 187-189);

dòng vô tính 4N12 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 124-126; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 208-210);

dòng vô tính 2H1 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 109-111; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 193-195);

dòng vô tính 4J14 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 118-120; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 202-204);

dòng vô tính 3N23 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 115-117; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 199-201);

dòng vô tính 5O14 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 130-132; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 211-213); hoặc

dòng vô tính 3E23 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 112-114; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 196-198).

22. Tế bào lai hoặc tế bào nhân tạo theo điểm 11, trong đó kháng thể hoặc mảnh kháng thể được mã hoá bởi các trình tự biến đổi của chuỗi nhẹ và nặng có mức độ tương đồng ít nhất là 95% với các trình tự được bắt cặp tạo dòng như nêu trong Bảng 1 và có các trình tự CDR của chuỗi nặng và nhẹ như nêu dưới đây:

dòng vô tính 1H12 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 103-105; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 187-189);

dòng vô tính 4N12 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 124-126; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 208-210);

dòng vô tính 2H1 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 109-111; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 193-195);

dòng vô tính 4J14 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 118-120; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 202-204);

dòng vô tính 3N23 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 115-117; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 199-201);

dòng vô tính 5O14 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 130-132; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 211-213); hoặc

dòng vô tính 3E23 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 112-114; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 196-198).

23. Tế bào lai hoặc tế bào nhân tạo theo điểm 11, trong đó kháng thể hoặc mảnh kháng thể bao gồm các trình tự biến đổi của chuỗi nhẹ và nặng theo các trình tự được bắt cặp tạo dòng như nêu trong Bảng 2.

24. Tế bào lai hoặc tế bào nhân tạo theo điểm 11, trong đó kháng thể hoặc mảnh kháng thể bao gồm các trình tự biến đổi của chuỗi nhẹ và nặng có mức độ tương đồng là 95% với các trình tự được bắt cặp tạo dòng như nêu trong Bảng 2 và có các trình tự CDR của chuỗi nặng và nhẹ như nêu dưới đây:

dòng vô tính 1H12 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 103-105; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 187-189);

dòng vô tính 4N12 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 124-126; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 208-210);

dòng vô tính 2H1 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 109-111; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 193-195);

dòng vô tính 4J14 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 118-120; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 202-204);

dòng vô tính 3N23 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 115-117; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 199-201);

dòng vô tính 5O14 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 130-132; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 211-213); hoặc

dòng vô tính 3E23 (các CDR của V_H 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 112-114; và các CDR của V_L 1-3 lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 196-198).

25. Tế bào lai hoặc tế bào nhân tạo theo điểm 11, trong đó mảnh kháng thể là kháng thể ScFv tái tổ hợp (mảnh biến đổi chuỗi đơn), mảnh Fab, mảnh $F(ab')_2$ hoặc mảnh Fv.

26. Tế bào lai hoặc tế bào nhân tạo theo điểm 11, trong đó kháng thể là kháng thể khảm, hoặc kháng thể đặc hiệu kép mà hướng đích một kháng nguyên của virut Chikungunya không phải glycoprotein.

27. Tế bào lai hoặc tế bào nhân tạo theo điểm 11, trong đó kháng thể này là IgG.

28. Tế bào lai hoặc tế bào nhân tạo theo điểm 11, trong đó kháng thể hoặc mảnh kháng thể này chứa thêm peptit thâm nhập tế bào và/hoặc nội bào.

29. Tế bào lai hoặc tế bào nhân tạo theo điểm 11, trong đó kháng thể hoặc mảnh kháng thể này chứa:

- CDRH1 có trình tự SEQ ID NO:103;
- CDRH2 có trình tự SEQ ID NO:104;
- CDRH3 có trình tự SEQ ID NO:105;
- CDRL1 có trình tự SEQ ID NO:187;
- CDRL2 có trình tự SEQ ID NO:188;
- CDRL3 có trình tự SEQ ID NO:189.

30. Tế bào lai hoặc tế bào nhân tạo theo điểm 11, trong đó vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa hoặc có trình tự SEQ ID NO:53 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa hoặc có trình tự SEQ ID NO:54.

31. Dòng tế bào sản sinh ra kháng thể đơn dòng hoặc mảnh kháng thể theo điểm 15, trong đó kháng thể hoặc mảnh kháng thể này chứa:

- CDRH1 có trình tự SEQ ID NO:103;
- CDRH2 có trình tự SEQ ID NO:104;
- CDRH3 có trình tự SEQ ID NO:105;
- CDRL1 có trình tự SEQ ID NO:187;
- CDRL2 có trình tự SEQ ID NO:188;
- CDRL3 có trình tự SEQ ID NO:189.

32. Phương pháp theo điểm 16, trong đó kháng thể hoặc mảnh kháng thể này chứa:

- CDRH1 có trình tự SEQ ID NO:103;
- CDRH2 có trình tự SEQ ID NO:104;
- CDRH3 có trình tự SEQ ID NO:105;
- CDRL1 có trình tự SEQ ID NO:187;
- CDRL2 có trình tự SEQ ID NO:188;
- CDRL3 có trình tự SEQ ID NO:189.

33. Bộ kit theo điểm 17, trong đó kháng thể hoặc mảnh kháng thể này chứa:

- CDRH1 có trình tự SEQ ID NO:103;
- CDRH2 có trình tự SEQ ID NO:104;
- CDRH3 có trình tự SEQ ID NO:105;
- CDRL1 có trình tự SEQ ID NO:187;
- CDRL2 có trình tự SEQ ID NO:188;
- CDRL3 có trình tự SEQ ID NO:189.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Vanderbilt University

<120> KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG TÁI TỔ HỢP HOẶC MẢNH KHÁNG THỂ, DƯỢC PHẨM VÀ BỘ KIT CHỨA KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG TÁI TỔ HỢP HOẶC MẢNH KHÁNG THỂ NÀY

<130> VBLT.P0246WO

<150> US 62/147,354
<151> 2015-04-14

<160> 276

<170> Bằng sáng chế trong phiên bản 3.5

<210> 1
<211> 423
<212> PRT
<213> Virus chikungunya
<400> 1

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 Gly Thr Asp Asp Ser His Asp Trp
50 55 60

Thr Lys Leu Arg Tyr Met Asp Asn His Ile Pro Ala Asp Ala Gly 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 Asn
145                 150                 155                 160

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

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

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

Gly Leu Ile 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 Met 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 Ser Met Gly Glu Glu Pro
    290                 295                 300

Asn Tyr Gln Glu Glu Trp Val Thr 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 Ala 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 Ser Phe Ile Leu Leu Ser Met Val Gly Met
370 375 380

Ala Val 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> 2
<211> 378
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotide tổng hợp

<400> 2
caggtgcagc tggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60

tcctgcaagg cctctggtta cagctttacc agctacggta tcagctgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcagcactt acaaaggtta cacacagtat 180

gcacagaact tccagggcag agtcaccatc accacagaca cacccgcgac tacagtctat 240

atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgcgc gagagttctt 300

tccgagactg gttatttcta ctactactac tacggtatgg acgtctgggg ccaagggacc 360

ctggtcaccg tctcctca 378

<210> 3
<211> 334
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotide tổng hợp

<400> 3
caggctgtgg tgactcagcc gccctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60

tcctgtactg ggagcagctc caacatcggg gcagattata atgtacactg gtaccagctg 120

cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatggtaaca ccaatcggcc ctcaggggtc 180

cctgaccgat tctctggctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240

caggctgagg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagtgcttcg 300

gtattcggcg gagggaccaa actgaccgtc ctag 334

<210> 4
<211> 312
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotide tổng hợp

<400> 4
gcctcagtga aggtctcctg caaggcttct ggatacagtt tcactagcta ttctatcaac 60

tgggtgcgac aggcccctgg acaagggcct gagtggatgg gatggatcga caccaacact 120

gggaacccaa cctatgccca ggacttcgca ggacggtttg tcttctcctt ggacacctct 180

gtcaccacgg catatctgca gatcagcagc ctaaaggctg gggacactgc cgtttattac 240

tgtgcaacat attatgttga cctttggggg agttatcgcc aagactacta cggtatggac 300

gtctggggcc ac 312

<210> 5
<211> 333
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotide tổng hợp

<400> 5
cagtctgtgc tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc 60

tcttgttctg gagggagctc caacatcggg agtaatcctg taaattggta ccagatggtc 120

ccaggaacgg cccccaaact cctcctctat actaataatc agcggccctc aggggtccct 180

gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tcagcctccc tggccatcaa tggactccag 240

tctgaggatg aggctgatta ttactgtgca gtatgggatg acagcctgag tggccgttgg 300

gtgttcggcg gagggaccaa ggtgaccgtc cta 333

<210> 6
<211> 411
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotide tổng hợp

<400> 6
caggtgcagc tggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgagggtc 60

tcctgcaagg cgtctggtta cacctttacc agttatggta tcagctgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcagcactt acaatggtga cacaaactat 180

gcacagaagt tccagggcag agtcaccttg acaacagaga catccacgag cacagcctac 240

atggagctga ggcgcctgag atctgacgac acggccgttt actactgtgc gagagatttt 300

gaatttcccg gagattgtag tggtggcagc tgctactcca ggttcatcta ccagcacaac 360

gacatggacg tctggggcca cgggaccctg gtcaccgtct cctcagcaag c 411

<210> 7
<211> 330
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotide tổng hợp

<400> 7
caggctgtgg tgactcagcc gccctcagtg tctgcggccc caggacagaa ggtcaccatc 60

tcctgctctg gaagcagctc caacattggg aatcattatg tatcctggta ccagcacctc 120

ccgggaacag cccccaaact cctcatttat gacaattata agcgaccctc agtgattcct 180

gaccgattct ctgcctccaa gtctggcgcg tcagccaccc tgggcatcat cggactccag 240

actggggacg aggccgatta ttactgcgga acatgggata gcagcctgag tgctgtggta 300

ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330

<210> 8
<211> 381
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotide tổng hợp

<400> 8
caggtgcagc tggtgcagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggacac cctgtccctc 60

acctgcagtg tctcaagtga cgccctccgc agcaggagtt attactgggg ctgggtccgc 120

cagccccccg ggaagggatt ggagtggatt gggactgtct cttatagtgg gggcacctac 180

tacaacccgt ccctccagag tcgagtcacc gtgtcggtgg acacgtccaa gaaccacttc 240

tccctgaggt tgaactctgt gaccgccgca gacgcggctg tttattactg tgcgagatct 300

tatttctatg atggcagtgg ttactactac ctgagctact ttgactcctg gggccaggga 360

accctggtca ccgtctcctc a 381

<210> 9
<211> 327
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotide tổng hợp

<400> 9
caggctgtgg tgactcagga gccctcactg actgtgtccc caggagggac agtcactctc 60

acctgtgctt ccagcactgg agcagtcacc agtggtcact atccaaactg gttccagcag 120

aaacctggac aaccacccag ggccctgatt tatagcacag acaacaagca ctcctggacc 180

cctgcccggt tctcaggctc cctcctaggg gtcaaggctg ccctgacact gtcagatgta 240

cagcctgagg acgaggctga ctattactgc ctgctccatt ttggtggtgt cgtggtcttc 300

ggcggaggga ccaagctgac cgtccta 327

<210> 10
<211> 348
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotide tổng hợp

<400> 10
caggtgcagc tggtgcagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag tgtctggatt caccttcagt aactatgcca tgcactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg ggctggactg ggtggcagtt atatggtatg atggaagtaa taaatactat 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaagtga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gaggggtgac 300

tacgttcttg actactgggg ccagggaacc ctggtcaccg tctcctca 348

<210> 11
<211> 324
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotide tổng hợp

<400> 11
gacattgtga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcagttgcc gggccagtca gagcattccc agctatttaa attggtatca acagaaacca 120

gggaaagccc ctaaggtcct gatctatgct acatccactt tggaagctgg ggtcccatca 180

cggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcaccag tctgcaacct 240

gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacaata cggggatatt cactttcggc 300

cctgggacca aagtggatat caaa 324

<210> 12
<211> 378
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotide tổng hợp

<400> 12
caggtgcagc tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60

tcctgcaagg cttctggagg cacttccagc acttatgcta tcagctgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggc agcatccctg tctttgctac agtaaactac 180

gcacagaagt tccagggcag actcacgatt accgcggacg aatccacgag cacagtttac 240

atggaactga gcagcctgag atctgaggac acggccgttt atttctgtgc gagcccctat 300

tgtagtagta tgaactgcta tacgaccttt tactactttg acttctgggg ccagggaacc 360

ctggtcaccg tctcctca 378

<210> 13
<211> 327
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotide tổng hợp

<400> 13
caggctgtgg tgactcagcc tgcctccgtg tttgggtttc ctggacagtc gatcaccatc 60

tcctgcactg gaaccagcag tgactttggt acttataact atgtctcttg gtaccagcaa 120

cacccaggcc aagcccccaa actcatgatt tttgatgtca gtaatcggcc ctcaggggtt 180

tctaatcgct tctctggctc caagtctggc aacacggcct ccctgaccat ctctgggctc 240

caggctgagg acgaggcttc ttattactgc agctcctata caagcggcag cactctctac 300

ggcggaggga ccaagctgac cgtcctg 327

<210> 14
<211> 381
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotide tổng hợp

<400> 14
caggtgcagc tggtgcagtc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60

tcctgcaagg cttctggata cagtttcact agctattcta tcaactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcctgagtg gatgggatgg atcgacacca acactgggaa cccaacctat 180

gcccaggact tcgcaggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcac cacggcatat 240

ctgcagatca gcagcctaaa ggctggggac actgccgttt attactgtgc aacatattat 300

gttgaccttt gggggagtta tcgccaagac tactacggta tggacgtctg gggccacggg 360

accctggtca ccgtctcctc a 381

<210> 15
<211> 333
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotide tổng hợp

<400> 15
cagtctgtgg tgactcagcc accctcagtg tctgggaccc ccgggcaggg ggtcaccatc 60

tcttgttctg gagggagctc caacatcggg agtaatcctg taaattggta ccagatggtc 120

ccaggaacgg cccccaaact cctcctctat actaataatc agcggccctc aggggtccct 180

gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tcagcctccc tggccatcaa tggactccag 240

tctgaggatg aggctgatta ttactgtgca gtatgggatg acagcctgag tggccgttgg 300

gtgttcggcg gagggaccaa gctgaccgtc cta 333

<210> 16
<211> 369
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotide tổng hợp

<400> 16
caggtgcagc tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60

tcctgcaagg tttccggata catcctcagt aaattatccg tgcactgggt gcgacaggct 120

cctggaaaag gacttgaatg gatgggaggt tctgaacgtg aagatggcga aacagtctac 180

gcacagaagt tccagggcag aatcagcttg accgaggaca catctataga gacagcctac 240

atggagctga gcagcctgag ttctgaggac acggccgtgt attattgtgc aacaggaggc 300

ttctggagta tgattggggg aaatggagtg gactactggg gccagggaac cctggtcacc 360

gtctcctca 369

<210> 17
<211> 321
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotide tổng hợp

<400> 17
caggctgtgg tgactcagtc tccatcgtcc ctgcctgcat ctgtaggaga cagggtcacc 60

atcacttgcc gggcaagtca ggacattaga aataatttag gctggtatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctgagcgcct gatctatgga acctccaatt tgcagagtgg ggtcccgtca 180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240

gaagattttg caacttatta ctgtctacag cataatagtt accctcccac gttcggccgc 300

gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 18
<211> 380
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotide tổng hợp

<400> 18
caggtgcagc tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgagagtt 60

tcctgcaagg catctgggta caccttcacc agttacttta tgcactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag gacttgagtg gatggcgata acttatcctg gtggtggtag cccatcctac 180

gcaccgcagt tccagggcag actcaccatg accgacgaca cgtccgcgac cacagtctac 240

atggacctga gtgacctgac ttctaaagac acggccgtgt attactgtgc gagaggtgcc 300

caccgttcca ttgggacgac ccccccttgac tcgtggggcc agggaaccct ggtcaccgtc 360

tcctcagcaa gcttcaaggg 380

<210> 19
<211> 375
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotide tổng hợp

<400> 19
caggtgcagc tggtgcagtc tgggggacgc gtggtccagg ctgggaggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt atgtatggcg tccactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggaatg atggatctaa agaatactat 180

ggagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaggaa cacgttgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agtcgacgac acggcagtgt atttttgtgc gagagatgga 300

attcctgacc ctgaacgcgg tgactacggg ggcttggact actggggcca gggaaccctg 360

gtcaccgtct cctca 375

<210> 20
<211> 322
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotide tổng hợp

<400> 20
cagactgtgg tgactcagtt tccatcctcc ccgtttgcat ctgtaggaga cggagtcacc 60

atcacttgcc gggcaaggca gagcattagc agttatgtta attggtatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaagctcct gatttacgct acatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagtg gcagtggata tgggacagat ttcactctca ccatcagcgg tctgcaacct 240

gaagattttg caacatacta ctgtcaacag agttacagtt ttcctcgaac gttcggccaa 300

gggaccaagg tggaaatcaa ac 322

<210> 21
<211> 381
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotide tổng hợp

<400> 21
caggtgcagc tggtgcagtc tggggctcag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60

tcctgcaagc cctctggagg caccttcaac aacaatggga tcagttgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggc atcgtcccga actttggaac cccaacctat 180

ggacaagact tccagggcag agtcacgatc accgcggacg aatctacgag cacagtcttc 240

ttggagctga ccagactgag atctgacgac acggccgttt atttctgtgc gcgaggtcgc 300

acggcggtga ctccgatgca attgggttta cagttctact ttgacttctg gggccgggga 360

accctggtca ccgtctcctc a 381

<210> 22
<211> 325
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotide tổng hợp

<400> 22
cagactgtgg tgactcagga gccctcactg actgtgtccc caggagggac agtcactctc 60

acctgttctg ccaacagtgg agcagtcacc agtgattact atccaaactg gttccagcag 120

aaacctggac aagcacccag ggcactgatt tatagtgcaa gcaacaaatt ctcctggacg 180

cctgcccggt tctcaggctc cctccttggg ggcaaagctg ccctgacact gtcaggtgcg 240

cagcctgagg acgaggctga gtattactgc ctggtctact ctggtgatgg tgtggttttc 300

ggcggaggga ccaagctgac cgtcc 325

<210> 23
<211> 357
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotide tổng hợp

<400> 23
caggtgcagc tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ccggggcctc agtgaaggtc 60

tcctgcaaga cttctggata tacgttcacc gacaactctg tacactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggtttgagtg gatgggacgg atcaacccta acactggtgt ctcaacttct 180

gcccagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacaacctac 240

atggagctga gcagtttgag atctgacgac acggccgtct attactgtgc gagagaggag 300

aacgatagta gtgggtatta cctttggggt cagggaaccc tggtcaccgt ctcctca 357

<210> 24
<211> 321
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotide tổng hợp

<400> 24
cagattgtgg tgactcagtc tccatcctcc ctgtttgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc acctatttaa attggtatca gcaaaaacca 120

gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tggagagtgg ggtcccatca 180

aggttcggtg gcagtagatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagga ccccgtggac gttcggccaa 300

gggaccaagg tggacatcaa a 321

<210> 25
<211> 366
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotide tổng hợp

<400> 25
caggtgcagc tggtgcagtc tggtcctacg ctggtgaaac ccacacagac cctcacgctg 60

acctgcacct tctctgggtt ctcactcagt attagtggag tgggtgtggg ctggatccgt 120

cagcccccag gaaaggccct ggagtggctt gcactcattt attgggatga tgataagcgc 180

tacagcccat ctctgaagag caggctcacc atcaccaagg acacctccga aaaccaggtg 240

gtccttacaa tgaccaacat ggaccctgtg gacacagcca catattactg tgcacacagt 300

atgactaaag gcggggctat ctatggtcag gcctactttg aatactgggg ccagggaacc 360

ctggtc 366

<210> 26
<211> 276
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotide tổng hợp

<400> 26
ccatctcctg cactggaacc agacagtgac gttggtggtt ataactatgt ctcctggtac 60

caacaacacc caggcaaagc ccccaaactc atcatttatg atgtcactga tcggccctca 120

ggggtttcta atcgcttctc tgcctccaag tctgccaaca cggcctccct gaccatctct 180

gggctccagg ctgaggacga ggctgattat tactgcagct catatacaag cagcagcact 240

ctggttttcg gcggagggac caagctgacc gtccta 276

<210> 27
<211> 363
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotide tổng hợp

<400> 27
caggtccagc tggtacagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60

tcctgcaagg tttccggata caccctcact gaattatcca tgcactgggt gcgacaggct 120

cctggaaaag gcctagagtg gatgggaggt tttgagcctg aagatggtga aacaatctac 180

gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctagaga cacagcctac 240

atggagctga gtagcctgag atctgaggac acggccgtct attactgtac aacagatcag 300

gtctactatc gttcggggag ttattctgga tatgttgact actggggcca gggaaccctg 360

gtc 363

<210> 28
<211> 363
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotide tổng hợp

<400> 28
caggtccagc tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc agtgaaggtc 60

tcctgcaagg cttctggacg caccttcagc agctatgtta tcagctgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcatccctc tgtttggtac agcaaactac 180

gcacagaaat tccagggcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag cacagcctac 240

atggagctga gcagcctgag atctgacgac acggccgtct attactgtgc gaggggcgcc 300

cagctatatt acaatgatgg tagtggttac atttttgact actggggcca gggagccctg 360

gtc 363

<210> 29
<211> 390
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotide tổng hợp

<400> 29
caggtgcagc tggtgcagtc tgggcctgag gtgaagaagc ctgggacctc agtgaaggtc 60

tcctgcaagg cttctggatt cagctttatt agctctgctg tgcagtgggt gcgacaggct 120

cgtggacaac gccttgagtg gataggatgg atcgtcgttg ccagtgctaa cacaaactac 180

gcacagaagt tccgggaaag agtcaccatt actagggaca tgtccacaaa cacagcctat 240

atggaactga ccagcctgag atccgaggac acggccgttt attactgtgc ggcagagcac 300

cggtcccctt gtagtggtgg tgatagctgc tacagtctct actacggtat ggacgtctgg 360

ggccaaggga ccctggtcac cgtctcctca 390

<210> 30
<211> 354
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotide tổng hợp

<400> 30
caggtgcagc tggtgcagtc tgggggaggc ttggttccgc ctgggggggtc cctgagactg 60

tcctgtacag cctctggatt caccgttagt aactatggca tgagctgggt ccgccagact 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcaact attagtacta gtagtggtag aacattctac 180

gcagactccg tggagggccg gttcaccatc tccggagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agtcgaagac acggccgtat attactgtgc gaaaggcccg 300

ttcgggggcg actttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca 354

<210> 31
<211> 321
<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotide tổng hợp

<400> 31
caggctgtgg tgactcagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtca gagtgttgcc atctacttag cctggtatca acagaaacct 120

ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240

gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtggcaact ggcagtacac ttttggccag 300

gggaccaaac tggagatcaa a 321

<210> 32
<211> 369
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotide tổng hợp

<400> 32
caggtgcagc tggtgcagtc tgggggaggc ctggtacagc ctggcaggtc cctgacactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cacctttgat gtttatgcca tgcactgggt ccggcaagct 120

ccagggaagg gcttggagtg ggtcgcaggt attagttgga atagtggtag cgtaggctat 180

gcggactcta tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240

ctgcaaatta acagtctgag agctgaggac acggccttat attactgtgc aaaagcattc 300

tggttcgggg agttatcggg ttacggtatg gacgtctggg gccaagggac cctggtcacc 360

gtctcctca 369

<210> 33
<211> 330
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotide tổng hợp

<400> 33
caggctgtgg tgactcagcc tccctccgcg tccgggtttc ctggacagtc agtcaccatc 60

tcctgcactg gaaccagcag tgacgttggt agttataact atgtctcctg gtaccaacag 120

cacccaggca aagcccccaa actcataatt tatgcggtca ctaggcggcc ctcaggggtc 180

cctgagcgct tctctggctc caagtctggc aacacggcct ccctgaccgt ctctgggctc 240

caggctgagg atgaggctga ttattactgc acctcatatg caggcaacaa caaggatgtc 300

ttcggaactg ggaccaaggt caccgtccta 330

<210> 34
<211> 357
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotide tổng hợp

<400> 34
caggtgcagc tggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60

tcctgcaagg cttctggtta cagctttaac atctatggta tcagctgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcagcgctt acaatggtaa cacaaactat 180

gcacagaaac tccagggcag agtcaccatg accacagaca catccacgag cacagcctac 240

atggaactga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagaccactt 300

tgggggggaat tttactatga tatctggggc caagggaccc tggtcaccgt ctcctca 357

<210> 35
<211> 324
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotide tổng hợp

<400> 35
caggctgtgg tgactcagtc tccaggcacc ctgtccttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcttgca gggccagtca gagtgttagc agcgggtact cagcctggta ccagcagaaa 120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca aaagggccgc tggcatccca 180

gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag ctgtttgcta cctcacctcc gcccttcggc 300

caagggacac gactggagat taaa 324

<210> 36
<211> 399
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotide tổng hợp

<400> 36
caggtgcagc tggtgcagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt aattatgtta tggagtgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatatg atggaagcaa taaatactat 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgttgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtgc gagatcagag 300

tgggagtctt cctatggttc ggggaattat tatacagatt acttctacta ctacgctatg 360

gacgtctggg gcccagggac cctggtcacc gtctcctca 399

<210> 37
<211> 336
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotide tổng hợp

<400> 37
caggctgtgg tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc 60

atctcctgca ggtctaatca gagcctcctg cgtggtatta gatacaacta tttggattgg 120

tacctgcaga aaccagggca gtctccacag ctcctgatct atttgggttc taatcgggcc 180

tccggggtcc ctgacaggtt cagtggcagt ggatcagcca cagattttac actgaaaatc 240

agcagagtgg aggctgagga tgttggggtt tattactgca tgcaagctct acaaactcct 300

accaccttcg gccaagggac acgactggag attaaa 336

<210> 38
<211> 387
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotide tổng hợp

<400> 38
caggtgcagc tggaggagtc tggtcctacg ctggtgaaac ccacacagac cctcacgctg 60

acctgttcct tctctgggtt ctcactcacc actactggag tgactgtggg ctggatccgt 120

cagcccccag gaaaggcctt ggagtggctt gcactcattt attgggatga tgataagcgc 180

tacagcccat ctctgaagag caggctcacc atcaccaagg acacctccaa aaaccaggtg 240

gtccttacca tgaccaacat ggaccctgtg gacactgcca catattactg tgcgcactcc 300

accggctact atgatagtag tggctatcga ggggcccttg atgcttttgc tgtctggggc 360

caagggaccc tggtcaccgt ctcctca 387

<210> 39
<211> 339
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotide tổng hợp

<400> 39
cagattgtgg tgactcagtt tccagactcc ccggctgtgt ctttgggcga gagggccacc 60

atcaactgca agtccagcca gagtgtttta taccactcca acaataaaaa ctacttagct 120

tggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aacctgctca tttactgggc atctgcccga 180

caatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240

atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtact 300

ccgtacactt ttggccaggg gaccaagctg gagatcaaa 339

<210> 40
<211> 381
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotide tổng hợp

<400> 40
caggtgcagc tggtgcagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggacac cctgtccctc 60

acctgcagtg tctcaagtga cgccctccgc agcaggagtt attactgggg ctgggtccgc 120

cagccccccg ggaagggatt ggagtggatt gggactgtct cttatagtgg gggcacctac 180

tacaacccgt ccctccagag tcgagtcacc gtgtcggtgg acacgtccaa gaaccacttc 240

tccctgaggt tgaactctgt gaccgccgca gacgcggctg tttattactg tgcgagatct 300

tatttctatg atggcagtgg ttactactac ctgagctact ttgactcctg gggccaggga 360

accctggtca ccgtctcctc a 381

<210> 41
<211> 327
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotide tổng hợp

<400> 41
caggctgtgg tgactcagga gccctcactg actgtgtccc caggagggac agtcactctc 60

acctgtgctt ccagcactgg agcagtcacc agtggtcact atccaaactg gttccagcag 120

aaacctggac aaccacccag ggccctgatt tatagcacag acaacaagca ctcctggacc 180

cctgcccggt tctcaggctc cctcctaggg gtcaaggctg ccctgacact gtcagatgta 240

cagcctgagg acgaggctga ctattactgc ctgctccatt ttggtggtgt cgtggtcttc 300

ggcggaggga ccaagctgac cgtccta 327

<210> 42
<211> 375
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotide tổng hợp

<400> 42
caggtgcagc tggtgcagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60

tcctgttcaa cgtctggatt caccttcagg atgtatggca tgcactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggccgtt atttttaacg atggagttaa gaaatattat 180

ggagacgccg tgaagggccg attcaccgtc tccagagaca attccaggaa caccctgtat 240

ctggaaatga aaagcctgag agtcgacgac acggctgcct actactgtgc gagagacggg 300

attcctgacc ccgaacgcgg tgactacggg ggcttggact actggggcca gggaaccctg 360

gtcaccgtct cctca 375

<210> 43
<211> 322
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotide tổng hợp

<400> 43
cagactgtgg tgactcagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cacagtcacc 60

atcacttgcc gggcaagtca gagcattacc agttatttaa actggtatca gcagaaacca 120

ggaaaagccc caaagctcct catctatgct acatccagtt tgcaaagtgg gctcccctca 180

aggttcagtg gcagtggcta tgggacagaa ttcactctca ccatcagtgg tctgcaacct 240

gaagattttg caacatacta ctgtcaacag agttacagtt ttcctcgaac gttcggccaa 300

gggaccaagg tggaaatgga ta 322

<210> 44
<211> 372
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotide tổng hợp

<400> 44
caggtgcagc tggtgcagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggcaggtc cctgagactc 60

tcctgtgcaa cctctggatt catctttgat gattatgcca tgtactgggt ccggcaagct 120

ccagggaagg gcctggagtg ggtctcaggt attagttgga atagtggaaa catagcctat 180

gcggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240

ttggaaatga acagtctgag agctgaggac acggccttgt attactgtgt aaaagatctt 300

tacgggtacg atattttgac tggtaatgga tatgattact ggggccaggg aaccctggtc 360

accgtctcct ca 372

<210> 45

<211> 337
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotide tổng hợp

<400> 45
caggctgtgg tgactcagtc ttcactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc 60

atctcctgca ggtctagtca gagcctcctg caaagtaatg gatacaacta tttggattgg 120

tacctgcaga agccagggca gtctccacag ctcctgatct atttgggttc taatcgggcc 180

tccggggtcc ctgacaggtt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatc 240

agcagagtgg aggctgagga tgttggggtt tattactgca tgcaagctct acaaactcct 300

ccgacgttcg gccaagggac caaggtggaa atcaaaa 337

<210> 46
<211> 390
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotide tổng hợp

<400> 46
caggtgcagc tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60

ccctgcaagg cttctggaga caccctcagt tactacggaa tcacttgggt gcgacgggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggacag atcatccctt tctttgctac aacaatctcc 180

gcacagaagt tccagggcag actcaccatg accgcggaag aatccacgag cactggctac 240

atggagcgca cattttacat ggacttgagt agccttagac ctgaggacac ggccgtatac 300

tactgtgcgg ggggctacta tggttcgggg agttcgggcg actacggttt ggacgtctgg 360

ggccaaggga ccctggtcac cgtctcctca 390

<210> 47
<211> 336
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotide tổng hợp

<400> 47
caggctgtgg tgactcagcc gccctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60

tcctgcactg ggagcagctc caacatcggg gcaggttatg atgtaaactg gtaccagcag 120

cttccaggaa cagccccaa actcctcatc tatggtaaca acaatcggcc ctcaggggtc 180

cctgaccgat tctctggctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240

caggctgagg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagtggttcg 300

ggagtcttcg gaactgggac cgaggtcacc gtccta 336

<210> 48
<211> 384
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotide tổng hợp

<400> 48
caggtgcagc tggtgcagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctg 60

acgtgcgctg tttctggtga ctccatcggc agtagaagtt tctactgggg ctggatccgc 120

cagccccag ggaaggggct ggagtggatt ggaagtatct attataatgg gaccacctac 180

tacaagccgt ccctcaagag tcgagtcacc atatccctag acacgtccaa gaaccagttc 240

tccctgaggc tgagctctct gaccgccaca gacacgggtg tctattactg tgcgcgggcg 300

ccaacctact gtagtccttc cagctgcgca gttcactggt acttcaatct ctggggccgt 360

ggcaccctgg tcaccgtctc ctca 384

<210> 49
<211> 354
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotide tổng hợp

<400> 49
caggtgcagc tggtgcagtc tggagctgag ctgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60

tcctgcaagg cttctggtta catatttacc aaatatggta tcagttggct gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg ggtgggatgg atcagcgctt acaatgaaaa cacaaactat 180

gcagagaagt tccagggcag agtcaccttg accacagatg catccacgag cacggcctac 240

atggagctga ggaacctgag atctgacgac acggccgtat acttctgtgc gagagaagtc 300

tggttcgcgg agtatattta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca 354

<210> 50
<211> 300
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotide tổng hợp

<400> 50
caggctgtgg tgactcagga gccctcactg actgtgtccc caggagggac agtcactctc 60

acctgttctg ccaacagtgg agcagtcacc agtgattact atccaaactg gttccagcag 120

aaacctggac aagcacccag ggcactgatt tatagtgcaa gcaacaaatt ctcctggacg 180

cctgcccggt tctcaggctc cctccttggg ggcaaagctg ccctgacact gtcaggtgcg 240

cagcctgagg acgaggctga gtattactgc ctggtctact ctggtgatgg tgtggttttc 300

<210> 51
<211> 331
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotide tổng hợp

<400> 51
cagtctgtgg tgactcagcc tgcctccgtg tctgggtctc ctggacagtc gatcaccatc 60

tcctgcactg gaaccagcag tgacgttggt gcttataact atgtctcctg gtaccaacaa 120

cacccaggca aagcccccaa actcgtgatt tatgatgtcg ctaatcggcc ctcagggatt 180

tctgaccgct tctctggctc caagtctggc aacacggcct ccctgaccat ctctgggctc 240

caggctgagg acgaggctga ttattactgc ggctcatata ccagcgacgt ctcgccggtt 300

ttcagcgggg ggaccaagct gaccgtcctc a 331

<210> 52
<211> 399
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotide tổng hợp

<400> 52
caggtgcagc tggtgcagtc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaagctt 60

tcctgcaagg cttctggata caccttcaca agtcatccta tgaattgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaacacca agactgggaa cctaacttat 180

gcccagggct tcacaggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcag gacggcgtat 240

ctgcagatca gcggcctaaa ggctgaggac actgccattt attactgtgc gagagatgag 300

tatagtggct acgattcggt aggggtgttc cgtggttctt ttgacgactt ctacggtatg 360

gacgtctggg gccaagggac cctggtcacc gtctcctca 399

<210> 53
<211> 126
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 53

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Thr Asp Thr Pro Ala Thr Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Val Leu Ser Glu Thr Gly Tyr Phe Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 54
<211> 111
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 54

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

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

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

Leu Ile Tyr Gly Asn Thr Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
85 90 95

Leu Ser Ala Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 55
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Peptide tổng hợp

<400> 55

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Pro Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Thr Asn Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln Asp Phe
50 55 60

Ala Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Tyr Tyr Val Asp Leu Trp Gly Ser Tyr Arg Gln Asp Tyr Tyr
100 105 110

Gly Met Asp Val Trp Gly His
115

<210> 56
<211> 111
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 56

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

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

```
Pro Val Asn Trp Tyr Gln Met Val Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
        35                  40                  45

Leu Tyr Thr Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
    50                  55                  60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Asn Gly Leu Gln
65                  70                  75                  80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Val Trp Asp Asp Ser Leu
                85                  90                  95

Ser Gly Arg Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
            100                 105                 110
```

<210> 57
<211> 137
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 57

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

Ser Val Arg Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
            20                  25                  30

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

Gly Trp Ile Ser Thr Tyr Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Thr Glu Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Arg Asp Phe Glu Phe Pro Gly Asp Cys Ser Gly Gly Ser Cys Tyr
100 105 110

Ser Arg Phe Ile Tyr Gln His Asn Asp Met Asp Val Trp Gly His Gly
115 120 125

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
130 135

<210> 58
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 58

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

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

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

Ile Tyr Asp Asn Tyr Lys Arg Pro Ser Val Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Ala Ser Lys Ser Gly Ala Ser Ala Thr Leu Gly Ile Ile Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 59

<211> 127
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 59

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Ser Ser Asp Ala Leu Arg Ser Arg
20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

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

Leu Gln Ser Arg Val Thr Val Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn His Phe
65 70 75 80

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

Cys Ala Arg Ser Tyr Phe Tyr Asp Gly Ser Gly Tyr Tyr Tyr Leu Ser
100 105 110

Tyr Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 60
<211> 109
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 60

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Ala Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Ser Gly
20 25 30

His Tyr Pro Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Arg Ala
35 40 45

Leu Ile Tyr Ser Thr Asp Asn Lys His Ser Trp Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Val Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Asp Val
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Leu His Phe Gly Gly
85 90 95

Val Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 61
<211> 116
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 61

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Val Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Asp Tyr Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 62
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 62

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Asn Thr Gly Ile
85 90 95

Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 63
<211> 126
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 63

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Ser Ser Thr Tyr
20 25 30

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

Gly Gly Ser Ile Pro Val Phe Ala Thr Val Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Leu Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Ala Ser Pro Tyr Cys Ser Ser Met Asn Cys Tyr Thr Thr Phe Tyr Tyr
100 105 110

Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 64
<211> 109
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 64

Gln Ala Val Val Thr Gln Pro Ala Ser Val Phe Gly Phe Pro Gly Gln

1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Phe Gly Thr Tyr
20 25 30

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

Met Ile Phe Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Ser Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Gly
85 90 95

Ser Thr Leu Tyr Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 65
<211> 127
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 65

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Pro Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Thr Asn Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln Asp Phe
50 55 60

Ala Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Tyr Tyr Val Asp Leu Trp Gly Ser Tyr Arg Gln Asp Tyr Tyr
100 105 110

Gly Met Asp Val Trp Gly His Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 66
<211> 111
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 66

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

Gly Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Gly Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30

Pro Val Asn Trp Tyr Gln Met Val Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Leu Tyr Thr Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Asn Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Val Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Ser Gly Arg Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 67
<211> 123
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 67

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Ile Leu Ser Lys Leu
20 25 30

Ser Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Ser Glu Arg Glu Asp Gly Glu Thr Val Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Ile Ser Leu Thr Glu Asp Thr Ser Ile Glu Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Thr Gly Gly Phe Trp Ser Met Ile Gly Gly Asn Gly Val Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 68
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 68

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Pro
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Arg Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 69
<211> 126
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 69

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

Ser Val Arg Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
            20                  25                  30

Phe Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45

Ala Ile Thr Tyr Pro Gly Gly Gly Ser Pro Ser Tyr Ala Pro Gln Phe
    50                  55                  60
```

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

Met Asp Leu Ser Asp Leu Thr Ser Lys Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Ala His Arg Ser Ile Gly Thr Thr Pro Leu Asp Ser Trp
100 105 110

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

<210> 70
<211> 125
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 70

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Arg Val Val Gln Ala Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Met Tyr
20 25 30

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Arg Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Gly Ile Pro Asp Pro Glu Arg Gly Asp Tyr Gly Gly Leu
100 105 110

```
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125


<210>  71
<211>  107
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo

<220>
<223>  Peptide tổng hợp

<400>  71

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


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


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


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


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


Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Phe Pro Arg
                85                  90                  95


Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105


<210>  72
<211>  127
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo

<220>
<223>  Peptide tổng hợp

<400>  72
```

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Pro Ser Gly Gly Thr Phe Asn Asn Asn
            20                  25                  30

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

Gly Gly Ile Val Pro Asn Phe Gly Thr Pro Thr Tyr Gly Gln Asp Phe
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Val Phe
65                  70                  75                  80

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

Ala Arg Gly Arg Thr Ala Val Thr Pro Met Gln Leu Gly Leu Gln Phe
            100                 105                 110

Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

<210> 73
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 73

```
Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

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

Tyr Tyr Pro Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Ala
        35                  40                  45
```

Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Asn Lys Phe Ser Trp Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Leu Val Tyr Ser Gly Asp
85 90 95

Gly Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val
100 105

<210> 74
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 74

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Asn
20 25 30

Ser Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Phe Glu Trp Met
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Glu Glu Asn Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Leu Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 75
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 75

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Arg Thr Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 76
<211> 122
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 76

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ile Ser
20 25 30

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

Trp Leu Ala Leu Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Glu Asn Gln Val
65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala His Ser Met Thr Lys Gly Gly Ala Ile Tyr Gly Gln Ala Tyr
100 105 110

Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
115 120

<210> 77
<211> 80
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 77

Pro Ser Pro Ala Leu Glu Pro Asp Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr
1 5 10 15

Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Ile Ile
20 25 30

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

35 40 45

Ser Lys Ser Ala Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Ala
50 55 60

Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser Ser Thr
65 70 75 80

<210> 78
<211> 121
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 78

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Glu Leu
20 25 30

Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Phe Glu Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Thr Thr Asp Gln Val Tyr Tyr Arg Ser Gly Ser Tyr Ser Gly Tyr Val
100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
115 120

<210> 79
<211> 121
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 79

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Gly Ile Ile Pro Leu Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Ala Gln Leu Tyr Tyr Asn Asp Gly Ser Gly Tyr Ile Phe
100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ala Leu Val
115 120

<210> 80
<211> 130
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 80

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Val Lys Lys Pro Gly Thr

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ile Ser Ser
20 25 30

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

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

Arg Glu Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Met Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Ala Glu His Arg Ser Pro Cys Ser Gly Gly Asp Ser Cys Tyr Ser
100 105 110

Leu Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
115 120 125

Ser Ser
130

<210> 81
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 81

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Thr Ile Ser Thr Ser Ser Gly Arg Thr Phe Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gly Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Lys Gly Pro Phe Gly Gly Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 82
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 82

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

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

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

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Gly Asn Trp Gln Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 83
<211> 123
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 83

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

Ser Leu Thr Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Val Tyr
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Val Gly Tyr Ala Asp Ser Met
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Ala Phe Trp Phe Gly Glu Leu Ser Gly Tyr Gly Met Asp Val
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 84
<211> 110

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 84

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

Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Thr Ser Tyr Ala Gly Asn
85 90 95

Asn Lys Asp Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 105 110

<210> 85
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 85

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Asn Ile Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Pro Leu Trp Gly Glu Phe Tyr Tyr Asp Ile Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 86
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 86

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Gly
            20                  25                  30

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Lys Arg Ala Ala Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
    50                  55                  60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65                  70                  75                  80
```

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Leu Phe Ala Thr Ser Pro
85 90 95

Pro Pro Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 87
<211> 133
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 87

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

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

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Glu Trp Glu Ser Ser Tyr Gly Ser Gly Asn Tyr Tyr Thr
100 105 110

Asp Tyr Phe Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Val Trp Gly Pro Gly Thr Leu
115 120 125

Val Thr Val Ser Ser

130

<210> 88
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 88

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Asn Gln Ser Leu Leu Arg Gly
20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

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

Leu Gln Thr Pro Thr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 89
<211> 129
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 89

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Thr Thr Thr
20 25 30

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

Trp Leu Ala Leu Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala His Ser Thr Gly Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Arg Gly Ala
100 105 110

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

Ser

<210> 90
<211> 113
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 90

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr His
20 25 30

Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Pro Pro Asn Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Gln Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Ser Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 91
<211> 127
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 91

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Ser Ser Asp Ala Leu Arg Ser Arg
20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

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

Leu Gln Ser Arg Val Thr Val Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn His Phe
65 70 75 80

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

Cys Ala Arg Ser Tyr Phe Tyr Asp Gly Ser Gly Tyr Tyr Tyr Leu Ser
100 105 110

Tyr Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 92
<211> 109
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 92

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Ala Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Ser Gly
20 25 30

His Tyr Pro Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Arg Ala
35 40 45

Leu Ile Tyr Ser Thr Asp Asn Lys His Ser Trp Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Val Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Asp Val
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Leu His Phe Gly Gly
85 90 95

Val Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 93
<211> 125
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 93

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Thr Ser Gly Phe Thr Phe Arg Met Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Phe Asn Asp Gly Val Lys Lys Tyr Tyr Gly Asp Ala Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ser Arg Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Gly Ile Pro Asp Pro Glu Arg Gly Asp Tyr Gly Gly Leu
100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 94
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 94

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

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

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

Tyr Ala Thr Ser Ser Leu Gln Ser Gly Leu Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Phe Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Met Asp
100 105

<210> 95
<211> 124
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 95

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Ile Phe Asp Asp Tyr
20 25 30

Ala Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Asn Ile Ala Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

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

Val Lys Asp Leu Tyr Gly Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Asn Gly Tyr Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 96
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 96

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Gln Ser
20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

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

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

<210> 97
<211> 130

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 97

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

Ser Val Lys Val Pro Cys Lys Ala Ser Gly Asp Thr Leu Ser Tyr Tyr
20 25 30

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

Gly Gln Ile Ile Pro Phe Phe Ala Thr Thr Ile Ser Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Leu Thr Met Thr Ala Glu Glu Ser Thr Ser Thr Gly Tyr
65 70 75 80

Met Glu Arg Thr Phe Tyr Met Asp Leu Ser Ser Leu Arg Pro Glu Asp
85 90 95

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Ser
100 105 110

Gly Asp Tyr Gly Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
115 120 125

Ser Ser
130

<210> 98
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 98

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

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

Tyr Asp Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Gly Asn Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
85 90 95

Leu Ser Gly Ser Gly Val Phe Gly Thr Gly Thr Glu Val Thr Val Leu
100 105 110

<210> 99
<211> 128
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 99

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

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

Ser Phe Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

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

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Leu Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

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

Cys Ala Arg Ala Pro Thr Tyr Cys Ser Pro Ser Ser Cys Ala Val His
100 105 110

Trp Tyr Phe Asn Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 100
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 100

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Lys Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Glu Val Trp Phe Ala Glu Tyr Ile Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 101
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 101

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ala Tyr
20 25 30

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

Val Ile Tyr Asp Val Ala Asn Arg Pro Ser Gly Ile Ser Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Ser Tyr Thr Ser Asp
85 90 95

Val Ser Pro Val Phe Ser Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 102
<211> 133
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 102

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser His
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Asn Leu Thr Tyr Ala Gln Gly Phe
50 55 60

Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Arg Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Gly Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Glu Tyr Ser Gly Tyr Asp Ser Val Gly Val Phe Arg Gly
100 105 110

Ser Phe Asp Asp Phe Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu
115 120 125

Val Thr Val Ser Ser
130

<210> 103
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 103

Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Gly
1 5

<210> 104

<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 104

Ile Ser Thr Tyr Lys Gly Tyr Thr
1 5

<210> 105
<211> 19
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 105

Ala Arg Val Leu Ser Glu Thr Gly Tyr Phe Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
1 5 10 15

Met Asp Val

<210> 106
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 106

Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Ser
1 5

<210> 107
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 107

Ile Asp Thr Asn Thr Gly Asn Pro
1 5

<210> 108
<211> 20
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 108

Ala Thr Tyr Tyr Val Asp Leu Trp Gly Ser Tyr Arg Gln Asp Tyr Tyr
1 5 10 15

Gly Met Asp Val
20

<210> 109
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 109

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Gly
1 5

<210> 110
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 110

Ile Ser Thr Tyr Asn Gly Asp Thr
1 5

<210> 111

<211> 28
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 111

Ala Arg Asp Phe Glu Phe Pro Gly Asp Cys Ser Gly Gly Ser Cys Tyr
1 5 10 15

Ser Arg Phe Ile Tyr Gln His Asn Asp Met Asp Val
20 25

<210> 112
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 112

Ser Asp Ala Leu Arg Ser Arg Ser Tyr Tyr
1 5 10

<210> 113
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 113

Val Ser Tyr Ser Gly Gly Thr
1 5

<210> 114
<211> 19
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 114

Ala Arg Ser Tyr Phe Tyr Asp Gly Ser Gly Tyr Tyr Tyr Leu Ser Tyr
1 5 10 15

Phe Asp Ser

<210> 115
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 115

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Ala
1 5

<210> 116
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 116

Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys
1 5

<210> 117
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 117

Ala Arg Gly Asp Tyr Val Leu Asp Tyr
1 5

<210> 118

<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 118

Gly Gly Thr Ser Ser Thr Tyr Ala
1 5

<210> 119
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 119

Ser Ile Pro Val Phe Ala Thr Val
1 5

<210> 120
<211> 19
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 120

Ala Ser Pro Tyr Cys Ser Ser Met Asn Cys Tyr Thr Thr Phe Tyr Tyr
1 5 10 15

Phe Asp Phe

<210> 121
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 121

Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Ser
1 5

<210> 122
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 122

Ile Asp Thr Asn Thr Gly Asn Pro
1 5

<210> 123
<211> 20
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 123

Ala Thr Tyr Tyr Val Asp Leu Trp Gly Ser Tyr Arg Gln Asp Tyr Tyr
1 5 10 15

Gly Met Asp Val
20

<210> 124
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 124

Gly Tyr Ile Leu Ser Lys Leu Ser
1 5

<210> 125

<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 125

Ser Glu Arg Glu Asp Gly Glu Thr
1 5

<210> 126
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 126

Ala Thr Gly Gly Phe Trp Ser Met Ile Gly Gly Asn Gly Val Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 127
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 127

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Phe
1 5

<210> 128
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 128

Thr Tyr Pro Gly Gly Gly Ser Pro
1 5

<210> 129
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 129

Ala Arg Gly Ala His Arg Ser Ile Gly Thr Thr Pro Leu Asp Ser
1 5 10 15

<210> 130
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 130

Gly Phe Thr Phe Ser Met Tyr Gly
1 5

<210> 131
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 131

Ile Trp Asn Asp Gly Ser Lys Glu
1 5

<210> 132
<211> 18
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 132

Ala Arg Asp Gly Ile Pro Asp Pro Glu Arg Gly Asp Tyr Gly Gly Leu
1 5 10 15

Asp Tyr

<210> 133
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 133

Gly Gly Thr Phe Asn Asn Asn Gly
1 5

<210> 134
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 134

Ile Val Pro Asn Phe Gly Thr Pro
1 5

<210> 135
<211> 20
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 135

Ala Arg Gly Arg Thr Ala Val Thr Pro Met Gln Leu Gly Leu Gln Phe
1 5 10 15

Tyr Phe Asp Phe
20

<210> 136
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 136

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Asn Ser
1 5

<210> 137
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 137

Ile Asn Pro Asn Thr Gly Val Ser
1 5

<210> 138
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 138

Ala Arg Glu Glu Asn Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Leu
1 5 10

<210> 139
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 139

Gly Phe Ser Leu Ser Ile Ser Gly Val Gly
1 5 10

<210> 140
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 140

Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> 141
<211> 18
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 141

Ala His Ser Met Thr Lys Gly Gly Ala Ile Tyr Gly Gln Ala Tyr Phe
1 5 10 15

Glu Tyr

<210> 142
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 142

Gly Tyr Thr Leu Thr Glu Leu Ser
1 5

<210> 143
<211> 8

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 143

Phe Glu Pro Glu Asp Gly Glu Thr
1 5

<210> 144
<211> 18
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 144

Thr Thr Asp Gln Val Tyr Tyr Arg Ser Gly Ser Tyr Ser Gly Tyr Val
1 5 10 15

Asp Tyr

<210> 145
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 145

Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr Val
1 5

<210> 146
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 146

Ile Ile Pro Leu Phe Gly Thr Ala
1 5

<210> 147
<211> 18
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 147

Ala Arg Gly Ala Gln Leu Tyr Tyr Asn Asp Gly Ser Gly Tyr Ile Phe
1 5 10 15

Asp Tyr

<210> 148
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 148

Gly Phe Ser Phe Ile Ser Ser Ala
1 5

<210> 149
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 149

Ile Val Val Ala Ser Ala Asn Thr
1 5

<210> 150
<211> 23

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 150

Ala Ala Glu His Arg Ser Pro Cys Ser Gly Gly Asp Ser Cys Tyr Ser
1 5 10 15

Leu Tyr Tyr Gly Met Asp Val
20

<210> 151
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 151

Gly Phe Thr Val Ser Asn Tyr Gly
1 5

<210> 152
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 152

Ile Ser Thr Ser Ser Gly Arg Thr
1 5

<210> 153
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 153

Ala Lys Gly Pro Phe Gly Gly Asp Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 154
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 154

Gly Phe Thr Phe Asp Val Tyr Ala
1 5

<210> 155
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 155

Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Val
1 5

<210> 156
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 156

Ala Lys Ala Phe Trp Phe Gly Glu Leu Ser Gly Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10 15

<210> 157
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Peptide tổng hợp

<400> 157

Gly Tyr Ser Phe Asn Ile Tyr Gly
1 5

<210> 158
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 158

Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr
1 5

<210> 159
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 159

Ala Arg Pro Leu Trp Gly Glu Phe Tyr Tyr Asp Ile
1 5 10

<210> 160
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 160

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Val
1 5

<210> 161
<211> 8
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 161

Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys
1 5

<210> 162
<211> 26
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 162

Ala Arg Ser Glu Trp Glu Ser Ser Tyr Gly Ser Gly Asn Tyr Tyr Thr
1 5 10 15

Asp Tyr Phe Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Val
20 25

<210> 163
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 163

Gly Phe Ser Leu Thr Thr Thr Gly Val Thr
1 5 10

<210> 164
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 164

Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> 165
<211> 21
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 165

Ala His Ser Thr Gly Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Arg Gly Ala Leu
1 5 10 15

Asp Ala Phe Ala Val
20

<210> 166
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 166

Ser Asp Ala Leu Arg Ser Arg Ser Tyr Tyr
1 5 10

<210> 167
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 167

Val Ser Tyr Ser Gly Gly Thr
1 5

<210> 168
<211> 19
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 168

Ala Arg Ser Tyr Phe Tyr Asp Gly Ser Gly Tyr Tyr Tyr Leu Ser Tyr
1 5 10 15

Phe Asp Ser

<210> 169
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 169

Gly Phe Thr Phe Arg Met Tyr Gly
1 5

<210> 170
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 170

Ile Phe Asn Asp Gly Val Lys Lys
1 5

<210> 171
<211> 18
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 171

Ala Arg Asp Gly Ile Pro Asp Pro Glu Arg Gly Asp Tyr Gly Gly Leu
1 5 10 15

Asp Tyr

<210> 172
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 172

Gly Phe Ile Phe Asp Asp Tyr Ala
1 5

<210> 173
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 173

Ile Ser Trp Asn Ser Gly Asn Ile
1 5

<210> 174
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 174

Val Lys Asp Leu Tyr Gly Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Asn Gly Tyr Asp
1 5 10 15

Tyr

<210> 175
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 175

Gly Asp Thr Leu Ser Tyr Tyr Gly
1 5

<210> 176
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 176

Ile Ile Pro Phe Phe Ala Thr Thr
1 5

<210> 177
<211> 23
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 177

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Ser
1 5 10 15

Gly Asp Tyr Gly Leu Asp Val
20

<210> 178
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Peptide tổng hợp

<400> 178

Gly Asp Ser Ile Gly Ser Arg Ser Phe Tyr
1 5 10

<210> 179
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 179

Ile Tyr Tyr Asn Gly Thr Thr
1 5

<210> 180
<211> 20
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 180

Ala Arg Ala Pro Thr Tyr Cys Ser Pro Ser Ser Cys Ala Val His Trp
1 5 10 15

Tyr Phe Asn Leu
20

<210> 181
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 181

Gly Tyr Ile Phe Thr Lys Tyr Gly
1 5

<210> 182
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 182

Ile Ser Ala Tyr Asn Glu Asn Thr
1 5

<210> 183
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 183

Ala Arg Glu Val Trp Phe Ala Glu Tyr Ile Tyr
1 5 10

<210> 184
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 184

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser His Pro
1 5

<210> 185
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 185

Ile Asn Thr Lys Thr Gly Asn Leu
1 5

<210> 186
<211> 26
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 186

Ala Arg Asp Glu Tyr Ser Gly Tyr Asp Ser Val Gly Val Phe Arg Gly
1 5 10 15

Ser Phe Asp Asp Phe Tyr Gly Met Asp Val
20 25

<210> 187
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 187

Ser Ser Asn Ile Gly Ala Asp Tyr Asn
1 5

<210> 188
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 188

Gly Asn Thr
1

<210> 189
<211> 11
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 189

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10

<210> 190
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 190

Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Pro
1 5

<210> 191
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 191

Thr Asn Asn
1

<210> 192
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 192

Ala Val Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Arg Trp Val
1 5 10

<210> 193
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 193

Ser Ser Asn Ile Gly Asn His Tyr
1 5

<210> 194
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 194

Asp Asn Tyr
1

<210> 195
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 195

Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu Ser Ala Val Val
1 5 10

<210> 196
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 196

Thr Gly Ala Val Thr Ser Gly His Tyr

1 5

<210> 197
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 197

Ser Thr Asp
1

<210> 198
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 198

Leu Leu His Phe Gly Gly Val Val Val
1 5

<210> 199
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 199

Gln Ser Ile Pro Ser Tyr
1 5

<210> 200
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 200

Ala Thr Ser
1

<210> 201
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 201

Gln Gln Ser Tyr Asn Thr Gly Ile Phe Thr
1 5 10

<210> 202
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 202

Ser Ser Asp Phe Gly Thr Tyr Asn Tyr
1 5

<210> 203
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 203

Asp Val Ser
1

<210> 204
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 204

Ser Ser Tyr Thr Ser Gly Ser Thr Leu Tyr Gly Gly Gly
1 5 10

<210> 205
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 205

Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Pro
1 5

<210> 206
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 206

Thr Asn Asn
1

<210> 207
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 207

Ala Val Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Arg Trp Val
1 5 10

<210> 208
<211> 6

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 208

Gln Asp Ile Arg Asn Asn
1 5

<210> 209
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 209

Gly Thr Ser
1

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

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 210

Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Pro Thr
1 5

<210> 211
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 211

Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
1 5

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

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 212

Ala Thr Ser
1

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

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 213

Gln Gln Ser Tyr Ser Phe Pro Arg Thr
1 5

<210> 214
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 214

Ser Gly Ala Val Thr Ser Asp Tyr Tyr
1 5

<210> 215
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 215

Ser Ala Ser
1

<210> 216
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 216

Leu Val Tyr Ser Gly Asp Gly Val Val
1 5

<210> 217
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 217

Gln Ser Ile Ser Thr Tyr
1 5

<210> 218
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 218

Ala Ala Ser
1

<210> 219
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 219

Gln Gln Ser Tyr Arg Thr Pro Trp Thr
1 5

<210> 220
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 220

Asp Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr
1 5

<210> 221
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 221

Asp Val Thr
1

<210> 222
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 222

Ser Ser Tyr Thr Ser Ser Ser Thr Leu Val
1 5 10

<210> 223
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 223

Gln Ser Val Ala Ile Tyr
1 5

<210> 224
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 224

Asp Ala Ser
1

<210> 225
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 225

Gln Gln Arg Gly Asn Trp Gln Tyr Thr
1 5

<210> 226
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 226

Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr Asn Tyr
1 5

<210> 227

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

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 227

Ala Val Thr
1

<210> 228
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 228

Thr Ser Tyr Ala Gly Asn Asn Lys Asp Val
1 5 10

<210> 229
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 229

Gln Ser Val Ser Ser Gly Tyr
1 5

<210> 230
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 230

Gly Ala Ser
1

<210> 231
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 231

Gln Leu Phe Ala Thr Ser Pro Pro Pro
1 5

<210> 232
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 232

Gln Ser Leu Leu Arg Gly Ile Arg Tyr Asn Tyr
1 5 10

<210> 233
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 233

Leu Gly Ser
1

<210> 234
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 234

Met Gln Ala Leu Gln Thr Pro Thr Thr
1 5

<210> 235
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 235

Gln Ser Val Leu Tyr His Ser Asn Asn Lys Asn Tyr
1 5 10

<210> 236
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 236

Trp Ala Ser
1

<210> 237
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 237

Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 238
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Peptide tổng hợp

<400> 238

Thr Gly Ala Val Thr Ser Gly His Tyr
1 5

<210> 239
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 239

Ser Thr Asp
1

<210> 240
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 240

Leu Leu His Phe Gly Gly Val Val Val
1 5

<210> 241
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 241

Gln Ser Ile Thr Ser Tyr
1 5

<210> 242
<211> 3
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 242

Ala Thr Ser
1

<210> 243
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 243

Gln Gln Ser Tyr Ser Phe Pro Arg Thr
1 5

<210> 244
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 244

Gln Ser Leu Leu Gln Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr
1 5 10

<210> 245
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 245

Leu Gly Ser
1

<210> 246
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 246

Met Gln Ala Leu Gln Thr Pro Pro Thr
1 5

<210> 247
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 247

Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp
1 5

<210> 248
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 248

Gly Asn Asn
1

<210> 249
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 249

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Gly Val

1 5 10

<210> 250
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 250

Ser Ser Asp Val Gly Ala Tyr Asn Tyr
1 5

<210> 251
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 251

Asp Val Ala
1

<210> 252
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptide tổng hợp

<400> 252

Gly Ser Tyr Thr Ser Asp Val Ser Pro Val
1 5 10

<210> 253
<211> 1317
<212> ADN
<213> Virus chikungunya
<400> 253
tacgaacacg taacagtgat cccgaacacg gtgggagtac cgtataagac tctagtcaac 60

agaccgggct acagccccat ggtactggag atggagctac tgtcagtcac tttggagcca 120

acgctatcgc ttgattacat cacgtgcgaa tacaaaaccg tcatcccgtc tccgtacgtg 180

aaatgctgcg gtacagcaga gtgcaaggac aaaaacctac ctgactacag ctgtaaggtc 240

ttcaccggcg tctacccatt tatgtggggc ggcgcctact gcttctgcga cgctgaaaac 300

acgcaattga gcgaagcaca tgtggagaag tccgaatcat gcaaaacaga atttgcatca 360

gcatacaggg ctcataccgc atccgcatca gctaagctcc gcgtccttta ccaaggaaat 420

aacatcactg taactgccta tgcaaacggc gaccatgccg tcacagttaa ggacgccaaa 480

ttcattgtgg ggccaatgtc ttcagcctgg acacctttg acaacaaaat cgtggtgtac 540

aaaggtgacg tttacaacat ggactacccg ccctttggcg caggaagacc aggacaattt 600

ggcgatatcc aaagtcgcac gcctgagagc aaagacgtct atgctaacac acaactggta 660

ctgcagagac cggctgcggg tacggtacac gtgccatact ctcaggcacc atctggcttt 720

aagtattggt taaaagaacg aggggcgtcg ctacagcaca cagcaccatt tggctgccaa 780

atagcaacaa acccggtaag agcgatgaac tgcgccgtag ggaacatgcc catctccatc 840

gacataccgg atgcggcctt cactagggtc gtcgacgcgc cctctttaac ggacatgtca 900

tgcgaggtac cagcctgcac ccattcctca gactttgggg gcgtcgccat tattaaatat 960

gcagtcagca agaaaggcaa gtgtgcggtg cattcgatga ccaacgccgt cactatccgg 1020

gaagctgaga tagaagttga agggaattct cagctgcaaa tctctttctc gacggccttg 1080

gccagcgccg aattccgcgt acaagtctgt tctacacaag tacactgtgc agccgagtgc 1140

caccctccga aggaccacat agtcaactac ccggcgtcac ataccaccct cggggtccag 1200

gacatttccg ctacggcgat gtcatgggtg cagaagatca cgggaggtgt gggactggtt 1260

gtcgctgttg cagcactgat tctaatcgtg gtgctatgcg tgtcgttcag caggcac 1317

<210> 254
<211> 1317
<212> ADN
<213> Virus chikungunya
<400> 254
tacgaacacg taacagtgat cccgaacacg gtgggagtac cgtataagac tctagtcaat 60

agacctggct acagccccat ggtattggag atggaactac tgtcagtcac tttggagcca 120

acactatcgc ttgattacat cacgtgcgag tacaaaaccg tcatcccgtc tccgtacgtg 180

aagtgctgcg gtacagcaga gtgcaaggac aaaaacctac ctgactacag ctgtaaggtc 240

ttcaccggcg tctacccatt tatgtggggc ggcgcctact gcttctgcga cgctgaaaac 300

acgcagttga gcgaagcaca tgtggagaag tccgaatcat gcaaaacaga atttgcatca 360

gcatacaggg ctcataccgc atctgcatca gctaagctcc gcgtccttta ccaaggaaat 420

aacatcactg taactgccta tgcaaacggc gaccatgccg tcacagttaa ggacgccaaa 480

ttcattgtgg ggccaatgtc ttcagcctgg acacctttcg acaacaaaat tgtggtgtac 540

aaaggtgacg tctataacat ggactacccg ccctttggcg caggaagacc aggacaattt 600

ggcgatatcc aaagtcgcac acctgagagt aaagacgtct atgctaatac acaactggta 660

ctgcagagac cggctgcggg tacggtacac gtgccatact ctcaggcacc atctggcttt 720

aagtattggc taaaagaacg cggggcgtca ctgcagcaca cagcaccatt tggctgccaa 780

atagcaacaa acccggtaag agcggtgaac tgcgccgtag ggaacatgcc catctccatc 840

gacataccgg aagcggcctt cactagggtc gtcgacgcgc cctctttaac ggacatgtcg 900

tgcgaggtac tagcctgcac ccattcctca gactttgggg gcgtcgccat tattaaatat 960

gcagccagca agaaaggcaa gtgtgcggtg cattcgatga ctaacgccgt cactattcgg 1020

gaagctgaga tagaagttga agggaattct cagctgcaaa tctctttctc gacggcctta 1080

gccagcgccg aattccgcgt acaagtctgt tctacacaag tacactgtgc agctgagtgc 1140

caccccccga aggaccacat agtcaactac ccggcgtcac ataccaccct cggggtccag 1200

gacatctccg ctacggcgat gtcatgggtg cagaagatca cgggaggtgt gggactggtt 1260

gttgctgttg ccgcactgat tctaatcgtg gtgctatgcg tgtcgttcag caggcac 1317

<210> 255
<211> 1317
<212> ADN
<213> Virus chikungunya
<400> 255
tacgaacacg taacagtgat cccgaacacg gtgggagtac cgtataagac tctagtcaat 60

agacctggct acagccccat ggtattggag atggaactac tgtcagtcac tttggagcca 120

acactatcgc ttgattacat cacgtgcgag tacaaaaccg tcatcccgtc tccgtacgtg 180

aagtgctgcg gtacagcaga gtgcaaggac aaaaacctac ctgactacag ctgtaaggtc 240

ttcaccggcg tctacccatt tatgtggggc ggcgcctact gcttctgcga cgctgaaaac 300

acgcagttga gcgaagcaca cgtggagaag tccgaatcat gcaaaacaga atttgcatca 360

gcatacaggg ctcataccgc atctgcatca gctaagctcc gcgtccttta ccaaggaaat 420

aacatcactg taactgccta tgcaaacggc gaccatgccg tcacagttaa ggacgccaaa 480

ttcattgtgg ggccaatgtc ttcagcctgg acacctttcg acaacaaaat tgtggtgtac 540

aaaggtgacg tctataacat ggactacccg ccctttggcg caggaagacc aggacaattt 600

ggcgatatcc aaagtcgcac acctgagagt aaagacgtct atgctaatac acaactggta 660

ctgcagagac cggctgtggg tacggtacac gtgccatact ctcaggcacc atctggcttt 720

aagtattggc taaaagaacg cggggcgtcg ctgcagcaca cagcaccatt tggctgccaa 780

atagcaacaa acccggtaag agcggtgaac tgcgccgtag ggaacatgcc catctccatc 840

gacataccgg aagcggcctt cactagggtc gtcgacgcgc cctctttaac ggacatgtcg 900

tgcgaggtac cagcctgcac ccattcctca gactttgggg gcgtcgccat tattaaatat 960

gcagccagca agaaaggcaa gtgtgcggtg cattcgatga ctaacgccgt cactattcgg 1020

gaagctgaga tagaagttga agggaattct cagctgcaaa tctctttctc gacggcctta 1080

gccagcgccg aattccgcgt acaagtctgt tctacacaag tacactgtgc agccgagtgc 1140

cacccccga aggaccacat agtcaactac ccggcgtcac ataccaccct cggggtccag 1200

gacatctccg ctacggcgat gtcatgggtg cagaagatca cgggaggtgt gggactggtt 1260

gttgctgttg ccgcactgat tctaatcgtg gtgctatgcg tgtcgttcag caggcac 1317

<210> 256
<211> 1317
<212> ADN
<213> Virus chikungunya
<400> 256
tacgaacacg taacagtgat cccgaacacg gtgggagtac cgtataagac tctagtcaac 60

agaccgggct acagccccat ggtactggag atggagcttc tgtcagtcac tttggagcca 120

acgctatcgc ttgattacat cacgtgcgag tataaaaccg tcatcccgtc tccgtacgtg 180

aaatgctgcg gtacagcaga gtgcaaggac aagagcctac ctgattacag ctgtaaggtc 240

ttcaccggcg tctacccatt catgtggggc ggcgcctact gcttctgcga cactgaaaat 300

acgcaattga gcgaagcaca tgtggagaag tccgaatcat gcaaaacaga atttgcatca 360

gcatataggg ctcataccgc atccgcatca gctaagctcc gcgtccttta ccaaggaaat 420

aatgttactg tatctgctta tgcaaacggc gatcatgccg tcacagttaa ggacgctaaa 480

ttcattgtgg ggccaatgtc ttcagcctgg acacctttg acaataaaat cgtggtgtac 540

aaaggcgacg tctacaacat ggactacccg cccttcggcg caggaagacc aggacaattt 600

ggcgacatcc aaagtcgcac gcctgagagc gaagacgtct atgctaacac acaactggta 660

ctgcagagac cgtccgcggg tacggtgcac gtgccgtact ctcaggcacc atctggcttc 720

aagtattggc taaaagaacg aggggcgtcg ctgcagcaca cagcaccatt tggctgtcaa 780

atagcaacaa acccggtaag agcgatgaac tgcgccgtag ggaacatgcc tatctccatc 840

gacataccgg acgcggcctt cactagggtc gtcgacgcgc catctttaac ggacatgtcg 900

tgtgaggtac cagcctgcac ccactcctca gactttgggg gcgtagccat cattaaatat 960

gcagccagca agaaaggcaa gtgtgcggtg cattcgatga ctaacgccgt cactattcgg 1020

gaagctgaaa tagaagtaga agggaactct cagttgcaaa tctcttttc gacggcccta 1080

gccagcgccg aattccgcgt acaagtctgt tctacacaag tacactgtgc agccgagtgc 1140

catccaccga aagaccatat agtcaattac ccggcgtcac acaccaccct cggggtccaa 1200

gacatttccg ttacggcgat gtcatgggtg cagaagatca cgggaggtgt gggactggtt 1260

gtcgctgttg cagcactgat cctaatcgtg gtgctatgcg tgtcgtttag caggcac 1317

<210> 257
<211> 1317
<212> ADN
<213> Virus chikungunya
<400> 257
tacgaacacg taacagtgat cccgaacacg gtgggagtac cgtataagac tctagtcaac 60

agaccgggct acagccccat ggtattggag atggagcttc tgtctgtcac cttggaacca 120

acgctatcgc ttgattacat cacgtgcgag tataaaaccg ttatcccgtc tccgtacgtg 180

aaatgctgcg gtacagcaga gtgtaaggac aagagcctac ctgattacag ctgtaaggtc 240

ttcaccggcg tctacccatt catgtggggc ggcgcctact gcttctgcga caccgaaaat 300

acgcaattga gcgaagcaca tgtggagaag tccgaatcat gcaaaacaga atttgcatca 360

gcatacaggg ctcataccgc atccgcatca gctaagctcc gcgtccttta ccaaggaaat 420

aatatcactg tggctgctta tgcaaacggc gaccatgccg tcacagttaa ggacgctaaa 480

ttcatagtgg ggccaatgtc ttcagcctgg acacctttcg acaataaaat cgtggtgtac 540

aaaggcgacg tctacaacat ggactacccg cccttcggcg caggaagacc aggacaattt 600

ggcgacatcc aaagtcgcac gcctgagagc gaagacgtct atgctaatac acaactggta 660

ctgcagagac cgtccgcggg tacggtgcac gtgccgtact ctcaggcacc atctggcttc 720

aagtattggc taaaagaacg aggggcgtcg ctgcagcaca cagcaccatt tggctgtcaa 780

atagcaacaa acccggtaag agcgatgaac tgcgccgtag ggaacatgcc tatctccatc 840

gacataccgg acgcggcctt taccagggtc gtcgacgcgc catctttaac ggacatgtcg 900

tgtgaggtat cagcctgcac ccattcctca gactttgggg gcgtagccat cattaaatat 960

gcagccagta agaaaggcaa gtgtgcagtg cactcgatga ctaacgccgt cactattcgg 1020

gaagctgaaa tagaagtaga agggaactct cagttgcaaa tctctttttc gacggcccta 1080

gccagcgccg aatttcgcgt acaagtctgt tctacacaag tacactgtgc agccgagtgc 1140

catccaccga aagaccatat agtcaattac ccggcgtcac acaccaccct cggggtccaa 1200

gacatttccg ctacggcgat gtcatgggtg cagaagatca cgggaggtgt gggactggtt 1260

gtcgctgttg cagcactgat cctaatcgtg gtgctatgcg tgtcgtttag caggcac 1317

<210> 258
<211> 1317
<212> ADN
<213> Virus chikungunya
<400> 258
tacgaacacg taacagtgat cccgaacacg gtgggagtac cgtataagac tcttgtcaac 60

agaccgggtt acagccccat ggtattggag atggagctac aatcggtcac cttggaacca 120

acactgtcac ttgactacat cacgtgcgag tacaaaactg tcatcccctc cccgtacgtg 180

aagtgctgtg gtacagcaga gtgcaaggac aagagcctac cagactacag ctgcaaggtc 240

tttactggag tctacccatt tatgtggggc ggcgcctact gcttttgcga cgccgaaaat 300

acgcaattga gcgaggcaca tgtagagaaa tctgaatctt gcaaaacaga gtttgcatcg 360

gcctacagag cccacaccgc atcggcgtcg gcgaagctcc gcgtccttta ccaaggaaac 420

aacattactg tagctgccta cgctaacggc gaccatgccg tcacagtaaa ggacgccaag 480

tttgtcgtgg gaccaatgtc ctccgcctgg acacctttg acaacaaaat cgtggtgtac 540

aaaggcgacg tctacaacat ggactaccca ccttttggcg caggaagacc aggacaattt 600

ggtgacattc aaagtcgtac accggaaagt aaagacgttt atgccaacac tcagttggta 660

ctacagaggc cagcagcagg cacggtacat gtaccatact ctcaggcacc atctggcttc 720

aagtattggc tgaaggaacg aggagcatcg ctacagcaca cggcaccgtt cggttgccag 780

attgcgacaa acccggtaag agctgtaaat tgcgctgtgg ggaacatacc aatttccatc 840

gacataccgg atgcggcctt tactagggtt gtcgatgcac cctctgtaac ggacatgtca 900

tgcgaagtac cagcctgcac tcactcctcc gactttgggg gcgtcgccat catcaaatat 960

acagctagca agaaaggtaa atgtgcagta cattcgatga ccaacgccgt taccattcga 1020

gaagccgacg tagaagtaga ggggaattcc cagctgcaaa tatccttctc aacagccttg 1080

gcaagcgccg agtttcgcgt gcaagtgtgc tccacacaag tacactgcgc agccgcatgc 1140

caccctccaa aggaccacat agtcaattac ccagcatcac acaccaccct tggggtccag 1200

gatatatcca caacggcaat gtcttgggtg cagaagatta cgggaggagt aggattaatt 1260

gttgctgttg ctgccttaat tttaattgtg gtgctatgcg tgtcgtttag caggcac 1317

<210> 259
<211> 439
<212> PRT
<213> Virus chikungunya
<400> 259

Tyr Glu His Val Thr Val Ile Pro Asn Thr Val Gly Val Pro Tyr Lys
1 5 10 15

Thr Leu Val Asn Arg Pro Gly Tyr Ser Pro Met Val Leu Glu Met Glu
20 25 30

Leu Gln Ser Val Thr Leu Glu Pro Thr Leu Ser Leu Asp Tyr Ile Thr
35 40 45

Cys Glu Tyr Lys Thr Val Ile Pro Ser Pro Tyr Val Lys Cys Cys Gly
50 55 60

Thr Ala Glu Cys Lys Asp Lys Ser Leu Pro Asp Tyr Ser Cys Lys Val
65 70 75 80

```
Phe Thr Gly Val Tyr Pro Phe Met Trp Gly Gly Ala Tyr Cys Phe Cys
                85                  90                  95

Asp Ala Glu Asn Thr Gln Leu Ser Glu Ala His Val Glu Lys Ser Glu
            100                 105                 110

Ser Cys Lys Thr Glu Phe Ala Ser Ala Tyr Arg Ala His Thr Ala Ser
        115                 120                 125

Ala Ser Ala Lys Leu Arg Val Leu Tyr Gln Gly Asn Asn Ile Thr Val
    130                 135                 140

Ala Ala Tyr Ala Asn Gly Asp His Ala Val Thr Val Lys Asp Ala Lys
145                 150                 155                 160

Phe Val Val Gly Pro Met Ser Ser Ala Trp Thr Pro Phe Asp Asn Lys
                165                 170                 175

Ile Val Val Tyr Lys Gly Asp Val Tyr Asn Met Asp Tyr Pro Pro Phe
            180                 185                 190

Gly Ala Gly Arg Pro Gly Gln Phe Gly Asp Ile Gln Ser Arg Thr Pro
        195                 200                 205

Glu Ser Lys Asp Val Tyr Ala Asn Thr Gln Leu Val Leu Gln Arg Pro
    210                 215                 220

Ala Ala Gly Thr Val His Val Pro Tyr Ser Gln Ala Pro Ser Gly Phe
225                 230                 235                 240

Lys Tyr Trp Leu Lys Glu Arg Gly Ala Ser Leu Gln His Thr Ala Pro
                245                 250                 255

Phe Gly Cys Gln Ile Ala Thr Asn Pro Val Arg Ala Val Asn Cys Ala
            260                 265                 270

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

Arg Val Val Asp Ala Pro Ser Val Thr Asp Met Ser Cys Glu Val Pro
```

290 295 300

Ala Cys Thr His Ser Ser Asp Phe Gly Gly Val Ala Ile Ile Lys Tyr
305 310 315 320

Thr Ala Ser Lys Lys Gly Lys Cys Ala Val His Ser Met Thr Asn Ala
325 330 335

Val Thr Ile Arg Glu Ala Asp Val Glu Val Glu Gly Asn Ser Gln Leu
340 345 350

Gln Ile Ser Phe Ser Thr Ala Leu Ala Ser Ala Glu Phe Arg Val Gln
355 360 365

Val Cys Ser Thr Gln Val His Cys Ala Ala Ala Cys His Pro Pro Lys
370 375 380

Asp His Ile Val Asn Tyr Pro Ala Ser His Thr Thr Leu Gly Val Gln
385 390 395 400

Asp Ile Ser Thr Thr Ala Met Ser Trp Val Gln Lys Ile Thr Gly Gly
405 410 415

Val Gly Leu Ile Val Ala Val Ala Ala Leu Ile Leu Ile Val Val Leu
420 425 430

Cys Val Ser Phe Ser Arg His
435

<210> 260
<211> 439
<212> PRT
<213> Virus chikungunya
<400> 260

Tyr Glu His Val Thr Val Ile Pro Asn Thr Val Gly Val Pro Tyr Lys
1 5 10 15

Thr Leu Val Asn Arg Pro Gly Tyr Ser Pro Met Val Leu Glu Met Glu
20 25 30

```
Leu Leu Ser Val Thr Leu Glu Pro Thr Leu Ser Leu Asp Tyr Ile Thr
        35                  40                  45

Cys Glu Tyr Lys Thr Val Ile Pro Ser Pro Tyr Val Lys Cys Cys Gly
    50                  55                  60

Thr Ala Glu Cys Lys Asp Lys Asn Leu Pro Asp Tyr Ser Cys Lys Val
65                  70                  75                  80

Phe Thr Gly Val Tyr Pro Phe Met Trp Gly Gly Ala Tyr Cys Phe Cys
                85                  90                  95

Asp Ala Glu Asn Thr Gln Leu Ser Glu Ala His Val Glu Lys Ser Glu
            100                 105                 110

Ser Cys Lys Thr Glu Phe Ala Ser Ala Tyr Arg Ala His Thr Ala Ser
        115                 120                 125

Ala Ser Ala Lys Leu Arg Val Leu Tyr Gln Gly Asn Asn Ile Thr Val
    130                 135                 140

Thr Ala Tyr Ala Asn Gly Asp His Ala Val Thr Val Lys Asp Ala Lys
145                 150                 155                 160

Phe Ile Val Gly Pro Met Ser Ser Ala Trp Thr Pro Phe Asp Asn Lys
                165                 170                 175

Ile Val Val Tyr Lys Gly Asp Val Tyr Asn Met Asp Tyr Pro Pro Phe
            180                 185                 190

Gly Ala Gly Arg Pro Gly Gln Phe Gly Asp Ile Gln Ser Arg Thr Pro
        195                 200                 205

Glu Ser Lys Asp Val Tyr Ala Asn Thr Gln Leu Val Leu Gln Arg Pro
    210                 215                 220

Ala Ala Gly Thr Val His Val Pro Tyr Ser Gln Ala Pro Ser Gly Phe
225                 230                 235                 240

Lys Tyr Trp Leu Lys Glu Arg Gly Ala Ser Leu Gln His Thr Ala Pro
```

245 250 255

Phe Gly Cys Gln Ile Ala Thr Asn Pro Val Arg Ala Met Asn Cys Ala
260 265 270

Val Gly Asn Met Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Asp Ala Ala Phe Thr
275 280 285

Arg Val Val Asp Ala Pro Ser Leu Thr Asp Met Ser Cys Glu Val Pro
290 295 300

Ala Cys Thr His Ser Ser Asp Phe Gly Gly Val Ala Ile Ile Lys Tyr
305 310 315 320

Ala Val Ser Lys Lys Gly Lys Cys Ala Val His Ser Met Thr Asn Ala
325 330 335

Val Thr Ile Arg Glu Ala Glu Ile Glu Val Glu Gly Asn Ser Gln Leu
340 345 350

Gln Ile Ser Phe Ser Thr Ala Leu Ala Ser Ala Glu Phe Arg Val Gln
355 360 365

Val Cys Ser Thr Gln Val His Cys Ala Ala Glu Cys His Pro Pro Lys
370 375 380

Asp His Ile Val Asn Tyr Pro Ala Ser His Thr Thr Leu Gly Val Gln
385 390 395 400

Asp Ile Ser Ala Thr Ala Met Ser Trp Val Gln Lys Ile Thr Gly Gly
405 410 415

Val Gly Leu Val Val Ala Val Ala Ala Leu Ile Leu Ile Val Val Leu
420 425 430

Cys Val Ser Phe Ser Arg His
435

<210> 261
<211> 439

<212> PRT
<213> Virus chikungunya
<400> 261

Tyr Glu His Val Thr Val Ile Pro Asn Thr Val Gly Val Pro Tyr Lys
1 5 10 15

Thr Leu Val Asn Arg Pro Gly Tyr Ser Pro Met Val Leu Glu Met Glu
20 25 30

Leu Leu Ser Val Thr Leu Glu Pro Thr Leu Ser Leu Asp Tyr Ile Thr
35 40 45

Cys Glu Tyr Lys Thr Val Ile Pro Ser Pro Tyr Val Lys Cys Cys Gly
50 55 60

Thr Ala Glu Cys Lys Asp Lys Asn Leu Pro Asp Tyr Ser Cys Lys Val
65 70 75 80

Phe Thr Gly Val Tyr Pro Phe Met Trp Gly Gly Ala Tyr Cys Phe Cys
85 90 95

Asp Ala Glu Asn Thr Gln Leu Ser Glu Ala His Val Glu Lys Ser Glu
100 105 110

Ser Cys Lys Thr Glu Phe Ala Ser Ala Tyr Arg Ala His Thr Ala Ser
115 120 125

Ala Ser Ala Lys Leu Arg Val Leu Tyr Gln Gly Asn Asn Ile Thr Val
130 135 140

Thr Ala Tyr Ala Asn Gly Asp His Ala Val Thr Val Lys Asp Ala Lys
145 150 155 160

Phe Ile Val Gly Pro Met Ser Ser Ala Trp Thr Pro Phe Asp Asn Lys
165 170 175

Ile Val Val Tyr Lys Gly Asp Val Tyr Asn Met Asp Tyr Pro Pro Phe
180 185 190

Gly Ala Gly Arg Pro Gly Gln Phe Gly Asp Ile Gln Ser Arg Thr Pro

195 200 205

Glu Ser Lys Asp Val Tyr Ala Asn Thr Gln Leu Val Leu Gln Arg Pro
210 215 220

Ala Ala Gly Thr Val His Val Pro Tyr Ser Gln Ala Pro Ser Gly Phe
225 230 235 240

Lys Tyr Trp Leu Lys Glu Arg Gly Ala Ser Leu Gln His Thr Ala Pro
245 250 255

Phe Gly Cys Gln Ile Ala Thr Asn Pro Val Arg Ala Val Asn Cys Ala
260 265 270

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

Arg Val Val Asp Ala Pro Ser Leu Thr Asp Met Ser Cys Glu Val Leu
290 295 300

Ala Cys Thr His Ser Ser Asp Phe Gly Gly Val Ala Ile Ile Lys Tyr
305 310 315 320

Ala Ala Ser Lys Lys Gly Lys Cys Ala Val His Ser Met Thr Asn Ala
325 330 335

Val Thr Ile Arg Glu Ala Glu Ile Glu Val Glu Gly Asn Ser Gln Leu
340 345 350

Gln Ile Ser Phe Ser Thr Ala Leu Ala Ser Ala Glu Phe Arg Val Gln
355 360 365

Val Cys Ser Thr Gln Val His Cys Ala Ala Glu Cys His Pro Pro Lys
370 375 380

Asp His Ile Val Asn Tyr Pro Ala Ser His Thr Thr Leu Gly Val Gln
385 390 395 400

Asp Ile Ser Ala Thr Ala Met Ser Trp Val Gln Lys Ile Thr Gly Gly
405 410 415

```
Val Gly Leu Val Val Ala Val Ala Ala Leu Ile Leu Ile Val Val Leu
            420                 425                 430

Cys Val Ser Phe Ser Arg His
        435
```

<210> 262
<211> 439
<212> PRT
<213> Virus chikungunya
<400> 262

```
Tyr Glu His Val Thr Val Ile Pro Asn Thr Val Gly Val Pro Tyr Lys
1               5                  10                  15

Thr Leu Val Asn Arg Pro Gly Tyr Ser Pro Met Val Leu Glu Met Glu
            20                  25                  30

Leu Leu Ser Val Thr Leu Glu Pro Thr Leu Ser Leu Asp Tyr Ile Thr
        35                  40                  45

Cys Glu Tyr Lys Thr Val Ile Pro Ser Pro Tyr Val Lys Cys Cys Gly
    50                  55                  60

Thr Ala Glu Cys Lys Asp Lys Asn Leu Pro Asp Tyr Ser Cys Lys Val
65                  70                  75                  80

Phe Thr Gly Val Tyr Pro Phe Met Trp Gly Gly Ala Tyr Cys Phe Cys
                85                  90                  95

Asp Ala Glu Asn Thr Gln Leu Ser Glu Ala His Val Glu Lys Ser Glu
            100                 105                 110

Ser Cys Lys Thr Glu Phe Ala Ser Ala Tyr Arg Ala His Thr Ala Ser
        115                 120                 125

Ala Ser Ala Lys Leu Arg Val Leu Tyr Gln Gly Asn Asn Ile Thr Val
    130                 135                 140

Thr Ala Tyr Ala Asn Gly Asp His Ala Val Thr Val Lys Asp Ala Lys
```

145 150 155 160

Phe Ile Val Gly Pro Met Ser Ser Ala Trp Thr Pro Phe Asp Asn Lys
165 170 175

Ile Val Val Tyr Lys Gly Asp Val Tyr Asn Met Asp Tyr Pro Pro Phe
180 185 190

Gly Ala Gly Arg Pro Gly Gln Phe Gly Asp Ile Gln Ser Arg Thr Pro
195 200 205

Glu Ser Lys Asp Val Tyr Ala Asn Thr Gln Leu Val Leu Gln Arg Pro
210 215 220

Ala Val Gly Thr Val His Val Pro Tyr Ser Gln Ala Pro Ser Gly Phe
225 230 235 240

Lys Tyr Trp Leu Lys Glu Arg Gly Ala Ser Leu Gln His Thr Ala Pro
245 250 255

Phe Gly Cys Gln Ile Ala Thr Asn Pro Val Arg Ala Val Asn Cys Ala
260 265 270

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

Arg Val Val Asp Ala Pro Ser Leu Thr Asp Met Ser Cys Glu Val Pro
290 295 300

Ala Cys Thr His Ser Ser Asp Phe Gly Gly Val Ala Ile Ile Lys Tyr
305 310 315 320

Ala Ala Ser Lys Lys Gly Lys Cys Ala Val His Ser Met Thr Asn Ala
325 330 335

Val Thr Ile Arg Glu Ala Glu Ile Glu Val Glu Gly Asn Ser Gln Leu
340 345 350

Gln Ile Ser Phe Ser Thr Ala Leu Ala Ser Ala Glu Phe Arg Val Gln
355 360 365

```
Val Cys Ser Thr Gln Val His Cys Ala Ala Glu Cys His Pro Pro Lys
    370                 375                 380

Asp His Ile Val Asn Tyr Pro Ala Ser His Thr Thr Leu Gly Val Gln
385                 390                 395                 400

Asp Ile Ser Ala Thr Ala Met Ser Trp Val Gln Lys Ile Thr Gly Gly
                405                 410                 415

Val Gly Leu Val Val Ala Val Ala Ala Leu Ile Leu Ile Val Val Leu
            420                 425                 430

Cys Val Ser Phe Ser Arg His
        435
```

<210> 263
<211> 439
<212> PRT
<213> Virus chikungunya
<400> 263

```
Tyr Glu His Val Thr Val Ile Pro Asn Thr Val Gly Val Pro Tyr Lys
1               5                   10                  15

Thr Leu Val Asn Arg Pro Gly Tyr Ser Pro Met Val Leu Glu Met Glu
            20                  25                  30

Leu Leu Ser Val Thr Leu Glu Pro Thr Leu Ser Leu Asp Tyr Ile Thr
        35                  40                  45

Cys Glu Tyr Lys Thr Val Ile Pro Ser Pro Tyr Val Lys Cys Cys Gly
    50                  55                  60

Thr Ala Glu Cys Lys Asp Lys Ser Leu Pro Asp Tyr Ser Cys Lys Val
65                  70                  75                  80

Phe Thr Gly Val Tyr Pro Phe Met Trp Gly Gly Ala Tyr Cys Phe Cys
                85                  90                  95

Asp Thr Glu Asn Thr Gln Leu Ser Glu Ala His Val Glu Lys Ser Glu
```

100 105 110

Ser Cys Lys Thr Glu Phe Ala Ser Ala Tyr Arg Ala His Thr Ala Ser
115 120 125

Ala Ser Ala Lys Leu Arg Val Leu Tyr Gln Gly Asn Asn Ile Thr Val
130 135 140

Ala Ala Tyr Ala Asn Gly Asp His Ala Val Thr Val Lys Asp Ala Lys
145 150 155 160

Phe Ile Val Gly Pro Met Ser Ser Ala Trp Thr Pro Phe Asp Asn Lys
165 170 175

Ile Val Val Tyr Lys Gly Asp Val Tyr Asn Met Asp Tyr Pro Pro Phe
180 185 190

Gly Ala Gly Arg Pro Gly Gln Phe Gly Asp Ile Gln Ser Arg Thr Pro
195 200 205

Glu Ser Glu Asp Val Tyr Ala Asn Thr Gln Leu Val Leu Gln Arg Pro
210 215 220

Ser Ala Gly Thr Val His Val Pro Tyr Ser Gln Ala Pro Ser Gly Phe
225 230 235 240

Lys Tyr Trp Leu Lys Glu Arg Gly Ala Ser Leu Gln His Thr Ala Pro
245 250 255

Phe Gly Cys Gln Ile Ala Thr Asn Pro Val Arg Ala Met Asn Cys Ala
260 265 270

Val Gly Asn Met Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Asp Ala Ala Phe Thr
275 280 285

Arg Val Val Asp Ala Pro Ser Leu Thr Asp Met Ser Cys Glu Val Ser
290 295 300

Ala Cys Thr His Ser Ser Asp Phe Gly Gly Val Ala Ile Ile Lys Tyr
305 310 315 320

```
Ala Ala Ser Lys Lys Gly Lys Cys Ala Val His Ser Met Thr Asn Ala
                325                 330                 335

Val Thr Ile Arg Glu Ala Glu Ile Glu Val Glu Gly Asn Ser Gln Leu
            340                 345                 350

Gln Ile Ser Phe Ser Thr Ala Leu Ala Ser Ala Glu Phe Arg Val Gln
        355                 360                 365

Val Cys Ser Thr Gln Val His Cys Ala Ala Glu Cys His Pro Pro Lys
    370                 375                 380

Asp His Ile Val Asn Tyr Pro Ala Ser His Thr Thr Leu Gly Val Gln
385                 390                 395                 400

Asp Ile Ser Ala Thr Ala Met Ser Trp Val Gln Lys Ile Thr Gly Gly
                405                 410                 415

Val Gly Leu Val Val Ala Val Ala Ala Leu Ile Leu Ile Val Val Leu
            420                 425                 430

Cys Val Ser Phe Ser Arg His
        435
```

<210> 264
<211> 439
<212> PRT
<213> Virus chikungunya
<400> 264

```
Tyr Glu His Val Thr Val Ile Pro Asn Thr Val Gly Val Pro Tyr Lys
1               5                   10                  15

Thr Leu Val Asn Arg Pro Gly Tyr Ser Pro Met Val Leu Glu Met Glu
            20                  25                  30

Leu Leu Ser Val Thr Leu Glu Pro Thr Leu Ser Leu Asp Tyr Ile Thr
        35                  40                  45

Cys Glu Tyr Lys Thr Val Ile Pro Ser Pro Tyr Val Lys Cys Cys Gly
```

```
    50                  55                  60

Thr Ala Glu Cys Lys Asp Lys Ser Leu Pro Asp Tyr Ser Cys Lys Val
65                  70                  75                  80

Phe Thr Gly Val Tyr Pro Phe Met Trp Gly Gly Ala Tyr Cys Phe Cys
                85                  90                  95

Asp Thr Glu Asn Thr Gln Leu Ser Glu Ala His Val Glu Lys Ser Glu
            100                 105                 110

Ser Cys Lys Thr Glu Phe Ala Ser Ala Tyr Arg Ala His Thr Ala Ser
        115                 120                 125

Ala Ser Ala Lys Leu Arg Val Leu Tyr Gln Gly Asn Asn Val Thr Val
    130                 135                 140

Ser Ala Tyr Ala Asn Gly Asp His Ala Val Thr Val Lys Asp Ala Lys
145                 150                 155                 160

Phe Ile Val Gly Pro Met Ser Ser Ala Trp Thr Pro Phe Asp Asn Lys
                165                 170                 175

Ile Val Val Tyr Lys Gly Asp Val Tyr Asn Met Asp Tyr Pro Pro Phe
            180                 185                 190

Gly Ala Gly Arg Pro Gly Gln Phe Gly Asp Ile Gln Ser Arg Thr Pro
        195                 200                 205

Glu Ser Glu Asp Val Tyr Ala Asn Thr Gln Leu Val Leu Gln Arg Pro
    210                 215                 220

Ser Ala Gly Thr Val His Val Pro Tyr Ser Gln Ala Pro Ser Gly Phe
225                 230                 235                 240

Lys Tyr Trp Leu Lys Glu Arg Gly Ala Ser Leu Gln His Thr Ala Pro
                245                 250                 255

Phe Gly Cys Gln Ile Ala Thr Asn Pro Val Arg Ala Met Asn Cys Ala
            260                 265                 270
```

```
Val Gly Asn Met Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Asp Ala Ala Phe Thr
        275                 280                 285

Arg Val Val Asp Ala Pro Ser Leu Thr Asp Met Ser Cys Glu Val Pro
    290                 295                 300

Ala Cys Thr His Ser Ser Asp Phe Gly Gly Val Ala Ile Ile Lys Tyr
305                 310                 315                 320

Ala Ala Ser Lys Lys Gly Lys Cys Ala Val His Ser Met Thr Asn Ala
                325                 330                 335

Val Thr Ile Arg Glu Ala Glu Ile Glu Val Glu Gly Asn Ser Gln Leu
            340                 345                 350

Gln Ile Ser Phe Ser Thr Ala Leu Ala Ser Ala Glu Phe Arg Val Gln
        355                 360                 365

Val Cys Ser Thr Gln Val His Cys Ala Ala Glu Cys His Pro Pro Lys
    370                 375                 380

Asp His Ile Val Asn Tyr Pro Ala Ser His Thr Thr Leu Gly Val Gln
385                 390                 395                 400

Asp Ile Ser Val Thr Ala Met Ser Trp Val Gln Lys Ile Thr Gly Gly
                405                 410                 415

Val Gly Leu Val Val Ala Val Ala Ala Leu Ile Leu Ile Val Val Leu
            420                 425                 430

Cys Val Ser Phe Ser Arg His
        435
```

<210> 265
<211> 1269
<212> ADN
<213> Virus chikungunya
<400> 265

```
agtattaagg acaacttcaa tgtctataaa gccataagac cgtacctagc tcactgtccc       60
```

gactgtggag aagggcactc gtgccatagt cccgtagcgc tagaacgcat cagaaacgaa 120

gcgacagacg ggacgctgaa aatccaggtt tccttgcaaa tcggaataaa gacggatgat 180

agccatgatt ggaccaagct gcgttacatg gacaatcata tgccagcaga cgcagagagg 240

gccaggctat ttgtaagaac gtcagcaccg tgcacgatta ctggaacaat gggacacttc 300

atcctggccc gatgtccgaa aggagaaact ctgacggtgg gattcactga cggtaggaag 360

atcagtcact catgtacgca cccatttcac cacgaccctc ctgtgatagg ccgggaaaaa 420

tttcattccc gaccgcagca cggtagagaa ctaccttgca gcacgtacgc gcagagcacc 480

gctgcaactg ccgaggagat agaggtacat atgcccccag acaccccaga tcgcacattg 540

atgtcacaac agtccggtaa tgtaaagatc acagtcaata gtcagacggt gcggtacaag 600

tgtaattgcg gtgactcaaa tgaaggacta accactacag acaaagtgat taataactgc 660

aaggttgatc aatgccatgc cgcggtcacc aatcacaaaa aatggcagta taattcccct 720

ctggtcccgc gtaatgctga actcggggac cgaaaaggaa aagttcacat tccgtttcct 780

ctggcaaatg tgacatgcag ggtgcctaag gcaaggaacc ccaccgtgac gtacggaaaa 840

aaccaagtca tcatgctgct gtatcctgac cacccaacgc tcctgtccta ccggaatatg 900

ggagaagaac caaactatca agaagagtgg gtgacgcata agaaggagat caggttaacc 960

gtgccgactg aagggctcga ggtcacgtgg ggcaacaacg agccgtacaa gtattggccg 1020

cagttatcca caaacggtac agcccacggc cacccgcatg agataatttt gtattattat 1080

gagctgtacc ctactatgac tgtggtagtt gtgtcagtgg cctcgttcgt actcctgtcg 1140

atggtgggtg tggcagtggg gatgtgcatg tgtgcacgac gcagatgcat tacaccgtac 1200

gaactgacac caggagctac cgtccctttc ctgcttagcc taatatgctg cattagaaca 1260

gctaaagcg 1269

<210> 266
<211> 1269
<212> ADN
<213> Virus chikungunya
<400> 266
agtactaagg acaattttaa tgtctataaa gctacaagac catatctagc tcattgtcct 60

gactgcggag aagggcattc gtgccacagc cctatcgcat tggagcgcat cagaaatgaa 120

gcaacggacg gaacgctgaa aatccaggtc tctttgcaga tcgggataaa gacagatgac 180

agccacgatt ggaccaagct gcgctatatg gatagccata cgccagcgga cgcggagcga 240

gccggattgc ttgtaaggac ttcagcaccg tgcacgatca ccgggaccat gggacacttt 300

attctcgccc gatgcccgaa aggagagacg ctgacagtgg gatttacgga cagcagaaag 360

atcagccaca catgcacaca cccgttccat catgaaccac ctgtgatagg tagggagagg 420

ttccactctc gaccacaaca tggtaaagag ttaccttgca gcacgtacgt gcagagcacc 480

gctgccactg ccgaggagat agaggtgcat atgcccccag atactcctga ccgcacgctg 540

atgacgcagc agtctggcaa cgtgaagatc acagttaatg ggcagacggt gcggtacaag 600

tgcaactgcg gcggctcaaa cgagggactg acaaccacag acaaagtgat caataactgc 660

aaaattgatc agtgccatgc tgcagtcact aatcacaaga agtggcaata caactcccct 720

ttagtcccgc gtaacgctga actcggggac cgtaaaggaa agattcacat cccattccca 780

ttggcaaacg tgacttgcag agtgccaaaa gcaagaaacc ccacagtaac gtacggaaaa 840

aaccaagtca ccatgctgct gtatcctgac catccgacac tcttgtctta tcgtaacatg 900

ggacaggaac caaattacca cgaggagtgg gtgacacaca agaaggaggt taccttgacc 960

gtgcctactg agggtctgga ggtcacttgg ggcaacaacg aaccatacaa gtactggccg 1020

cagatgtcta cgaacggtac tgctcatggt cacccacatg agataatctt gtactattat 1080

gagctgtacc ccactatgac tgtaatcatt gtgtcggtgg cctcgttcgt gcttctgtcg 1140

atggtgggca cagcagtggg gatgtgtgtg tgcgcacggc gcagatgcat tacaccatat 1200

gaattaacac caggagccac cgttcccttt ctgctcagcc tgctatgttg cgtcagaacg 1260

accaaggcg 1269

<210> 267
<211> 1269
<212> ADN
<213> Virus chikungunya
<400> 267
agcaccaagg acaacttcaa tgtctataaa gccacaagac catacttagc tcactgtccc 60

gactgtggag aagggcactc gtgccatagt cccgtagcac tagaacgcat cagaaatgaa 120

gcgacagacg ggacgctgaa aatccaggtc tccttgcaaa tcggaataaa gacggatgac 180

agccacgatt ggaccaagct gcgttatatg gacaaccaca tgccagcaga cgcagagagg 240

gcggggctat ttgtaagaac atcagcaccg tgtacgatta ctggaacaat gggacacttc 300

atcctggccc gatgtccaaa aggggaaact ctgacggtgg gattcactga cagtaggaag 360

attagtcact catgtacgca cccatttcac cacgaccctc ctgtgatagg tcgggaaaaa 420

ttccattccc gaccgcagca cggtaaagag ctaccttgca gcacgtacgt gcagagcacc 480

gccgcaacta ccgaggagat agaggtacac atgcccccag acacccctga tcgcacatta 540

atgtcacaac agtccggcaa cgtaaagatc acagtcaatg gccagacggt gcggtacaag 600

tgtaattgcg gtggctcaaa tgaaggacta acaactacag acaaagtgat taataactgc 660

aaggttgatc aatgtcatgc cgcggtcacc aatcacaaaa agtggcagta taactcccct 720

ctggtcccgc gtaatgctga acttggggac cgaaaaggaa aaattcacat cccgtttccg 780

ctggcaaatg taacatgcag ggtgcctaaa gcaaggaacc ccaccgtgac gtacgggaaa 840

aaccaagtca tcatgctact gtatcctgac cacccaacac tcctgtccta ccggaatatg 900

ggagaagaac caaactatca agaagagtgg gtgatgcata agaaggaagt cgtgctaacc 960

gtgccgactg aagggctcga ggtcacgtgg ggcaacaacg agccgtataa gtattggccg 1020

cagttatcta caaacggtac agcccatggc cacccgcatg agataattct gtattattat 1080

gagctgtacc ccactatgac tgtagtagtt gtgtcagtgg ccacgttcat actcctgtcg 1140

atggtgggta tggcagcggg gatgtgcatg tgtgcacgac gcagatgcat cacaccgtat 1200

gaactgacac caggagctac cgtccctttc ctgcttagcc taatatgctg catcagaaca 1260

gctaaagcg 1269

<210> 268
<211> 1269
<212> ADN
<213> Virus chikungunya
<400> 268
agcaccaagg acaacttcaa tgtctataaa gccacaagac catacttagc tcactgtccc 60

gactgtggag aagggcactc gtgccatagt cccgtagcac tagaacgcat cagaaatgaa 120

gcgacagacg ggacgctgaa aatccaggtc tccttgcaaa tcggaataaa gacggacgac 180

agccacgatt ggaccaagct gcgttatatg gacaaccaca tgccagcaga cgcagagagg 240

gcggggctat ttgtaagaac atcagcaccg tgtacgatta ctggaacaat gggacacttc 300

atcctggccc gatgtccaaa aggggaaact ctgacggtgg gattcactga cagtaggaag 360

attagtcatt catgtacgca cccatttcac cacgaccctc ctgtgatagg tcgggaaaaa 420

ttccattccc gaccgcagca cggtaaagag ctaccttgca gcacgtacgt gcagagcacc 480

gccgcaacta ccgaggagat agaggtacac atgcccccag acacccctga tcgcacatta 540

atgtcacaac agtccggcaa cgtaaagatc acagtcaatg gccagacggt gcggtacaag 600

tgtaattgcg gtggctcaaa tgaaggacta acaactacag acaaagtgat taataactgc 660

aaggttgatc aatgtcatgc cgcggtcacc aatcacaaaa agtggcagta taactcccct 720

ctggtcccgc gtaatgctga acttggggac cgaaaaggaa aaattcacat cccgtttccg 780

ctggcaaatg taacatgcag ggtgcctaaa gcaaggaacc ccaccgtgac gtacgggaaa 840

aaccaagtca tcatgctact gtatcctgac cacccaacac tcctgtccta ccggaatatg 900

ggagaagaac caaactatca agaagagtgg gtgatgcata agaaggaagt cgtgctaacc 960

gtgccgactg aagggctcga ggtcacgtgg ggcaacaacg agccgtataa gtattggccg 1020

cagttatcta caaacggtac agcccatggc cacccgcatg agataattct gtattattat 1080

gagctgtacc ctactatgac tgtagtagtt gtgtcagtgg ccacgttcat actcctgtcg 1140

atggtgggta tggcagtggg gatgtgcatg tgtgcacgac gcagatgcat cacaccgtat 1200

gaactgacac caggagctac cgtccctttc ctgcttagcc taatatgctg catcagaaca 1260

gctaaagcg 1269

<210> 269
<211> 1269
<212> ADN
<213> Virus chikungunya
<400> 269
agcaccaagg acaacttcaa tgtctataaa gccacaagac catacctagc tcactgtccc 60

gactgtggag aagggcactc gtgccatagt cccgtagcac tagaacgcat cagaaatgaa 120

gcgacagacg ggacgctgaa aatccaggtc tccttgcaaa ttggaatagg gacggatgat 180

agccatgatt ggaccaagct gcgttacatg gacaatcaca taccagcaga cgcagggagg 240

gccgggctat ttgtaagaac atcagcacca tgcacgatta ctggaacaat gggacacttc 300

atcctggccc gatgtccgaa aggagaaact ctgacggtgg gattcactga cagtaggaag 360

attagtcact catgtacgca cccatttcac cacgaccctc ctgtgatagg ccgggaaaaa 420

ttccattccc gaccgcagca cggtaaagag ctaccttgca gcacgtacgt gcagagcaac 480

gccgcaactg ccgaggagat agaggtacac atgcccccag acacccctga tcgcacattg 540

ctgtcacaac agtccggcaa cgtaaagatc acagtcaata gtcagacggt gcggtataag 600

tgtaattgcg gtggctcaaa tgaaggacta ataactacag ataaagtgat taataactgc 660

aaggttgatc aatgtcatgc cgcggtcacc aatcacaaaa agtggcagta taactcccct 720

ctggtcccgc gtaacgctga actcggggac cgaaaaggaa aaattcacat cccgtttccg 780

ctggcaaatg taacatgcat ggtgcctaaa gcaaggaacc ccaccgtgac gtacgggaaa 840

aaccaagtca tcatgctact gtatcctgac cacccaacac tcctgtccta ccggagtatg 900

ggagaagaac caaactatca agaagagtgg gtgacgcaca agaaggaggt cgtgctaacc 960

gtgccgactg aagggctcga ggttacgtgg ggcaacaacg agccgtataa gtattggccg 1020

cagttatctg caaacggtac agcccacggc cacccgcatg agataatctt gtactattat 1080

gagctgtacc ctactatgac tgtagtagtt gtgtcagtgg cctcgttcat actcctgtcg 1140

atggtgggta tggcagtggg gatgtgcatg tgtgcacgac gcagatgcat cacaccatac 1200

gaactgacac caggagctac cgtccctttc ctgcttagcc taatatgctg catcagaaca 1260

gctaaagcg 1269

<210> 270
<211> 1269
<212> ADN
<213> Virus chikungunya
<400> 270
agtattaagg accacttcaa tgtctataaa gccacaagac cgtacctagc tcactgtccc 60

gactgtggag aagggcactc gtgccatagt cccgtagcgc tagaacgcat cagaaacgaa 120

gcgacagacg ggacgttgaa aatccaggtt tccttgcaaa tcggaataaa gacggatgat 180

agccatgatt ggaccaagct gcgttatatg gacaatcaca tgccagcaga cgcagagcgg 240

gccgggctat ttgtaagaac gtcagcaccg tgcacgatta ctggaacaat gggacacttc 300

attctggccc gatgtccgaa aggagaaact ctgacggcgg ggttcactga cggtaggaag 360

atcagtcact catgtacgca cccatttcac catgaccctc ctgtgatagg ccgggaaaaa 420

ttccattccc gaccgcagca cggtagggaa ctaccttgca gcacgtacgc gcagagcacc 480

gctgcaactg ccgaggagat agaggtacac atgcccccag acaccccaga tcgcacatta 540

atgtcacaac agtccggcaa tgtaaagatc acagtcaata gtcagacggt gcggtacaag 600

tgcaattgtg gtgactcaag tgaaggatta accactacag ataaagtgat taataactgc 660

aaggtcgatc aatgccatgc cgcggtcacc aatcacaaaa aatggcagta taattcccct 720

ctggtcccgc gtaatgctga attcggggac cggaaaggaa aagttcacat tccatttcct 780

ctggcaaatg tgacatgcag ggtgcctaaa gcaagaaacc ccaccgtgac gtacggaaaa 840

aaccaagtca tcatgttgct gtatcctgac cacccaacgc tcctgtccta caggaatatg 900

ggagaagaac caaactatca agaagagtgg gtgacgcata agaaggagat caggttaacc 960

gtgccgactg aggggctcga ggtcacgtgg ggtaacaatg agccgtacaa gtattggccg 1020

cagttatcca caaacggtac agcccacggc cacccgcatg agataattct gtattattat 1080

gagctgtacc caactatgac tgcggtagtt ttgtcagtgg cctcgttcat actcctgtcg 1140

atggtgggtg tggcagtggg gatgtgcatg tgtgcacgac gcagatgcat tacaccgtac 1200

gaactgacac caggagctac cgtccctttc ctgcttagcc taatatgctg cattagaaca 1260

gctaaagcg 1269

<210> 271
<211> 423
<212> PRT
<213> Virus chikungunya
<400> 271

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 Ile
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 Ser His Thr Pro Ala Asp Ala Glu Arg
65 70 75 80

```
Ala Gly Leu Leu 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 Thr Cys Thr His Pro
        115                 120                 125

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

Asp Arg Thr Leu Met Thr 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 Ile 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 Thr Met Leu Leu Tyr
        275                 280                 285
```

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

Asn Tyr His Glu Glu Trp Val Thr His Lys Lys Glu Val Thr 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 Met 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

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

Ala Val Gly Met Cys Val 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 Leu Cys
                405                 410                 415

Cys Val Arg Thr Thr Lys Ala
            420
```

<210> 272
<211> 423
<212> PRT
<213> Virus chikungunya
<400> 272

```
Ser Ile Lys Asp His 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

Ala Gly Phe Thr Asp Gly 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 Arg Glu Leu Pro Cys Ser Thr Tyr Ala Gln Ser Thr
145                 150                 155                 160

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

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

Asn Ser Gln Thr Val Arg Tyr Lys Cys Asn Cys Gly Asp Ser Ser 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 Phe Gly Asp Arg Lys Gly Lys Val 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 Thr His Lys Lys Glu Ile Arg 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 Ala
355 360 365

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

Ala Val 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> 273
<211> 423
<212> PRT
<213> Virus chikungunya
<400> 273

Ser Ile Lys Asp Asn Phe Asn Val Tyr Lys Ala Ile 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 Gly 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 Arg Glu Leu Pro Cys Ser Thr Tyr Ala Gln Ser Thr
145                 150                 155                 160

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

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

Asn Ser Gln Thr Val Arg Tyr Lys Cys Asn Cys Gly Asp 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 Val 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 Thr His Lys Lys Glu Ile Arg 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 Ser Phe Val Leu Leu Ser Met Val Gly Val
    370                 375                 380

Ala Val 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> 274

<211> 423
<212> PRT
<213> Virus chikungunya
<400> 274

```
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 Gly Thr Asp Asp Ser His Asp Trp
    50                  55                  60

Thr Lys Leu Arg Tyr Met Asp Asn His Ile Pro Ala Asp Ala Gly 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 Asn
145                 150                 155                 160

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

Asp Arg Thr Leu Leu Ser Gln Gln Ser Gly Asn Val Lys Ile Thr Val
            180                 185                 190
```

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

Gly Leu Ile 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 Met 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 Ser Met Gly Glu Glu Pro
290 295 300

Asn Tyr Gln Glu Glu Trp Val Thr 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 Ala 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 Ser Phe Ile Leu Leu Ser Met Val Gly Met
370 375 380

Ala Val 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> 275
<211> 423
<212> PRT
<213> Virus chikungunya
<400> 275

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 Arg 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 Val 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> 276
<211> 423
<212> PRT
<213> Virus chikungunya
<400> 276

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 Arg 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

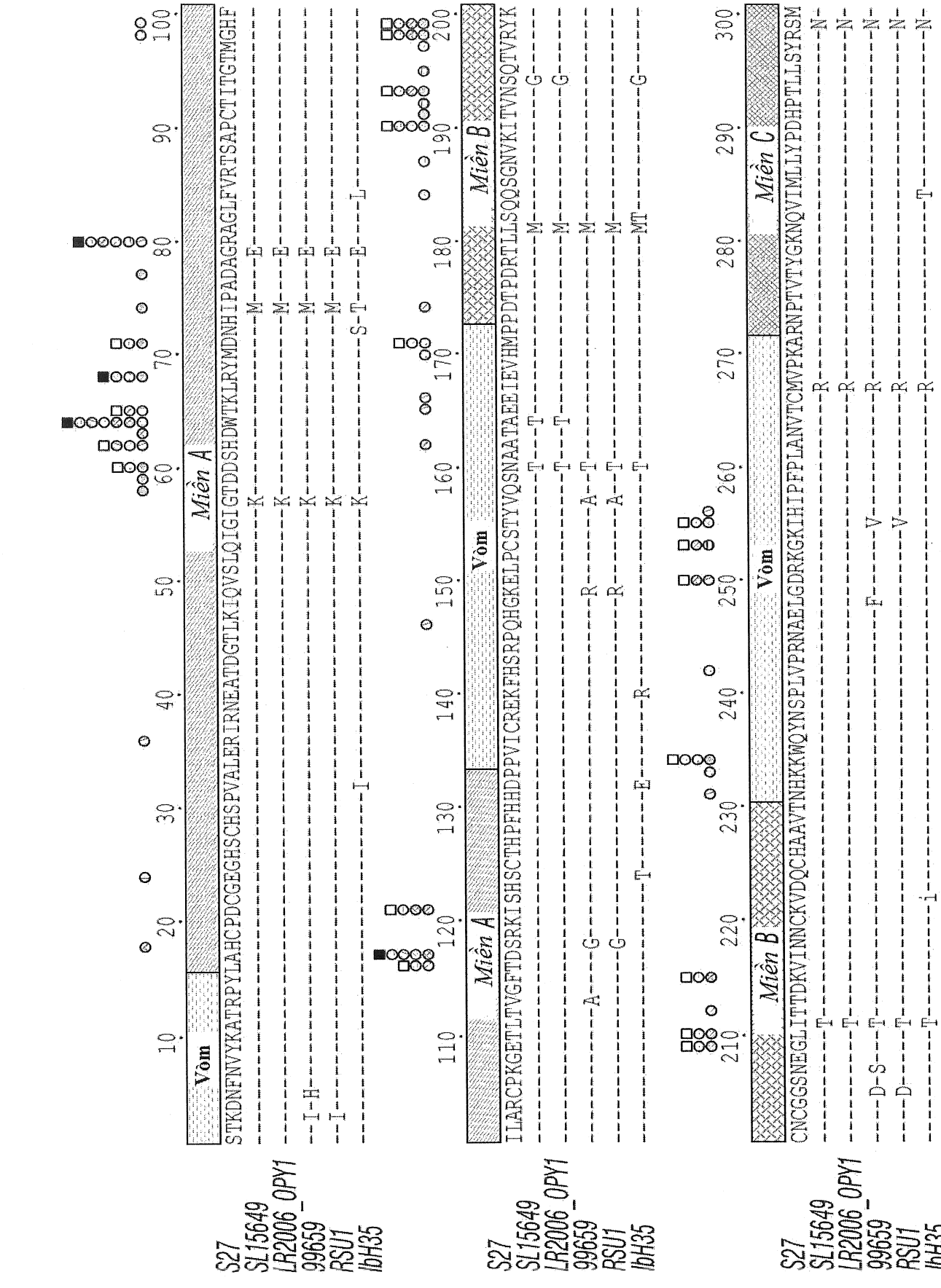
Val Val Val Ser Val Ala Thr Phe Ile Leu Leu Ser Met Val Gly Met
370 375 380

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

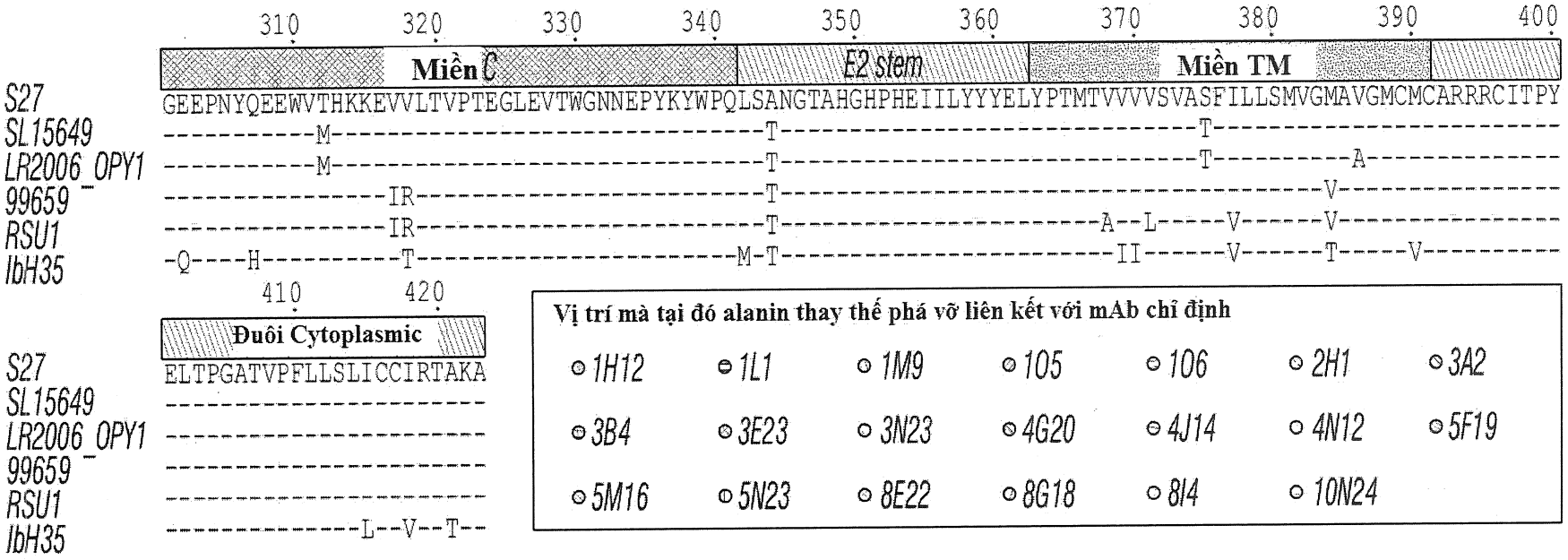
Glu Leu Thr Pro Gly Ala Thr Val Pro Phe Leu Leu Ser Leu Ile Cys
405 410 415

Cys Ile Arg Thr Ala Lys Ala
420

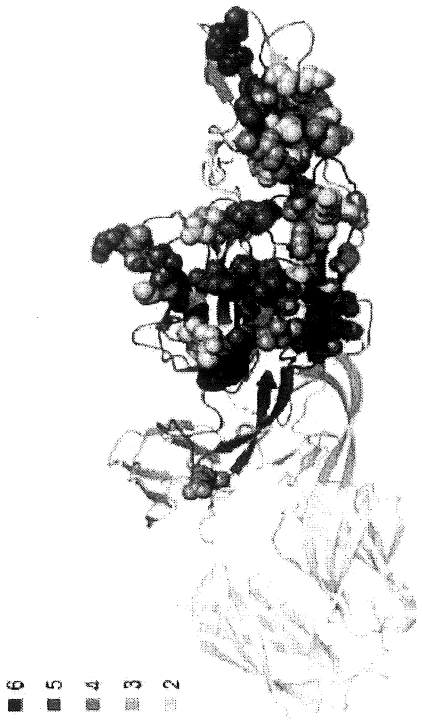
1/34


Vòm
Miền A
Miền B
Miền C
S27
SL15649
LR2006_OPY1
99659
RSU1
IbH35

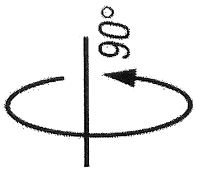
Hình 1A


310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
Miền C
E2 stem
Miền TM
S27 GEEPNYQEEWVTHKKEVVLTVPTEGLEVTWGNNEPYKYWPQLSANGTAHGHPHEIILYYYELYPTMTVVVVSVASFILLSMVGMAVGMCMCARRRCITPY
SL15649 ----------M----------T----------T----------
LR2006_OPY1 ----------M----------T----------T----------A----------
99659 ----------IR----------T----------V----------
RSU1 ----------IR----------T----------A--L-----V------V----------
IbH35 -Q----H----------T----------M-T----------II------V------T-----V----------
410 420
Đuôi Cytoplasmic
S27 ELTPGATVPFLLSLICCIRTAKA
SL15649 ----------
LR2006_OPY1 ----------
99659 ----------
RSU1 ----------
IbH35 ----------L--V--T--
Vị trí mà tại đó alanin thay thế phá vỡ liên kết với mAb chỉ định
1H12 1L1 1M9 1O5 1O6 2H1 3A2
3B4 3E23 3N23 4G20 4J14 4N12 5F19
5M16 5N23 8E22 8G18 8I4 10N24

Hình 1A
(Tiếp)

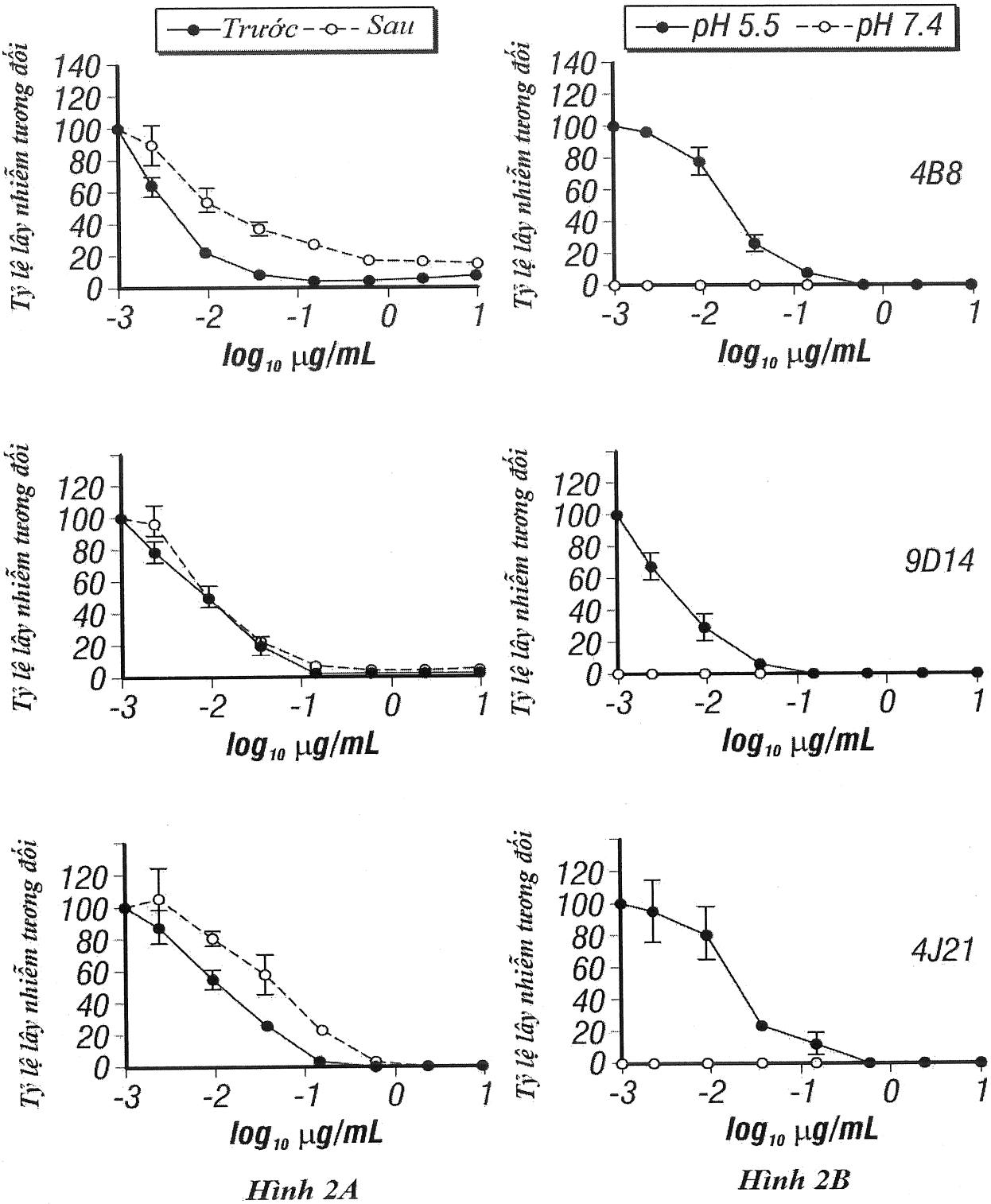


Hình 1C



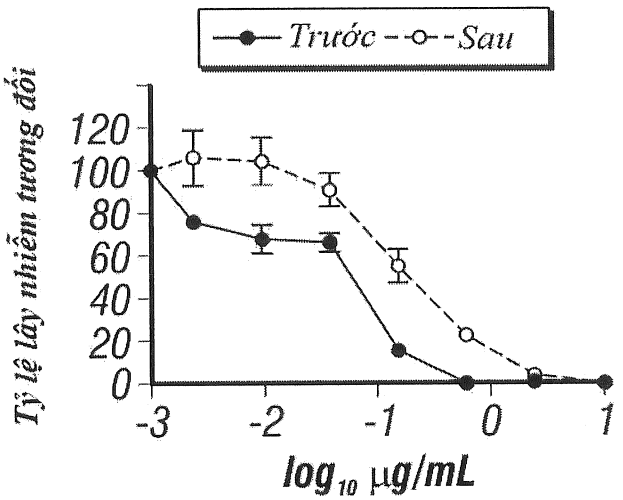


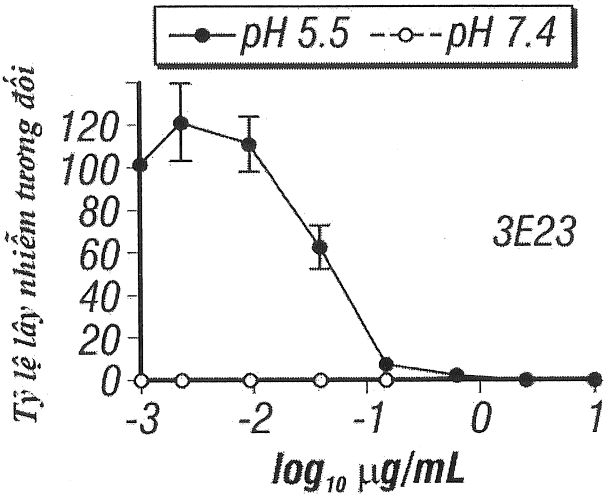
Hình 1B

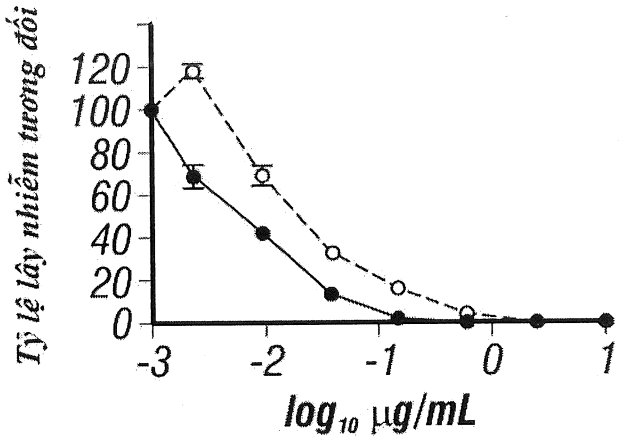


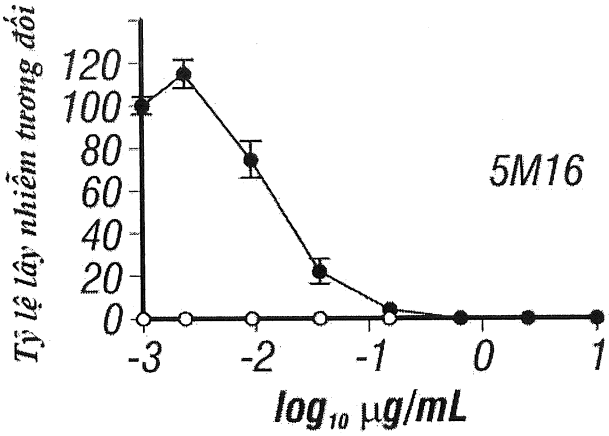
Hình 2A

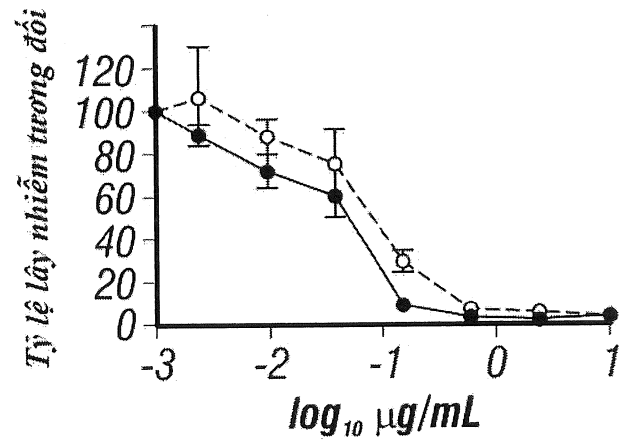
Hình 2B

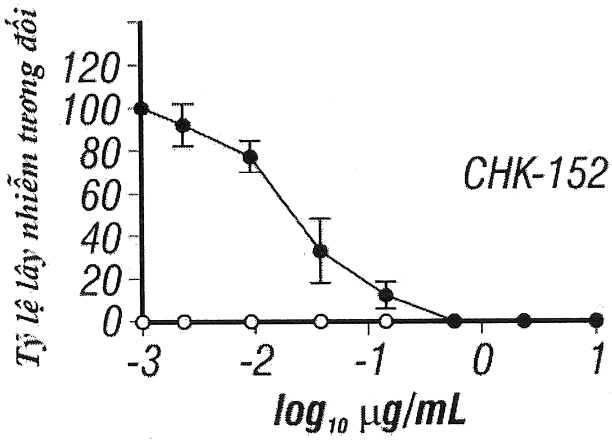








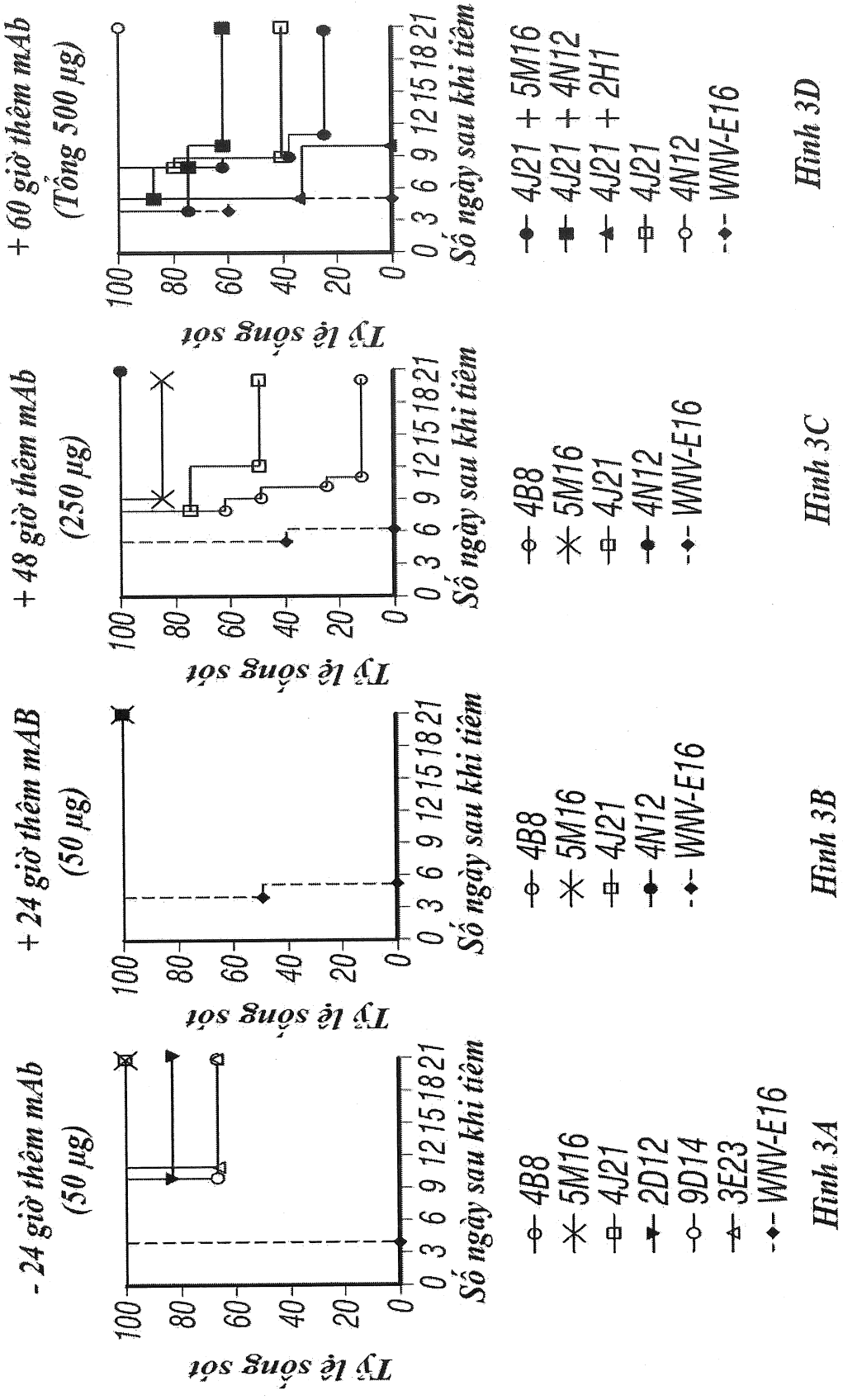




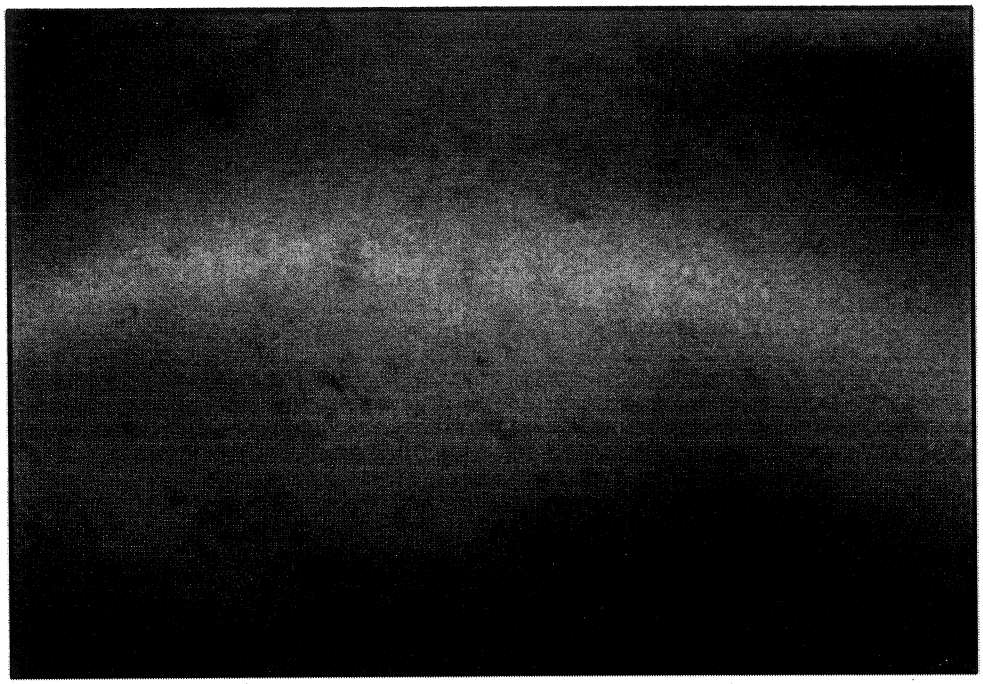
Hình 2A
(Tiếp)

Hình 2B
(Tiếp)

6/34


- 24 giờ thêm mAb
(50 µg)
+ 24 giờ thêm mAB
(50 µg)
+ 48 giờ thêm mAb
(250 µg)
+ 60 giờ thêm mAb
(Tổng 500 µg)
Tỷ lệ sống sót
Số ngày sau khi tiêm
0 3 6 9 12 15 18 21
0 20 40 60 80 100
4B8
5M16
4J21
2D12
9D14
3E23
4N12
WNV-E16
4J21 + 5M16
4J21 + 4N12
4J21 + 2H1
Hình 3A
Hình 3B
Hình 3C
Hình 3D

7/34



Hình 4

Kháng thể cạnh tranh

mAb	5N23	CHK-84	CHK-141	5O14	5M16	1O6	9D14	4B8	1H12	5F10	CHK-265	CHK-88	3A2	5F19	Các miền xác định bằng nghiên cứu đột biến
5N23	0	-1	-3	82	92	111	79	96	-2	103	98	96	108	96	DA, Vòm
CHK-84	5	2	4	5	-2	48	103	102	-4	100	92	90	99	81	DA
CHK-141	5	5	-1	-9	38	65	97	101	30	96	86	85	92	80	DA
5O14	77	47	49	-1	27	15	44	33	1	89	85	89	15	91	NR
5M16	93	21	34	-10	5	-3	20	18	-2	96	84	87	64	88	DA
1O6	89	68	79	-20	-12	-7	34	3	-4	82	85	110	86	87	DA
9D14	98	105	98	26	25	30	23	27	24	118	105	116	114	94	NoR
4B8	92	88	94	-1	6	4	4	6	4	96	92	91	112	103	NR
1H12	31	38	54	5	26	19	48	36	-10	52	52	49	56	91	DA/DB Vòm
5F10	92	94	101	86	95	97	84	90	45	-3	-3	5	93	99	
CHK-265	100	94	100	77	90	79	80	88	45	2	2	10	101	96	DB
CHK-88	97	85	101	77	91	108	89	91	38	3	3	8	53	97	DB
3A2	92	95	94	37	72	89	71	92	44	88	95	44	3	103	DB

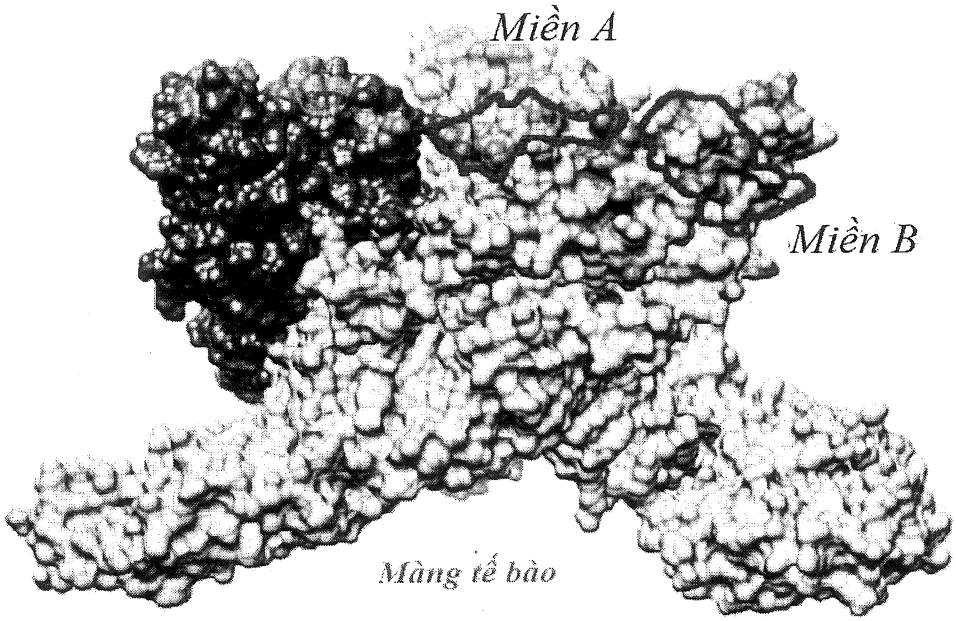
Kháng thể chính

Hình 5

Hình 6A

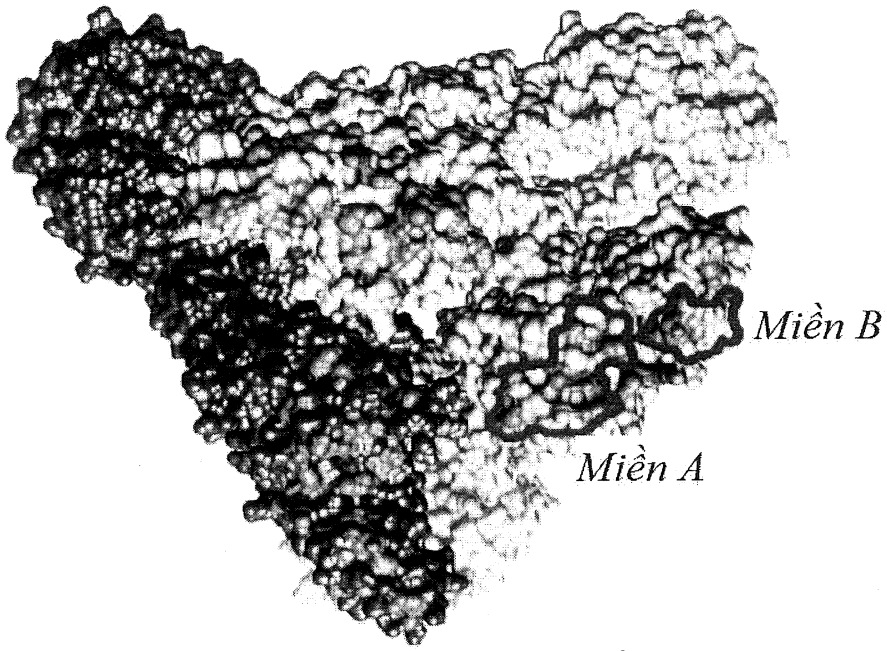
Hình 6B

Hình 6C



Chất tam phân - Góc nhìn bên

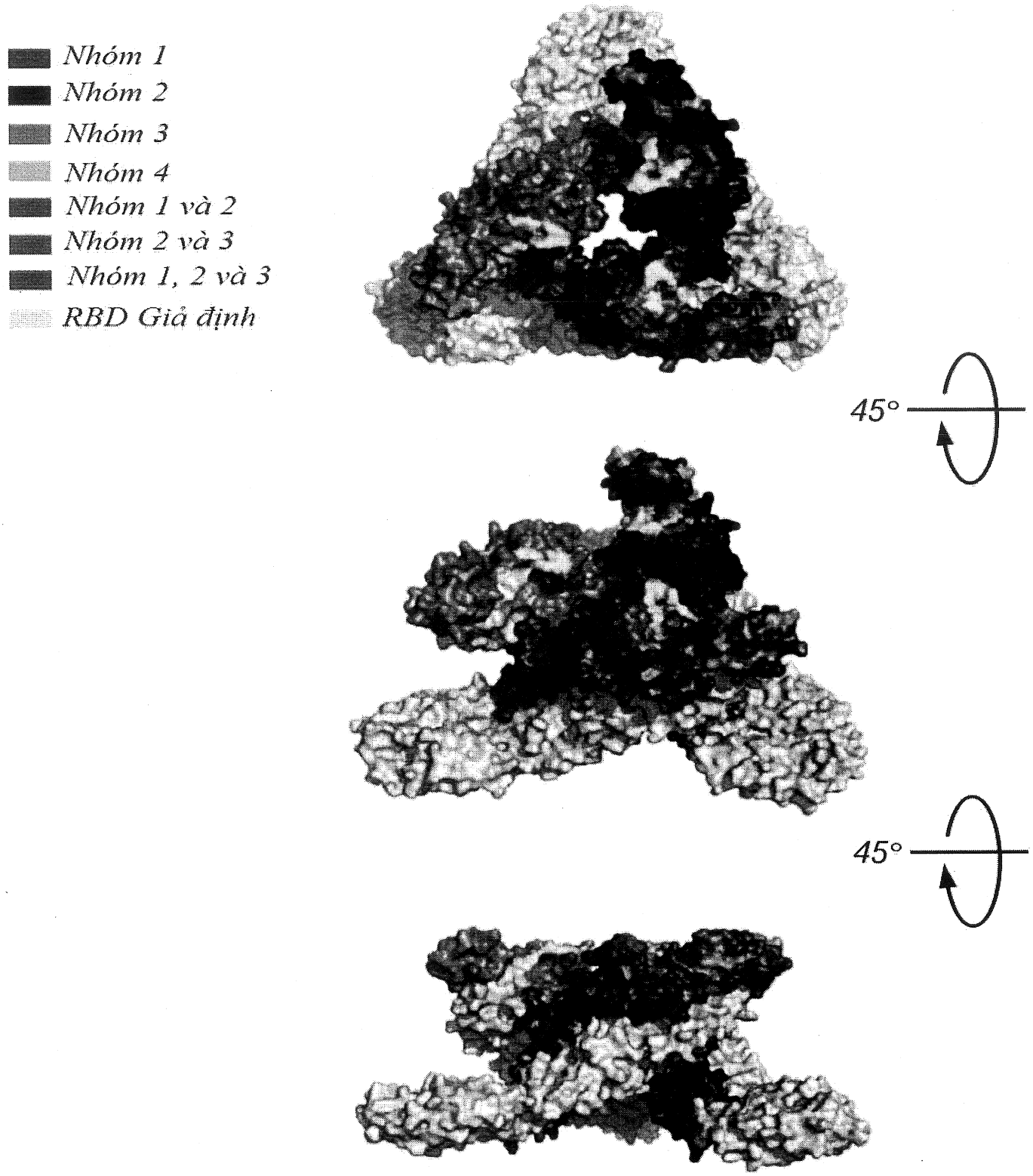
Hình 6E



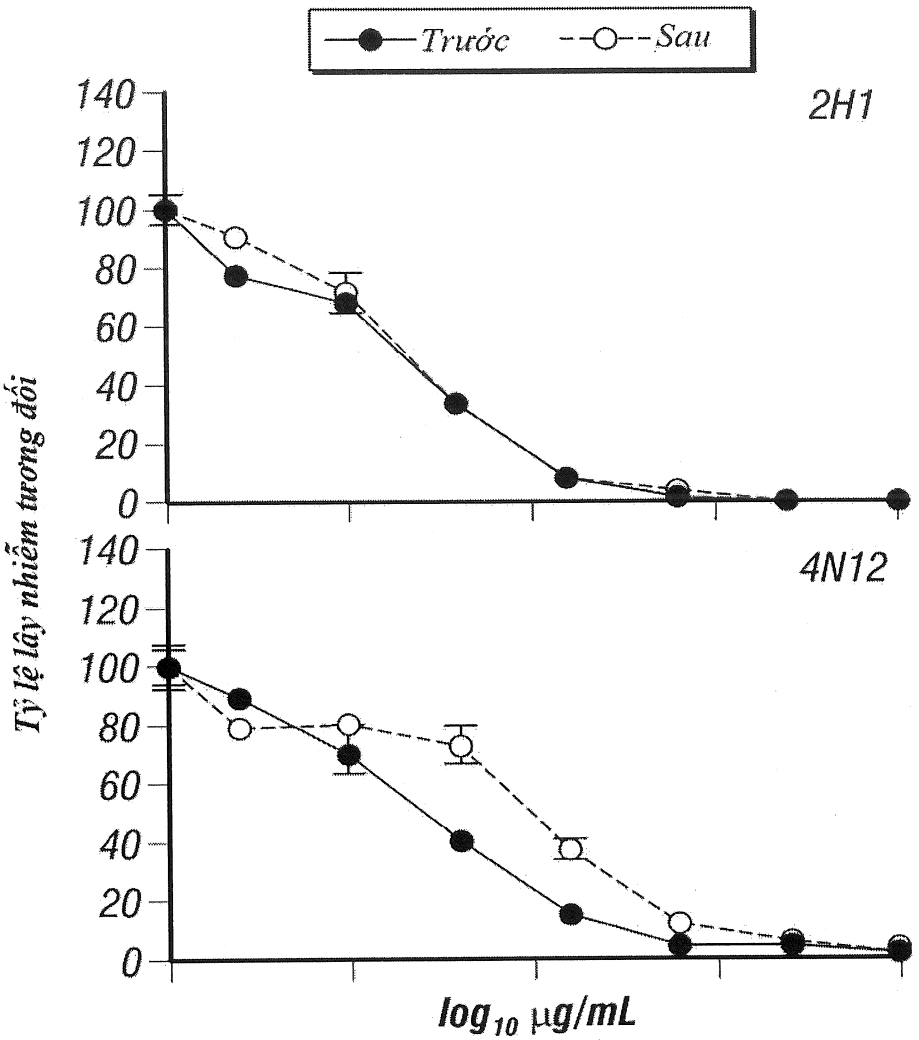
Chất tam phân - Góc nhìn trên xuống

Hình 6F

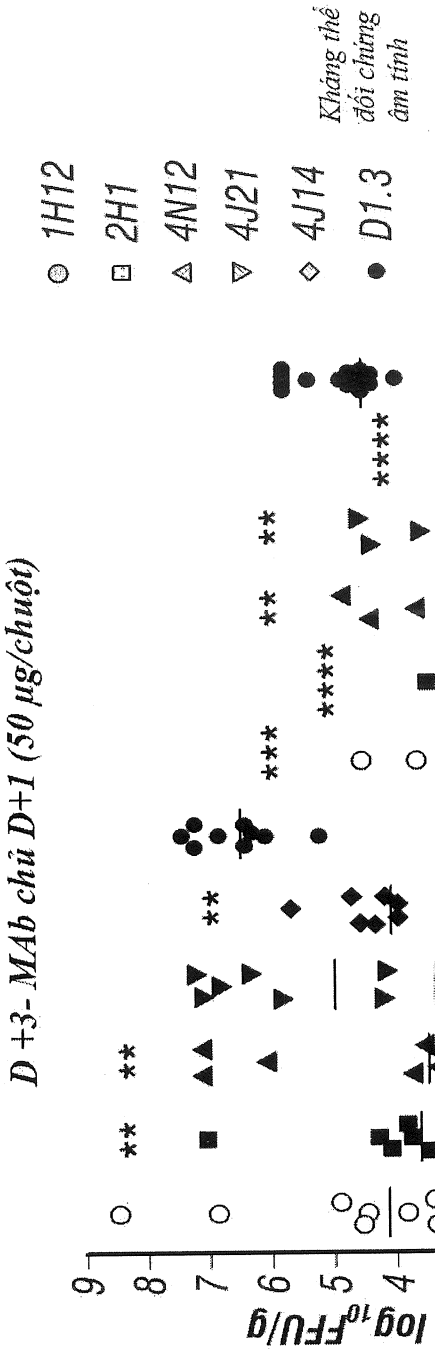
11/34


Nhóm 1
Nhóm 2
Nhóm 3
Nhóm 4
Nhóm 1 và 2
Nhóm 2 và 3
Nhóm 1, 2 và 3
RBD Giả định
45°
45°

Hình 7


Trước
Sau
2H1
4N12
140
120
100
80
60
40
20
0
Tỷ lệ lây nhiễm tương đối
log10 µg/mL

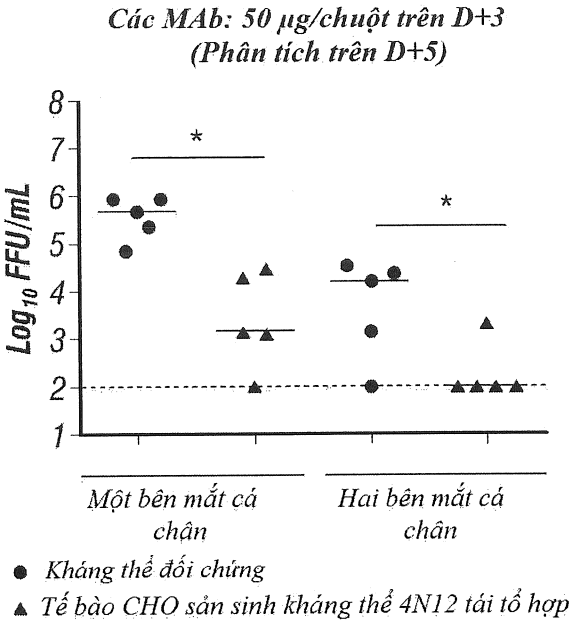
Hình 8



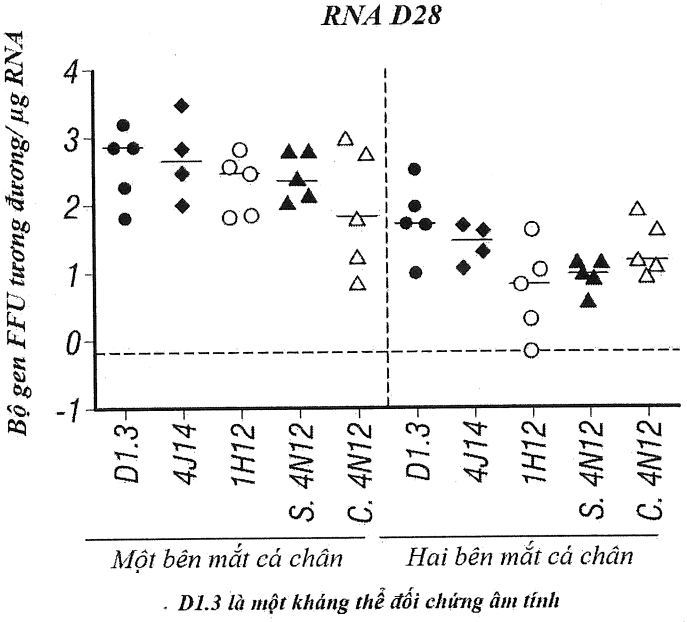
Thí nghiệm Krustal-Wallis cho mỗi mô so với D1.3

Hình 9

14/34

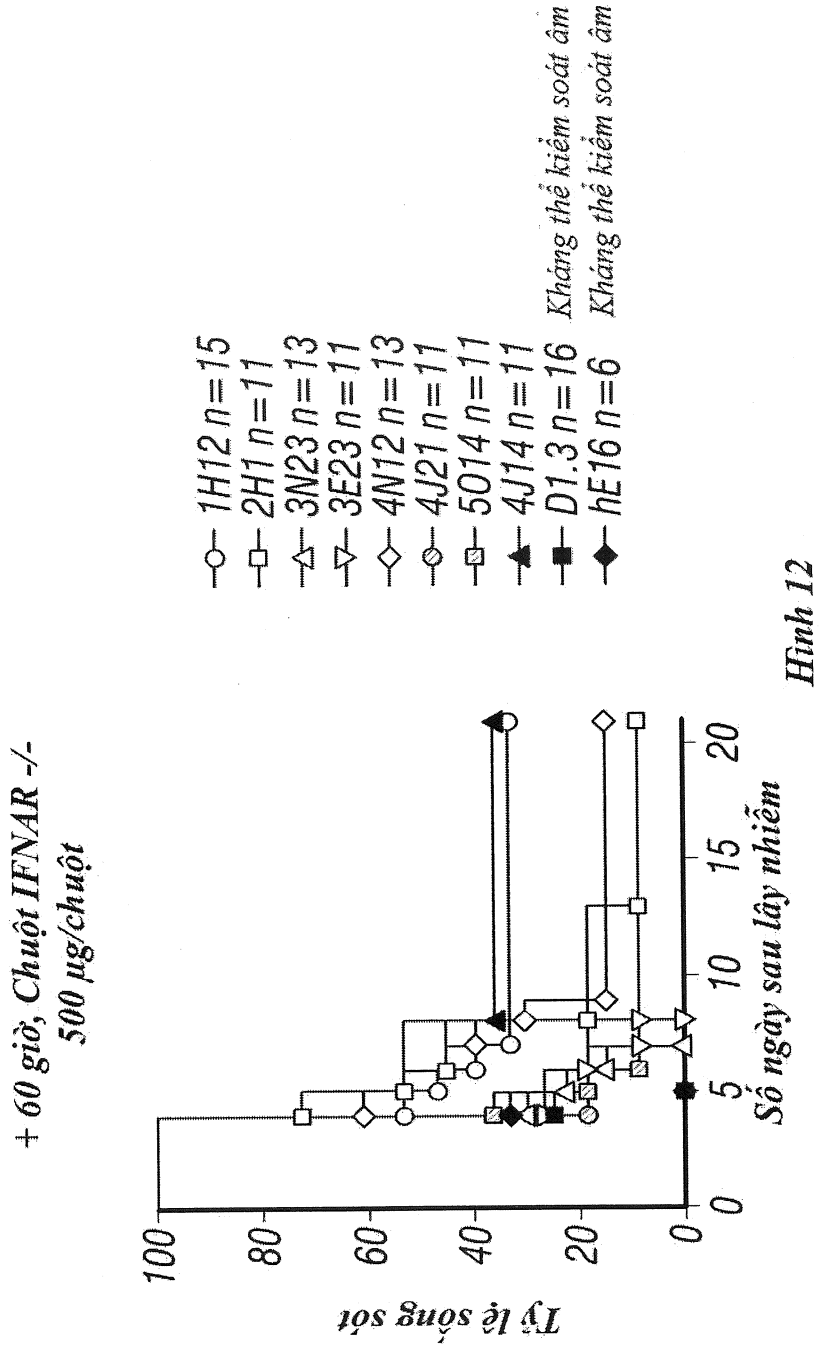


Hình 10

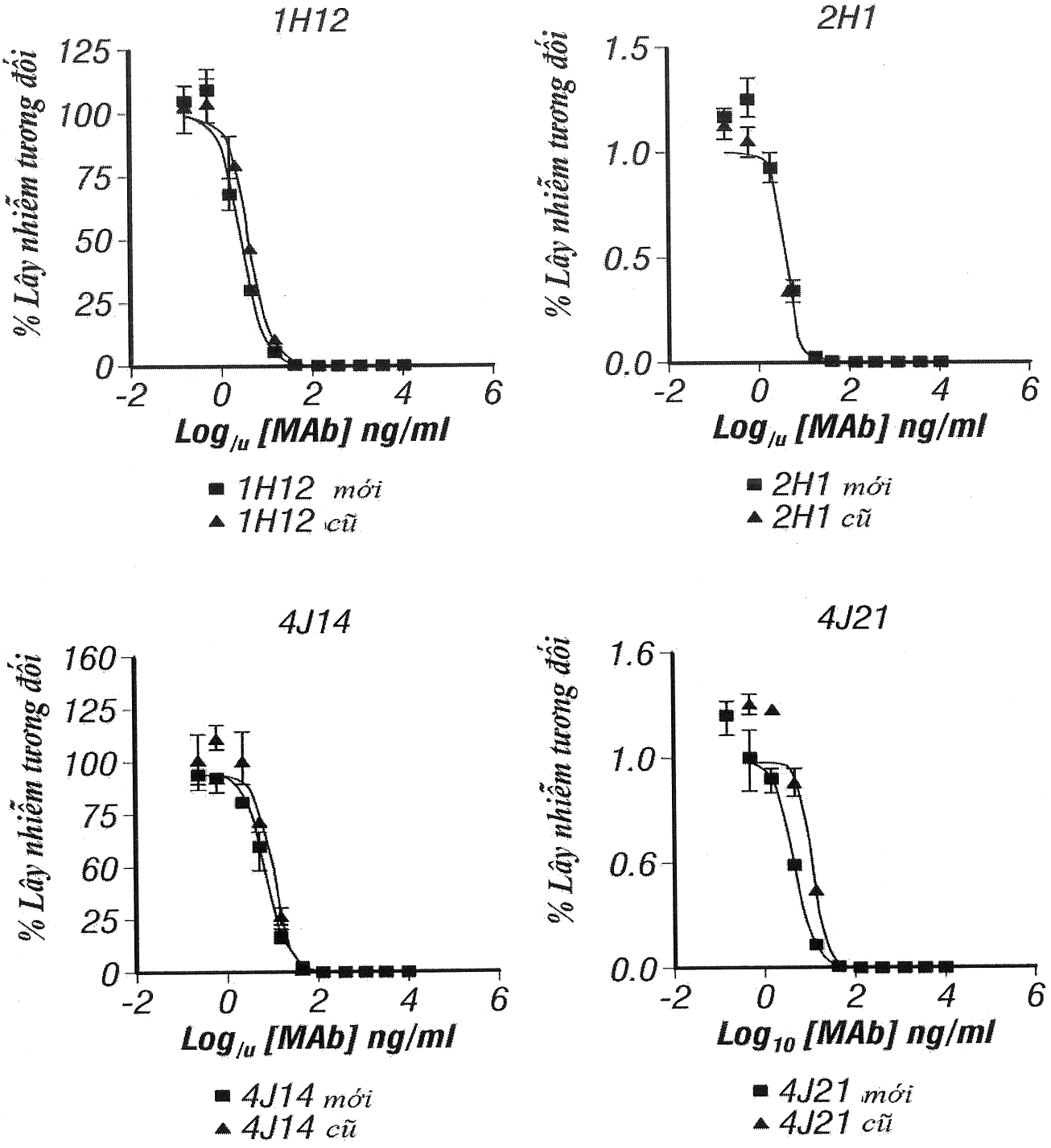


. D1.3 là một kháng thể đối chứng âm tính

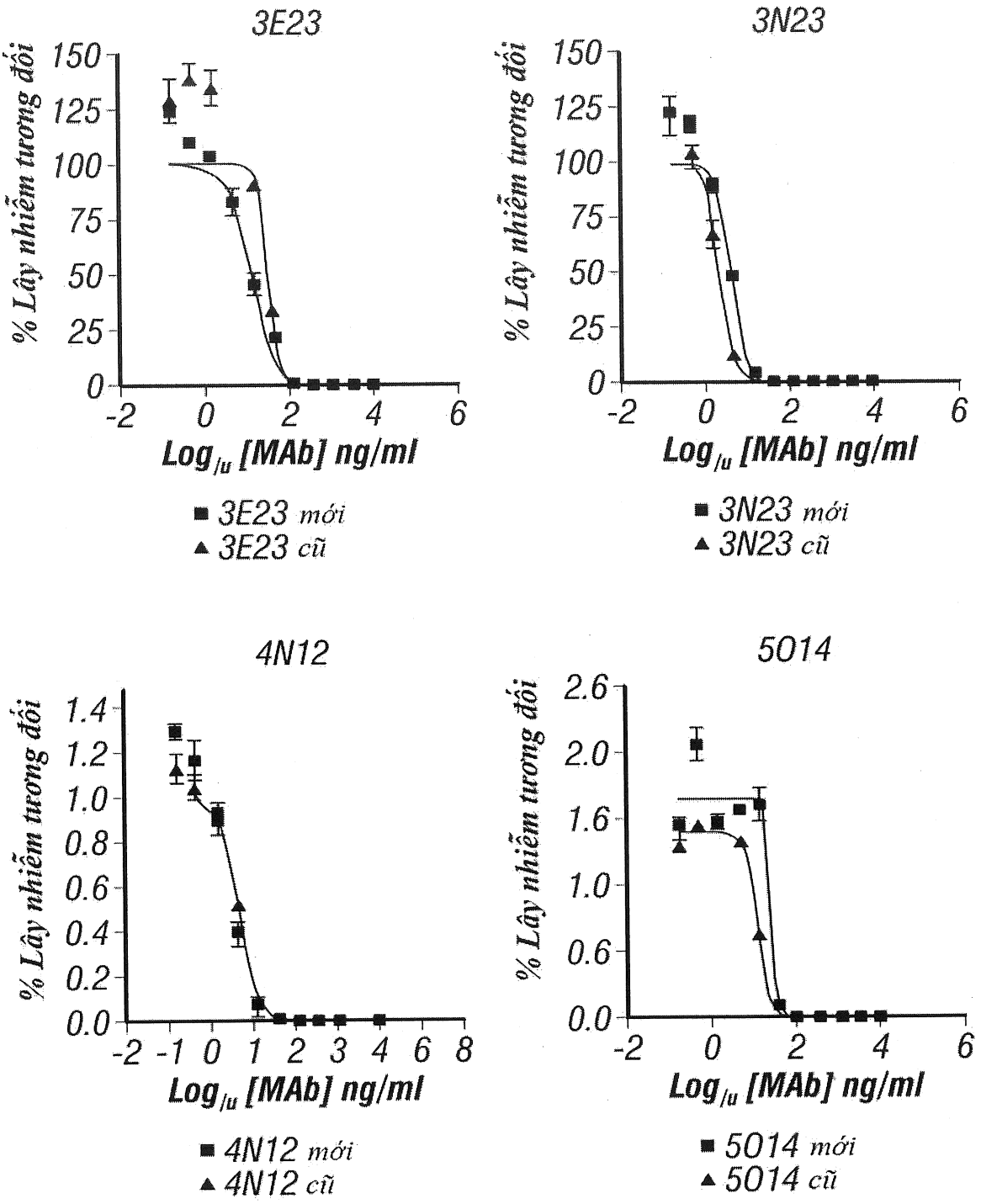
Hình 11


+ 60 giờ, Chuột IFNAR -/-
500 µg/chuột
Tỷ lệ sống sót
100
80
60
40
20
0
0
5
10
15
20
Số ngày sau lây nhiễm
1H12 n=15
2H1 n=11
3N23 n=13
3E23 n=11
4N12 n=13
4J21 n=11
5O14 n=11
4J14 n=11
D1.3 n=16
hE16 n=6
Kháng thể kiểm soát âm
Kháng thể kiểm soát âm

Hình 12


1H12
% Lây nhiễm tương đối
125
100
75
50
25
0
-2
0
2
4
6
Log/u [MAb] ng/ml
1H12 mới
1H12 cũ
2H1
% Lây nhiễm tương đối
1.5
1.0
0.5
0.0
-2
0
2
4
6
Log/u [MAb] ng/ml
2H1 mới
2H1 cũ
4J14
% Lây nhiễm tương đối
160
125
100
75
60
25
0
-2
0
2
4
6
Log/u [MAb] ng/ml
4J14 mới
4J14 cũ
4J21
% Lây nhiễm tương đối
1.6
1.0
0.6
0.0
-2
0
2
4
6
Log10 [MAb] ng/ml
4J21 mới
4J21 cũ

Hình 13


3E23
% Lây nhiễm tương đối
150
125
100
75
50
25
0
-2
0
2
4
6
Log/u [MAb] ng/ml
3E23 mới
3E23 cũ
3N23
% Lây nhiễm tương đối
150
125
100
75
50
25
0
-2
0
2
4
6
Log/u [MAb] ng/ml
3N23 mới
3N23 cũ
4N12
% Lây nhiễm tương đối
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
-2 -1 0 1 2 3 4 6 8
Log/u [MAb] ng/ml
4N12 mới
4N12 cũ
5014
% Lây nhiễm tương đối
2.6
2.0
1.6
1.0
0.6
0.0
-2
0
2
4
6
Log/u [MAb] ng/ml
5014 mới
5014 cũ

Hình 13
(Tiếp)

18/34

Clon	*Tế bào lai-sản sinh mAb (Cũ)*	*Tế bào CHO tái tổ hợp-sản sinh mAb (Mới)*
1H12	4.2	2.7
2H1	4	3.8
(3E)23	34	13.8
3N23	2.1	4.5
4J14	8.6	5.7
4J21	11.4	4.8
4N12	4.8	5
5M16	5.9	1,094
5(O)14	14.3	34.8

Hình 14

Sắp xếp E1/E2 của virut Chikungunya

Các kiểu gen ECSA:	LR2006 S27 SL15649
Các kiểu gen châu Á:	181/25 99659
Kiểu gen Tây Phi:	IbH35

Các trình tự được sắp xếp biểu thị bởi số hiệu lưu trữ trong Protein_Strain_Bank

Hình 15

CLUSTAL 0 (1.2.1) các sắp xếp trình tự khác nhau

```
E1_S27_NC004162.2          TACGAACACGTAACAGTGATCCCGAACACGGTGGGAGTACCGTATAAGACTCTAGTCAAC
E1_SL15649_GU189061.1      TACGAACACGTAACAGTGATCCCGAACACGGTGGGAGTACCGTATAAGACTCTAGTCAAT
E1_LR2006_KT449801.1       TACGAACACGTAACAGTGATCCCGAACACGGTGGGAGTACCGTATAAGACTCTAGTCAAT
E1_181/25_L37661.3         TACGAACACGTAACAGTGATCCCGAACACGGTGGGAGTACCGTATAAGACTCTAGTCAAC
E1_99659_KJ451624.1        TACGAACACGTAACAGTGATCCCGAACACGGTGGGAGTACCGTATAAGACTCTAGTCAAC
E1_IbH35_HM045786.1        TACGAACACGTAACAGTGATCCCGAACACGGTGGGAGTACCGTATAAGACTCTTGTCAAC
                           ************************************************:*****

E1_S27_NC004162.2          AGACCGGGCTACAGCCCCATGGTACTGGAGATGGAGCTACTGTCAGTCACTTTGGAGCCA
E1_SL15649_GU189061.1      AGACCTGGCTACAGCCCCATGGTATTGGAGATGGAACTACTGTCAGTCACTTTGGAGCCA
E1_LR2006_KT449801.1       AGACCTGGCTACAGCCCCATGGTATTGGAGATGGAACTACTGTCAGTCACTTTGGAGCCA
E1_181/25_L37661.3         AGACCGGGCTACAGCCCCATGGTACTGGAGATGGAGCTTCTGTCAGTCACTTTGGAGCCA
E1_99659_KJ451624.1        AGACCGGGCTACAGCCCCATGGTATTGGAGATGGAGCTTCTGTCTGTCACCTTGGAACCA
E1_IbH35_HM045786.1        AGACCGGGTTACAGCCCCATGGTATTGGAGATGGAGCTACAATCGGTCACCTTGGAACCA
                           ***** ** *************** **********.**:*:.** ***** *****.***

E1_S27_NC004162.2          ACGCTATCGCTTGATTACATCACGTGCGAATACAAAACCGTCATCCCGTCTCCGTACGTG
E1_SL15649_GU189061.1      ACACTATCGCTTGATTACATCACGTGCGAGTACAAAACCGTCATCCCGTCTCCGTACGTG
E1_LR2006_KT449801.1       ACACTATCGCTTGATTACATCACGTGCGAGTACAAAACCGTCATCCCGTCTCCGTACGTG
E1_181/25_L37661.3         ACGCTATCGCTTGATTACATCACGTGCGAGTATAAAACCGTCATCCCGTCTCCGTACGTG
E1_99659_KJ451624.1        ACGCTATCGCTTGATTACATCACGTGCGAGTATAAAACCGTTATCCCGTCTCCGTACGTG
E1_IbH35_HM045786.1        ACACTGTCACTTGACTACATCACGTGCGAGTACAAAACTGTCATCCCGTCCCCGTACGTG
                           **.**.**.***** **************.** ***** ** ***** ** *********

E1_S27_NC004162.2          AAATGCTGCGGTACAGCAGAGTGCAAGGACAAAAACCTACCTGACTACAGCTGTAAGGTC
E1_SL15649_GU189061.1      AAGTGCTGCGGTACAGCAGAGTGCAAGGACAAAAACCTACCTGACTACAGCTGTAAGGTC
E1_LR2006_KT449801.1       AAGTGCTGCGGTACAGCAGAGTGCAAGGACAAAAACCTACCTGACTACAGCTGTAAGGTC
E1_181/25_L37661.3         AAATGCTGCGGTACAGCAGAGTGCAAGGACAAGAGCCTACCTGATTACAGCTGTAAGGTC
E1_99659_KJ451624.1        AAATGCTGCGGTACAGCAGAGTGTAAGGACAAGAGCCTACCTGATTACAGCTGTAAGGTC
E1_IbH35_HM045786.1        AAGTGCTGTGGTACAGCAGAGTGCAAGGACAAGAGCCTACCAGACTACAGCTGCAAGGTC
                           **.***** ************** ********.*.******:** ******** ******
```

Hình 15 (Tiếp)

```
E1_S27_NC004162.2          TTCACCGGCGTCTACCCATTTATGTGGGGCGGCGCCTACTGCTTCTGCGACGCTGAAAAC
E1_SL15649_GU189061.1      TTCACCGGCGTCTACCCATTTATGTGGGGCGGCGCCTACTGCTTCTGCGACGCTGAAAAC
E1_LR2006_KT449801.1       TTCACCGGCGTCTACCCATTTATGTGGGGCGGCGCCTACTGCTTCTGCGACGCTGAAAAC
E1_181/25_L37661.3         TTCACCGGCGTCTACCCATTCATGTGGGGCGGCGCCTACTGCTTCTGCGACACTGAAAAT
E1_99659_KJ451624.1        TTCACCGGCGTCTACCCATTCATGTGGGGCGGCGCCTACTGCTTCTGCGACACCGAAAAT
E1_IbH35_HM045786.1        TTTACTGGAGTCTACCCATTTATGTGGGGCGGCGCCTACTGCTTTTGCGACGCCGAAAAT
                           ** ** **.*********** ********************** ******.* *****

E1_S27_NC004162.2          ACGCAATTGAGCGAAGCACATGTGGAGAAGTCCGAATCATGCAAAACAGAATTTGCATCA
E1_SL15649_GU189061.1      ACGCAGTTGAGCGAAGCACATGTGGAGAAGTCCGAATCATGCAAAACAGAATTTGCATCA
E1_LR2006_KT449801.1       ACGCAGTTGAGCGAAGCACACGTGGAGAAGTCCGAATCATGCAAAACAGAATTTGCATCA
E1_181/25_L37661.3         ACGCAATTGAGCGAAGCACATGTGGAGAAGTCCGAATCATGCAAAACAGAATTTGCATCA
E1_99659_KJ451624.1        ACGCAATTGAGCGAAGCACATGTGGAGAAGTCCGAATCATGCAAAACAGAATTTGCATCA
E1_IbH35_HM045786.1        ACGCAATTGAGCGAGGCACATGTAGAGAAATCTGAATCTTGCAAAACAGAGTTTGCATCG
                           *****.********.***** **.*****.** *****:***********.********.

E1_S27_NC004162.2          GCATACAGGGCTCATACCGCATCCGCATCAGCTAAGCTCCGCGTCCTTTACCAAGGAAAT
E1_SL15649_GU189061.1      GCATACAGGGCTCATACCGCATCTGCATCAGCTAAGCTCCGCGTCCTTTACCAAGGAAAT
E1_LR2006_KT449801.1       GCATACAGGGCTCATACCGCATCTGCATCAGCTAAGCTCCGCGTCCTTTACCAAGGAAAT
E1_181/25_L37661.3         GCATATAGGGCTCATACCGCATCCGCATCAGCTAAGCTCCGCGTCCTTTACCAAGGAAAT
E1_99659_KJ451624.1        GCATACAGGGCTCATACCGCATCCGCATCAGCTAAGCTCCGCGTCCTTTACCAAGGAAAT
E1_IbH35_HM045786.1        GCCTACAGAGCCCACACCGCATCCGCGTCGGCGAAGCTCCGCGTCCTTTACCAAGGAAAC
                           **.** **.** ** ******** **.**.** **************************

E1_S27_NC004162.2          AACATCACTGTAACTGCCTATGCAAACGGCGACCATGCCGTCACAGTTAAGGACGCCAAA
```

Hình 15 (Tiếp)

```
E1_SL15649_GU189061.1     AACATCACTGTAACTGCCTATGCAAACGGCGACCATGCCGTCACAGTTAAGGACGCCAAA
E1_LR2006_KT449801.1      AACATCACTGTAACTGCCTATGCAAACGGCGACCATGCCGTCACAGTTAAGGACGCCAAA
E1_181/25_L37661.3        AATGTTACTGTATCTGCTTATGCAAACGGCGATCATGCCGTCACAGTTAAGGACGCTAAA
E1_99659_KJ451624.1       AATATCACTGTGGCTGCTTATGCAAACGGCGACCATGCCGTCACAGTTAAGGACGCTAAA
E1_IbH35_HM045786.1       AACATTACTGTAGCTGCCTACGCTAACGGCGACCATGCCGTCACAGTAAAGGACGCCAAG
                          ** .* *****. **** ** **:******** **********:******** **.

E1_S27_NC004162.2         TTCATTGTGGGGCCAATGTCTTCAGCCTGGACACCTTTTGACAACAAAATCGTGGTGTAC
E1_SL15649_GU189061.1     TTCATTGTGGGGCCAATGTCTTCAGCCTGGACACCTTTCGACAACAAAATTGTGGTGTAC
E1_LR2006_KT449801.1      TTCATTGTGGGGCCAATGTCTTCAGCCTGGACACCTTTCGACAACAAAATTGTGGTGTAC
E1_181/25_L37661.3        TTCATTGTGGGGCCAATGTCTTCAGCCTGGACACCTTTTGACAATAAAATCGTGGTGTAC
E1_99659_KJ451624.1       TTCATAGTGGGGCCAATGTCTTCAGCCTGGACACCTTTCGACAATAAAATCGTGGTGTAC
E1_IbH35_HM045786.1       TTTGTCGTGGGACCAATGTCCTCCGCCTGGACACCTTTTGACAACAAAATCGTGGTGTAC
                          ** .* *****.******** **.************** ***** ***** *********

E1_S27_NC004162.2         AAAGGTGACGTTTACAACATGGACTACCCGCCCTTTGGCGCAGGAAGACCAGGACAATTT
E1_SL15649_GU189061.1     AAAGGTGACGTCTATAACATGGACTACCCGCCCTTTGGCGCAGGAAGACCAGGACAATTT
E1_LR2006_KT449801.1      AAAGGTGACGTCTATAACATGGACTACCCGCCCTTTGGCGCAGGAAGACCAGGACAATTT
E1_181/25_L37661.3        AAAGGCGACGTCTACAACATGGACTACCCGCCCTTCGGCGCAGGAAGACCAGGACAATTT
E1_99659_KJ451624.1       AAAGGCGACGTCTACAACATGGACTACCCGCCCTTCGGCGCAGGAAGACCAGGACAATTT
E1_IbH35_HM045786.1       AAAGGCGACGTCTACAACATGGACTACCCACCTTTTGGCGCAGGAAGACCAGGACAATTT
                          ***** ***** ** **************.** ** ************************

E1_S27_NC004162.2         GGCGATATCCAAAGTCGCACGCCTGAGAGCAAAGACGTCTATGCTAACACACAACTGGTA
E1_SL15649_GU189061.1     GGCGATATCCAAAGTCGCACACCTGAGAGTAAAGACGTCTATGCTAATACACAACTGGTA
E1_LR2006_KT449801.1      GGCGATATCCAAAGTCGCACACCTGAGAGTAAAGACGTCTATGCTAATACACAACTGGTA
E1_181/25_L37661.3        GGCGACATCCAAAGTCGCACGCCTGAGAGCGAAGACGTCTATGCTAACACACAACTGGTA
E1_99659_KJ451624.1       GGCGACATCCAAAGTCGCACGCCTGAGAGCGAAGACGTCTATGCTAATACACAACTGGTA
E1_IbH35_HM045786.1       GGTGACATTCAAAGTCGTACACCGGAAAGTAAAGACGTTTATGCCAACACTCAGTTGGTA
                          ** ** ** ******** **.** **.** .******* ***** ** **:**. *****
```

Hình 15 (Tiếp)

```
E1_S27_NC004162.2          CTGCAGAGACCGGCTGCGGGTACGGTACACGTGCCATACTCTCAGGCACCATCTGGCTTT
E1_SL15649_GU189061.1      CTGCAGAGACCGGCTGCGGGTACGGTACACGTGCCATACTCTCAGGCACCATCTGGCTTT
E1_LR2006_KT449801.1       CTGCAGAGACCGGCTGTGGGTACGGTACACGTGCCATACTCTCAGGCACCATCTGGCTTT
E1_181/25_L37661.3         CTGCAGAGACCGTCCGCGGGTACGGTGCACGTGCCGTACTCTCAGGCACCATCTGGCTTC
E1_99659_KJ451624.1        CTGCAGAGACCGTCCGCGGGTACGGTGCACGTGCCGTACTCTCAGGCACCATCTGGCTTC
E1_IbH35_HM045786.1        CTACAGAGGCCAGCAGCAGGCACGGTACATGTACCATACTCTCAGGCACCATCTGGCTTC
                           **.*****.**. * * .** *****.** **.**.**********************

E1_S27_NC004162.2          AAGTATTGGTTAAAAGAACGAGGGGCGTCGCTACAGCACACAGCACCATTTGGCTGCCAA
E1_SL15649_GU189061.1      AAGTATTGGCTAAAAGAACGCGGGGCGTCACTGCAGCACACAGCACCATTTGGCTGCCAA
E1_LR2006_KT449801.1       AAGTATTGGCTAAAAGAACGCGGGGCGTCGCTGCAGCACACAGCACCATTTGGCTGCCAA
E1_181/25_L37661.3         AAGTATTGGCTAAAAGAACGAGGGGCGTCGCTGCAGCACACAGCACCATTTGGCTGTCAA
E1_99659_KJ451624.1        AAGTATTGGCTAAAAGAACGAGGGGCGTCGCTGCAGCACACAGCACCATTTGGCTGTCAA
E1_IbH35_HM045786.1        AAGTATTGGCTGAAGGAACGAGGAGCATCGCTACAGCACACGGCACCGTTCGGTTGCCAG
                           ********* *.**.*****.**.**.**.**.********.*****.** ** ** **.

E1_S27_NC004162.2          ATAGCAACAAACCCGGTAAGAGCGATGAACTGCGCCGTAGGGAACATGCCCATCTCCATC
E1_SL15649_GU189061.1      ATAGCAACAAACCCGGTAAGAGCGGTGAACTGCGCCGTAGGGAACATGCCCATCTCCATC
E1_LR2006_KT449801.1       ATAGCAACAAACCCGGTAAGAGCGGTGAACTGCGCCGTAGGGAACATGCCCATCTCCATC
E1_181/25_L37661.3         ATAGCAACAAACCCGGTAAGAGCGATGAACTGCGCCGTAGGGAACATGCCTATCTCCATC
E1_99659_KJ451624.1        ATAGCAACAAACCCGGTAAGAGCGATGAACTGCGCCGTAGGGAACATGCCTATCTCCATC
E1_IbH35_HM045786.1        ATTGCGACAAACCCGGTAAGAGCTGTAAATTGCGCTGTGGGGAACATACCAATTTCCATC
                           **:**.****************** .*.** ***** **.********.** ** ******

E1_S27_NC004162.2          GACATACCGGATGCGGCCTTCACTAGGGTCGTCGACGCGCCCTCTTTAACGGACATGTCA
E1_SL15649_GU189061.1      GACATACCGGAAGCGGCCTTCACTAGGGTCGTCGACGCGCCCTCTTTAACGGACATGTCG
E1_LR2006_KT449801.1       GACATACCGGAAGCGGCCTTCACTAGGGTCGTCGACGCGCCCTCTTTAACGGACATGTCG
E1_181/25_L37661.3         GACATACCGGACGCGGCCTTCACTAGGGTCGTCGACGCGCCATCTTTAACGGACATGTCG
E1_99659_KJ451624.1        GACATACCGGACGCGGCCTTTACCAGGGTCGTCGACGCGCCATCTTTAACGGACATGTCG
E1_IbH35_HM045786.1        GACATACCGGATGCGGCCTTTACTAGGGTTGTCGATGCACCCTCTGTAACGGACATGTCA
                           *********** ******** ** ***** ***** **.**.*** ************.
```

Hình 15 (Tiếp)

```
E1_S27_NC004162.2          TGCGAGGTACCAGCCTGCACCCATTCCTCAGACTTTGGGGGCGTCGCCATTATTAAATAT
E1_SL15649_GU189061.1      TGCGAGGTACTAGCCTGCACCCATTCCTCAGACTTTGGGGGCGTCGCCATTATTAAATAT
E1_LR2006_KT449801.1       TGCGAGGTACCAGCCTGCACCCATTCCTCAGACTTTGGGGGCGTCGCCATTATTAAATAT
E1_181/25_L37661.3         TGTGAGGTACCAGCCTGCACCCACTCCTCAGACTTTGGGGGCGTAGCCATCATTAAATAT
E1_99659_KJ451624.1        TGTGAGGTATCAGCCTGCACCCATTCCTCAGACTTTGGGGGCGTAGCCATCATTAAATAT
E1_IbH35_HM045786.1        TGCGAAGTACCAGCCTGCACTCACTCCTCCGACTTTGGGGGCGTCGCCATCATCAAATAT
                           ** **.***  ********* ** *****.**********.***** ** ******

E1_S27_NC004162.2          GCAGTCAGCAAGAAAGGCAAGTGTGCGGTGCATTCGATGACCAACGCCGTCACTATCCGG
E1_SL15649_GU189061.1      GCAGCCAGCAAGAAAGGCAAGTGTGCGGTGCATTCGATGACTAACGCCGTCACTATTCGG
E1_LR2006_KT449801.1       GCAGCCAGCAAGAAAGGCAAGTGTGCGGTGCATTCGATGACTAACGCCGTCACTATTCGG
E1_181/25_L37661.3         GCAGCCAGCAAGAAAGGCAAGTGTGCGGTGCATTCGATGACTAACGCCGTCACTATTCGG
E1_99659_KJ451624.1        GCAGCCAGTAAGAAAGGCAAGTGTGCAGTGCACTCGATGACTAACGCCGTCACTATTCGG
E1_IbH35_HM045786.1        ACAGCTAGCAAGAAAGGTAAATGTGCAGTACATTCGATGACCAACGCCGTTACCATTCGA
                           .***  ** ******** **.*****.**.** ******** ******** ** ** **.

E1_S27_NC004162.2          GAAGCTGAGATAGAAGTTGAAGGGAATTCTCAGCTGCAAATCTCTTTCTCGACGGCCTTG
E1_SL15649_GU189061.1      GAAGCTGAGATAGAAGTTGAAGGGAATTCTCAGCTGCAAATCTCTTTCTCGACGGCCTTA
E1_LR2006_KT449801.1       GAAGCTGAGATAGAAGTTGAAGGGAATTCTCAGCTGCAAATCTCTTTCTCGACGGCCTTA
E1_181/25_L37661.3         GAAGCTGAAATAGAAGTAGAAGGGAACTCTCAGTTGCAAATCTCTTTTTCGACGGCCCTA
E1_99659_KJ451624.1        GAAGCTGAAATAGAAGTAGAAGGGAACTCTCAGTTGCAAATCTCTTTTTCGACGGCCCTA
E1_IbH35_HM045786.1        GAAGCCGACGTAGAAGTAGAGGGGAATTCCCAGCTGCAAATATCCTTCTCAACAGCCTTG
                           ***** ** .*******:**.***** ** *** *******.** ** **.**.*** *.

E1_S27_NC004162.2          GCCAGCGCCGAATTCCGCGTACAAGTCTGTTCTACACAAGTACACTGTGCAGCCGAGTGC
E1_SL15649_GU189061.1      GCCAGCGCCGAATTCCGCGTACAAGTCTGTTCTACACAAGTACACTGTGCAGCTGAGTGC
E1_LR2006_KT449801.1       GCCAGCGCCGAATTCCGCGTACAAGTCTGTTCTACACAAGTACACTGTGCAGCCGAGTGC
E1_181/25_L37661.3         GCCAGCGCCGAATTCCGCGTACAAGTCTGTTCTACACAAGTACACTGTGCAGCCGAGTGC
E1_99659_KJ451624.1        GCCAGCGCCGAATTTCGCGTACAAGTCTGTTCTACACAAGTACACTGTGCAGCCGAGTGC
E1_IbH35_HM045786.1        GCAAGCGCCGAGTTTCGCGTGCAAGTGTGCTCCACACAAGTACACTGCGCAGCCGCATGC
                           **.********.** *****.***** ** ** ************** ***** *..***
```

Hình 15 (Tiếp)

```
E1_S27_NC004162.2          CACCCTCCGAAGGACCACATAGTCAACTACCCGGCGTCACATACCACCCTCGGGGTCCAG
E1_SL15649_GU189061.1      CACCCCCCGAAGGACCACATAGTCAACTACCCGGCGTCACATACCACCCTCGGGGTCCAG
E1_LR2006_KT449801.1       CACCCCCCGAAGGACCACATAGTCAACTACCCGGCGTCACATACCACCCTCGGGGTCCAG
E1_181/25_L37661.3         CATCCACCGAAAGACCATATAGTCAATTACCCGGCGTCACACACCACCCTCGGGGTCCAA
E1_99659_KJ451624.1        CATCCACCGAAAGACCATATAGTCAATTACCCGGCGTCACACACCACCCTCGGGGTCCAA
E1_IbH35_HM045786.1        CACCCTCCAAAGGACCACATAGTCAATTACCCAGCATCACACACCACCCTTGGGGTCCAG
                           ** ** **.**.***** ******** *****.**.***** ******** ********.

E1_S27_NC004162.2          GACATTTCCGCTACGGCGATGTCATGGGTGCAGAAGATCACGGGAGGTGTGGGACTGGTT
E1_SL15649_GU189061.1      GACATCTCCGCTACGGCGATGTCATGGGTGCAGAAGATCACGGGAGGTGTGGGACTGGTT
E1_LR2006_KT449801.1       GACATCTCCGCTACGGCGATGTCATGGGTGCAGAAGATCACGGGAGGTGTGGGACTGGTT
E1_181/25_L37661.3         GACATTTCCGTTACGGCGATGTCATGGGTGCAGAAGATCACGGGAGGTGTGGGACTGGTT
E1_99659_KJ451624.1        GACATTTCCGCTACGGCGATGTCATGGGTGCAGAAGATCACGGGAGGTGTGGGACTGGTT
E1_IbH35_HM045786.1        GATATATCCACAACGGCAATGTCTTGGGTGCAGAAGATTACGGGAGGAGTAGGATTAATT
                           ** ** ***. :*****.*****:************** ********:**.*** *..**

E1_S27_NC004162.2          GTCGCTGTTGCAGCACTGATTCTAATCGTGGTGCTATGCGTGTCGTTCAGCAGGCAC
E1_SL15649_GU189061.1      GTTGCTGTTGCCGCACTGATTCTAATCGTGGTGCTATGCGTGTCGTTCAGCAGGCAC
E1_LR2006_KT449801.1       GTTGCTGTTGCCGCACTGATTCTAATCGTGGTGCTATGCGTGTCGTTCAGCAGGCAC
E1_181/25_L37661.3         GTCGCTGTTGCAGCACTGATCCTAATCGTGGTGCTATGCGTGTCGTTTAGCAGGCAC
E1_99659_KJ451624.1        GTCGCTGTTGCAGCACTGATCCTAATCGTGGTGCTATGCGTGTCGTTTAGCAGGCAC
E1_IbH35_HM045786.1        GTTGCTGTTGCTGCCTTAATTTTAATTGTGGTGCTATGCGTGTCGTTTAGCAGGCAC
                           ** ******** **. *.**  **** ******************** *********
```

Hình 15 (Tiếp)

CLUSTAL 0 (1.2.1) các sắp xếp trình tự khác nhau

```
E1_IbH35_HM045786.1       YEHVTVIPNTVGVPYKTLVNRPGYSPMVLEMELQSVTLEPTLSLDYITCEYKTVIPSPYV
E1_S27_NC004162.2         YEHVTVIPNTVGVPYKTLVNRPGYSPMVLEMELLSVTLEPTLSLDYITCEYKTVIPSPYV
E1_SL15649_GUI89061.1     YEHVTVIPNTVGVPYKTLVNRPGYSPMVLEMELLSVTLEPTLSLDYITCEYKTVIPSPYV
E1_LR2006_KT449801.1      YEHVTVIPNTVGVPYKTLVNRPGYSPMVLEMELLSVTLEPTLSLDYITCEYKTVIPSPYV
E1_99659_KJ451624.1       YEHVTVIPNTVGVPYKTLVNRPGYSPMVLEMELLSVTLEPTLSLDYITCEYKTVIPSPYV
E1_181/25_L37661.3        YEHVTVIPNTVGVPYKTLVNRPGYSPMVLEMELLSVTLEPTLSLDYITCEYKTVIPSPYV
                          ********************************* ************************

E1_IbH35_HM045786.1       KCCGTAECKDKSLPDYSCKVFTGVYPFMWGGAYCFCDAENTQLSEAHVEKSESCKTEFAS
E1_S27_NC004162.2         KCCGTAECKDKNLPDYSCKVFTGVYPFMWGGAYCFCDAENTQLSEAHVEKSESCKTEFAS
E1_SL15649_GUI89061.1     KCCGTAECKDKNLPDYSCKVFTGVYPFMWGGAYCFCDAENTQLSEAHVEKSESCKTEFAS
E1_LR2006_KT449801.1      KCCGTAECKDKNLPDYSCKVFTGVYPFMWGGAYCFCDAENTQLSEAHVEKSESCKTEFAS
E1_99659_KJ451624.1       KCCGTAECKDKSLPDYSCKVFTGVYPFMWGGAYCFCDTENTQLSEAHVEKSESCKTEFAS
E1_181/25_L37661.3        KCCGTAECKDKSLPDYSCKVFTGVYPFMWGGAYCFCDTENTQLSEAHVEKSESCKTEFAS
                          ***********.*************************:**********************

E1_IbH35_HM045786.1       AYRAHTASASAKLRVLYQGNNITVAAYANGDHAVTVKDAKFVVGPMSSAWTPFDNKIVVY
E1_S27_NC004162.2         AYRAHTASASAKLRVLYQGNNITVTAYANGDHAVTVKDAKFIVGPMSSAWTPFDNKIVVY
E1_SL15649_GUI89061.1     AYRAHTASASAKLRVLYQGNNITVTAYANGDHAVTVKDAKFIVGPMSSAWTPFDNKIVVY
E1_LR2006_KT449801.1      AYRAHTASASAKLRVLYQGNNITVTAYANGDHAVTVKDAKFIVGPMSSAWTPFDNKIVVY
E1_99659_KJ451624.1       AYRAHTASASAKLRVLYQGNNITVAAYANGDHAVTVKDAKFIVGPMSSAWTPFDNKIVVY
E1_181/25_L37661.3        AYRAHTASASAKLRVLYQGNNVTVSAYANGDHAVTVKDAKFIVGPMSSAWTPFDNKIVVY
                          **********************:**:****************:******************

E1_IbH35_HM045786.1       KGDVYNMDYPPFGAGRPGQFGDIQSRTPESKDVYANTQLVLQRPAAGTVHVPYSQAPSGF
E1_S27_NC004162.2         KGDVYNMDYPPFGAGRPGQFGDIQSRTPESKDVYANTQLVLQRPAAGTVHVPYSQAPSGF
E1_SL15649_GUI89061.1     KGDVYNMDYPPFGAGRPGQFGDIQSRTPESKDVYANTQLVLQRPAAGTVHVPYSQAPSGF
E1_LR2006_KT449801.1      KGDVYNMDYPPFGAGRPGQFGDIQSRTPESKDVYANTQLVLQRPAVGTVHVPYSQAPSGF
E1_99659_KJ451624.1       KGDVYNMDYPPFGAGRPGQFGDIQSRTPESEDVYANTQLVLQRPSAGTVHVPYSQAPSGF
E1_181/25_L37661.3        KGDVYNMDYPPFGAGRPGQFGDIQSRTPESEDVYANTQLVLQRPSAGTVHVPYSQAPSGF
                          ****************************:*************:.**************
```

Hình 15 (Tiếp)

```
E1_IbH35_HM045786.1       KYWLKERGASLQHTAPFGCQIATNPVRAVNCAVGNIPISIDIPDAAFTRVVDAPSVTDMS
E1_S27_NC004162.2         KYWLKERGASLQHTAPFGCQIATNPVRAMNCAVGNMPISIDIPDAAFTRVVDAPSLTDMS
E1_SL15649_GUI89061.1     KYWLKERGASLQHTAPFGCQIATNPVRAVNCAVGNMPISIDIPEAAFTRVVDAPSLTDMS
E1_LR2006_KT449801.1      KYWLKERGASLQHTAPFGCQIATNPVRAVNCAVGNMPISIDIPEAAFTRVVDAPSLTDMS
E1_99659_KJ451624.1       KYWLKERGASLQHTAPFGCQIATNPVRAMNCAVGNMPISIDIPDAAFTRVVDAPSLTDMS
E1_181/25_L37661.3        KYWLKERGASLQHTAPFGCQIATNPVRAMNCAVGNMPISIDIPDAAFTRVVDAPSLTDMS
                          ****************************:******:*******:***********:****

E1_IbH35_HM045786.1       CEVPACTHSSDFGGVAIIKYTASKKGKCAVHSMTNAVTIREADVEVEGNSQLQISFSTAL
E1_S27_NC004162.2         CEVPACTHSSDFGGVAIIKYAVSKKGKCAVHSMTNAVTIREAEIEVEGNSQLQISFSTAL
E1_SL15649_GUI89061.1     CEVLACTHSSDFGGVAIIKYAASKKGKCAVHSMTNAVTIREAEIEVEGNSQLQISFSTAL
E1_LR2006_KT449801.1      CEVPACTHSSDFGGVAIIKYAASKKGKCAVHSMTNAVTIREAEIEVEGNSQLQISFSTAL
E1_99659_KJ451624.1       CEVSACTHSSDFGGVAIIKYAASKKGKCAVHSMTNAVTIREAEIEVEGNSQLQISFSTAL
E1_181/25_L37661.3        CEVPACTHSSDFGGVAIIKYAASKKGKCAVHSMTNAVTIREAEIEVEGNSQLQISFSTAL
                          *** ****************:.*********************::***************

E1_IbH35_HM045786.1       ASAEFRVQVCSTQVHCAAACHPPKDHIVNYPASHTTLGVQDISTTAMSWVQKITGGVGLI
E1_S27_NC004162.2         ASAEFRVQVCSTQVHCAAECHPPKDHIVNYPASHTTLGVQDISATAMSWVQKITGGVGLV
E1_SL15649_GUI89061.1     ASAEFRVQVCSTQVHCAAECHPPKDHIVNYPASHTTLGVQDISATAMSWVQKITGGVGLV
E1_LR2006_KT449801.1      ASAEFRVQVCSTQVHCAAECHPPKDHIVNYPASHTTLGVQDISATAMSWVQKITGGVGLV
E1_99659_KJ451624.1       ASAEFRVQVCSTQVHCAAECHPPKDHIVNYPASHTTLGVQDISATAMSWVQKITGGVGLV
E1_181/25_L37661.3        ASAEFRVQVCSTQVHCAAECHPPKDHIVNYPASHTTLGVQDISVTAMSWVQKITGGVGLV
                          ****************** ************************.***************:

E1_IbH35_HM045786.1       VAVAALILIVVLCVSFSRH
E1_S27_NC004162.2         VAVAALILIVVLCVSFSRH
E1_SL15649_GUI89061.1     VAVAALILIVVLCVSFSRH
E1_LR2006_KT449801.1      VAVAALILIVVLCVSFSRH
E1_99659_KJ451624.1       VAVAALILIVVLCVSFSRH
E1_181/25_L37661.3        VAVAALILIVVLCVSFSRH
                          ******************
```

Hình 15 (Tiếp)

CLUSTAL 0 (1.2.1) các sắp xếp trình tự khác nhau

```
E2_181/25_L37661.3          AGTATTAAGGACAACTTCAATGTCTATAAAGCCATAAGACCGTACCTAGCTCACTGTCCC
E2_IbH35_HM045786.1         AGTACTAAGGACAATTTTAATGTCTATAAAGCTACAAGACCATATCTAGCTCATTGTCCT
E2_LR2006_KT449801.1        AGCACCAAGGACAACTTCAATGTCTATAAAGCCACAAGACCATACTTAGCTCACTGTCCC
E2_SL15649_GU189061.1       AGCACCAAGGACAACTTCAATGTCTATAAAGCCACAAGACCATACTTAGCTCACTGTCCC
E2_S27_NC004162.2           AGCACCAAGGACAACTTCAATGTCTATAAAGCCACAAGACCATACCTAGCTCACTGTCCC
E2_99659_KJ451624.1         AGTATTAAGGACCACTTCAATGTCTATAAAGCCACAAGACCGTACCTAGCTCACTGTCCC
                            ** *  ******.* ** ************** * ******.**  ******* *****

E2_181/25_L37661.3          GACTGTGGAGAAGGGCACTCGTGCCATAGTCCCGTAGCGCTAGAACGCATCAGAAACGAA
E2_IbH35_HM045786.1         GACTGCGGAGAAGGGCATTCGTGCCACAGCCCTATCGCATTGGAGCGCATCAGAAATGAA
E2_LR2006_KT449801.1        GACTGTGGAGAAGGGCACTCGTGCCATAGTCCCGTAGCACTAGAACGCATCAGAAATGAA
E2_SL15649_GU189061.1       GACTGTGGAGAAGGGCACTCGTGCCATAGTCCCGTAGCACTAGAACGCATCAGAAATGAA
E2_S27_NC004162.2           GACTGTGGAGAAGGGCACTCGTGCCATAGTCCCGTAGCACTAGAACGCATCAGAAATGAA
E2_99659_KJ451624.1         GACTGTGGAGAAGGGCACTCGTGCCATAGTCCCGTAGCGCTAGAACGCATCAGAAACGAA
                            ***** ********** ******** ** ** .*.**. *.**.********** ***

E2_181/25_L37661.3          GCGACAGACGGGACGCTGAAAATCCAGGTTTCCTTGCAAATCGGAATAAAGACGGATGAT
E2_IbH35_HM045786.1         GCAACGGACGGAACGCTGAAAATCCAGGTCTCTTTGCAGATCGGGATAAAGACAGATGAC
E2_LR2006_KT449801.1        GCGACAGACGGGACGCTGAAAATCCAGGTCTCCTTGCAAATCGGAATAAAGACGGATGAC
E2_SL15649_GU189061.1       GCGACAGACGGGACGCTGAAAATCCAGGTCTCCTTGCAAATCGGAATAAAGACGGACGAC
E2_S27_NC004162.2           GCGACAGACGGGACGCTGAAAATCCAGGTCTCCTTGCAAATTGGAATAGGGACGGATGAT
E2_99659_KJ451624.1         GCGACAGACGGGACGTTGAAAATCCAGGTTTCCTTGCAAATCGGAATAAAGACGGATGAT
                            **.**.*****.*** ************ ** *****.** **.***..***.** **

E2_181/25_L37661.3          AGCCATGATTGGACCAAGCTGCGTTACATGGACAATCATATGCCAGCAGACGCAGAGAGG
E2_IbH35_HM045786.1         AGCCACGATTGGACCAAGCTGCGCTATATGGATAGCCATACGCCAGCGGACGCGGAGCGA
E2_LR2006_KT449801.1        AGCCACGATTGGACCAAGCTGCGTTATATGGACAACCACATGCCAGCAGACGCAGAGAGG
E2_SL15649_GU189061.1       AGCCACGATTGGACCAAGCTGCGTTATATGGACAACCACATGCCAGCAGACGCAGAGAGG
E2_S27_NC004162.2           AGCCATGATTGGACCAAGCTGCGTTACATGGACAATCACATACCAGCAGACGCAGGGAGG
E2_99659_KJ451624.1         AGCCATGATTGGACCAAGCTGCGTTATATGGACAATCACATGCCAGCAGACGCAGAGCGG
                            ***** ****************** ** ***** *. ** * .*****.*****.*.*.*.
```

Hình 15 (Tiếp)

```
E2_181/25_L37661.3      GCCAGGCTATTTGTAAGAACGTCAGCACCGTGCACGATTACTGGAACAATGGGACACTTC
E2_IbH35_HM045786.1     GCCGGATTGCTTGTAAGGACTTCAGCACCGTGCACGATCACCGGGACCATGGGACACTTT
E2_LR2006_KT449801.1    GCCGGGCTATTTGTAAGAACATCAGCACCGTGTACGATTACTGGAACAATGGGACACTTC
E2_SL15649_GU189061.1   GCCGGGCTATTTGTAAGAACATCAGCACCGTGTACGATTACTGGAACAATGGGACACTTC
E2_S27_NC004162.2       GCCGGGCTATTTGTAAGAACATCAGCACCATGCACGATTACTGGAACAATGGGACACTTC
E2_99659_KJ451624.1     GCCGGGCTATTTGTAAGAACGTCAGCACCGTGCACGATTACTGGAACAATGGGACACTTC
                        ** .*. *. *******.** ********.** ***** ** **.**.**********

E2_181/25_L37661.3      ATCCTGGCCCGATGTCCGAAAGGAGAAACTCTGACGGTGGGATTCACTGACGGTAGGAAG
E2_IbH35_HM045786.1     ATTCTGGCCCGATGCCCGAAAGGAGAGACGCTGACAGTGGGATTTACGGACAGCAGAAAG
E2_LR2006_KT449801.1    ATCCTGGCCCGATGTCCAAAAGGGGAAACTCTGACGGTGGGATTCACTGACAGTAGGAAG
E2_SL15649_GU189061.1   ATCCTGGCCCGATGTCCAAAAGGGGAAACTCTGACGGTGGGATTCACTGACAGTAGGAAG
E2_S27_NC004162.2       ATCCTGGCCCGATGTCCGAAAGGAGAAACTCTGACGGTGGGATTCACTGACAGTAGGAAG
E2_99659_KJ451624.1     ATTCTGGCCCGATGTCCGAAAGGAGAAACTCTGACGGCGGGGTTCACTGACGGTAGGAAG
                        ** ** ******** **.*****.**.** *****.* ***.** ** ***.* **.***

E2_181/25_L37661.3      ATCAGTCACTCATGTACGCACCCATTTCACCACGACCCTCCTGTGATAGGCCGGGAAAAA
E2_IbH35_HM045786.1     ATCAGCCACACATGCACACACCCGTTCCATCATGAACCACCTGTGATAGGTAGGGAGAGG
E2_LR2006_KT449801.1    ATTAGTCACTCATGTACGCACCCATTTCACCACGACCCTCCTGTGATAGGTCGGGAAAAA
E2_SL15649_GU189061.1   ATTAGTCATTCATGTACGCACCCATTTCACCACGACCCTCCTGTGATAGGTCGGGAAAAA
E2_S27_NC004162.2       ATTAGTCACTCATGTACGCACCCATTTCACCACGACCCTCCTGTGATAGGCCGGGAAAAA
E2_99659_KJ451624.1     ATCAGTCACTCATGTACGCACCCATTTCACCATGACCCTCCTGTGATAGGCCGGGAAAAA
                        ** ** ** :**** **.*****.** ** ** **.**:********** .****.*..

E2_181/25_L37661.3      TTTCATTCCCGACCGCAGCACGGTAGAGAACTACCTTGCAGCACGTACGCGCAGAGCACC
E2_IbH35_HM045786.1     TTCCACTCTCGACCACAACATGGTAAAGAGTTACCTTGCAGCACGTACGTGCAGAGCACC
E2_LR2006_KT449801.1    TTCCATTCCCGACCGCAGCACGGTAAAGAGCTACCTTGCAGCACGTACGTGCAGAGCACC
E2_SL15649_GU189061.1   TTCCATTCCCGACCGCAGCACGGTAAAGAGCTACCTTGCAGCACGTACGTGCAGAGCACC
E2_S27_NC004162.2       TTCCATTCCCGACCGCAGCACGGTAAAGAGCTACCTTGCAGCACGTACGTGCAGAGCAAC
E2_99659_KJ451624.1     TTCCATTCCCGACCGCAGCACGGTAGGGAACTACCTTGCAGCACGTACGCGCAGAGCACC
                        ** ** ** *****.**.** ****..**. ****************** ********.*
```

Hình 15 (Tiếp)

```
E2_181/25_L37661.3      GCTGCAACTGCCGAGGAGATAGAGGTACATATGCCCCCAGACACCCCAGATCGCACATTG
E2_IbH35_HM045786.1     GCTGCCACTGCCGAGGAGATAGAGGTGCATATGCCCCCAGATACTCCTGACCGCACGCTG
E2_LR2006_KT449801.1    GCCGCAACTACCGAGGAGATAGAGGTACACATGCCCCCAGACACCCCTGATCGCACATTA
E2_SL15649_GU189061.1   GCCGCAACTACCGAGGAGATAGAGGTACACATGCCCCCAGACACCCCTGATCGCACATTA
E2_S27_NC004162.2       GCCGCAACTGCCGAGGAGATAGAGGTACACATGCCCCCAGACACCCCTGATCGCACATTG
E2_99659_KJ451624.1     GCTGCAACTGCCGAGGAGATAGAGGTACACATGCCCCCAGACACCCCAGATCGCACATTA
                        ** **.***.****************.** ********** ** **:** *****. *.

E2_181/25_L37661.3      ATGTCACAACAGTCCGGTAATGTAAAGATCACAGTCAATAGTCAGACGGTGCGGTACAAG
E2_IbH35_HM045786.1     ATGACGCAGCAGTCTGGCAACGTGAAGATCACAGTTAATGGGCAGACGGTGCGGTACAAG
E2_LR2006_KT449801.1    ATGTCACAACAGTCCGGCAACGTAAAGATCACAGTCAATGGCCAGACGGTGCGGTACAAG
E2_SL15649_GU189061.1   ATGTCACAACAGTCCGGCAACGTAAAGATCACAGTCAATGGCCAGACGGTGCGGTACAAG
E2_S27_NC004162.2       CTGTCACAACAGTCCGGCAACGTAAAGATCACAGTCAATAGTCAGACGGTGCGGTATAAG
E2_99659_KJ451624.1     ATGTCACAACAGTCCGGCAATGTAAAGATCACAGTCAATAGTCAGACGGTGCGGTACAAG
                        .**:*.**.***** ** ** **.********** ***.* ************** ***

E2_181/25_L37661.3      TGTAATTGCGGTGACTCAAATGAAGGACTAACCACTACAGACAAAGTGATTAATAACTGC
E2_IbH35_HM045786.1     TGCAACTGCGGCGGCTCAAACGAGGGACTGACAACCACAGACAAAGTGATCAATAACTGC
E2_LR2006_KT449801.1    TGTAATTGCGGTGGCTCAAATGAAGGACTAACAACTACAGACAAAGTGATTAATAACTGC
E2_SL15649_GU189061.1   TGTAATTGCGGTGGCTCAAATGAAGGACTAACAACTACAGACAAAGTGATTAATAACTGC
E2_S27_NC004162.2       TGTAATTGCGGTGGCTCAAATGAAGGACTAATAACTACAGATAAAGTGATTAATAACTGC
E2_99659_KJ451624.1     TGCAATTGTGGTGACTCAAGTGAAGGATTAACCACTACAGATAAAGTGATTAATAACTGC
                        ** ** ** ** *.*****. **.*** *.* .** ***** ******** *********

E2_181/25_L37661.3      AAGGTTGATCAATGCCATGCCGCGGTCACCAATCACAAAAAATGGCAGTATAATTCCCCT
E2_IbH35_HM045786.1     AAAATTGATCAGTGCCATGCTGCAGTCACTAATCACAAGAAGTGGCAATACAACTCCCCT
E2_LR2006_KT449801.1    AAGGTTGATCAATGTCATGCCGCGGTCACCAATCACAAAAAGTGGCAGTATAACTCCCCT
E2_SL15649_GU189061.1   AAGGTTGATCAATGTCATGCCGCGGTCACCAATCACAAAAAGTGGCAGTATAACTCCCCT
E2_S27_NC004162.2       AAGGTTGATCAATGTCATGCCGCGGTCACCAATCACAAAAAGTGGCAGTATAACTCCCCT
E2_99659_KJ451624.1     AAGGTCGATCAATGCCATGCCGCGGTCACCAATCACAAAAAATGGCAGTATAATTCCCCT
                        **..* *****.** ***** **.***** ********.**.*****.** ** ******
```

Hình 15 (Tiếp)

```
E2_181/25_L37661.3      CTGGTCCCGCGTAATGCTGAACTCGGGGACCGAAAAGGAAAAGTTCACATTCCGTTTCCT
E2_IbH35_HM045786.1     TTAGTCCCGCGTAACGCTGAACTCGGGGACCGTAAAGGAAAGATTCACATCCCATTCCCA
E2_LR2006_KT449801.1    CTGGTCCCGCGTAATGCTGAACTTGGGGACCGAAAAGGAAAAATTCACATCCCGTTTCCG
E2_SL15649_GU189061.1   CTGGTCCCGCGTAATGCTGAACTTGGGGACCGAAAAGGAAAAATTCACATCCCGTTTCCG
E2_S27_NC004162.2       CTGGTCCCGCGTAACGCTGAACTCGGGGACCGAAAAGGAAAAATTCACATCCCGTTTCCG
E2_99659_KJ451624.1     CTGGTCCCGCGTAATGCTGAATTCGGGGACCGGAAAGGAAAAGTTCACATTCCATTTCCT
                         *.********** ****** * ******** ********..******* **.** **

E2_181/25_L37661.3      CTGGCAAATGTGACATGCAGGGTGCCTAAGGCAAGGAACCCCACCGTGACGTACGGAAAA
E2_IbH35_HM045786.1     TTGGCAAACGTGACTTGCAGAGTGCCAAAAGCAAGAAACCCCACAGTAACGTACGGAAAA
E2_LR2006_KT449801.1    CTGGCAAATGTAACATGCAGGGTGCCTAAAGCAAGGAACCCCACCGTGACGTACGGGAAA
E2_SL15649_GU189061.1   CTGGCAAATGTAACATGCAGGGTGCCTAAAGCAAGGAACCCCACCGTGACGTACGGGAAA
E2_S27_NC004162.2       CTGGCAAATGTAACATGCATGGTGCCTAAAGCAAGGAACCCCACCGTGACGTACGGGAAA
E2_99659_KJ451624.1     CTGGCAAATGTGACATGCAGGGTGCCTAAAGCAAGAAACCCCACCGTGACGTACGGAAAA
                         ******* **.**:**** .*****:**.*****.********.**.********.***

E2_181/25_L37661.3      AACCAAGTCATCATGCTGCTGTATCCTGACCACCCAACGCTCCTGTCCTACCGGAATATG
E2_IbH35_HM045786.1     AACCAAGTCACCATGCTGCTGTATCCTGACCATCCGACACTCTTGTCTTATCGTAACATG
E2_LR2006_KT449801.1    AACCAAGTCATCATGCTACTGTATCCTGACCACCCAACACTCCTGTCCTACCGGAATATG
E2_SL15649_GU189061.1   AACCAAGTCATCATGCTACTGTATCCTGACCACCCAACACTCCTGTCCTACCGGAATATG
E2_S27_NC004162.2       AACCAAGTCATCATGCTACTGTATCCTGACCACCCAACACTCCTGTCCTACCGGAGTATG
E2_99659_KJ451624.1     AACCAAGTCATCATGTTGCTGTATCCTGACCACCCAACGCTCCTGTCCTACAGGAATATG
                        ********** **** *.************** **.**.*** **** ** .* *. ***

E2_181/25_L37661.3      GGAGAAGAACCAAACTATCAAGAAGAGTGGGTGACGCATAAGAAGGAGATCAGGTTAACC
E2_IbH35_HM045786.1     GGACAGGAACCAAATTACCACGAGGAGTGGGTGACACACAAGAAGGAGGTTACCTTGACC
E2_LR2006_KT449801.1    GGAGAAGAACCAAACTATCAAGAAGAGTGGGTGATGCATAAGAAGGAAGTCGTGCTAACC
E2_SL15649_GU189061.1   GGAGAAGAACCAAACTATCAAGAAGAGTGGGTGATGCATAAGAAGGAAGTCGTGCTAACC
E2_S27_NC004162.2       GGAGAAGAACCAAACTATCAAGAAGAGTGGGTGACGCACAAGAAGGAGGTCGTGCTAACC
E2_99659_KJ451624.1     GGAGAAGAACCAAACTATCAAGAAGAGTGGGTGACGCATAAGAAGGAGATCAGGTTAACC
                        *** *.******** ** **.**.********** .** ********..* .   *.***
```

Hình 15 (Tiếp)

```
E2_181/25_L37661.3      GTGCCGACTGAAGGGCTCGAGGTCACGTGGGGCAACAACGAGCCGTACAAGTATTGGCCG
E2_IbH35_HM045786.1     GTGCCTACTGAGGGTCTCGAGGTCACTTGGGGCAACAACGAACCATACAAGTACTGGCCG
E2_LR2006_KT449801.1    GTGCCGACTGAAGGGCTCGAGGTCACGTGGGGCAACAACGAGCCGTATAAGTATTGGCCG
E2_SL15649_GU189061.1   GTGCCGACTGAAGGGCTCGAGGTCACGTGGGGCAACAACGAGCCGTATAAGTATTGGCCG
E2_S27_NC004162.2       GTGCCGACTGAAGGGCTCGAGGTTACGTGGGGCAACAACGAGCCGTATAAGTATTGGCCG
E2_99659_KJ451624.1     GTGCCGACTGAGGGGCTCGAGGTCACGTGGGGTAACAATGAGCCGTACAAGTATTGGCCG
                        ***** *****.** ** ***** ** ***** ***** **.**.** ***** ******

E2_181/25_L37661.3      CAGTTATCCACAAACGGTACAGCCCACGGCCACCCGCATGAGATAATTTTGTATTATTAT
E2_IbH35_HM045786.1     CAGATGTCTACGAACGGTACTGCTCATGGTCACCCACATGAGATAATCTTGTACTATTAT
E2_LR2006_KT449801.1    CAGTTATCTACAAACGGTACAGCCCATGGCCACCCGCATGAGATAATTCTGTATTATTAT
E2_SL15649_GU189061.1   CAGTTATCTACAAACGGTACAGCCCATGGCCACCCGCATGAGATAATTCTGTATTATTAT
E2_S27_NC004162.2       CAGTTATCTGCAAACGGTACAGCCCACGGCCACCCGCATGAGATAATCTTGTACTATTAT
E2_99659_KJ451624.1     CAGTTATCCACAAACGGTACAGCCCACGGCCACCCGCATGAGATAATTCTGTATTATTAT
                        ***:*.** .*.********:** ** ** *****.**********  **** ******

E2_181/25_L37661.3      GAGCTGTACCCTACTATGACTGTGGTAGTTGTGTCAGTGGCCTCGTTCGTACTCCTGTCG
E2_IbH35_HM045786.1     GAGCTGTACCCCACTATGACTGTAATCATTGTGTCGGTGGCCTCGTTCGTGCTTCTGTCG
E2_LR2006_KT449801.1    GAGCTGTACCCCACTATGACTGTAGTAGTTGTGTCAGTGGCCACGTTCATACTCCTGTCG
E2_SL15649_GU189061.1   GAGCTGTACCCTACTATGACTGTAGTAGTTGTGTCAGTGGCCACGTTCATACTCCTGTCG
E2_S27_NC004162.2       GAGCTGTACCCTACTATGACTGTAGTAGTTGTGTCAGTGGCCTCGTTCATACTCCTGTCG
E2_99659_KJ451624.1     GAGCTGTACCCAACTATGACTGCGGTAGTTTTGTCAGTGGCCTCGTTCATACTCCTGTCG
                        ********** ********** ..*..** ****.******:*****.*.** ******

E2_181/25_L37661.3      ATGGTGGGTGTGGCAGTGGGGATGTGCATGTGTGCACGACGCAGATGCATTACACCGTAC
E2_IbH35_HM045786.1     ATGGTGGGCACAGCAGTGGGGATGTGTGTGTGCGCACGGCGCAGATGCATTACACCATAT
E2_LR2006_KT449801.1    ATGGTGGGTATGGCAGCGGGGATGTGCATGTGTGCACGACGCAGATGCATCACACCGTAT
E2_SL15649_GU189061.1   ATGGTGGGTATGGCAGTGGGGATGTGCATGTGTGCACGACGCAGATGCATCACACCGTAT
E2_S27_NC004162.2       ATGGTGGGTATGGCAGTGGGGATGTGCATGTGTGCACGACGCAGATGCATCACACCATAC
E2_99659_KJ451624.1     ATGGTGGGTGTGGCAGTGGGGATGTGCATGTGTGCACGACGCAGATGCATTACACCGTAC
                        ******** . .**** ********* .**** *****.********** *****.**
```

Hình 15 (Tiếp)

```
E2_181/25_L37661.3          GAACTGACACCAGGAGCTACCGTCCCTTTCCTGCTTAGCCTAATATGCTGCATTAGAACA
E2_IbH35_HM045786.1         GAATTAACACCAGGAGCCACCGTTCCCTTTCTGCTCAGCCTGCTATGTTGCGTCAGAACG
E2_LR2006_KT449801.1        GAACTGACACCAGGAGCTACCGTCCCTTTCCTGCTTAGCCTAATATGCTGCATCAGAACA
E2_SL15649_GU189061.1       GAACTGACACCAGGAGCTACCGTCCCTTTCCTGCTTAGCCTAATATGCTGCATCAGAACA
E2_S27_NC004162.2           GAACTGACACCAGGAGCTACCGTCCCTTTCCTGCTTAGCCTAATATGCTGCATCAGAACA
E2_99659_KJ451624.1         GAACTGACACCAGGAGCTACCGTCCCTTTCCTGCTTAGCCTAATATGCTGCATTAGAACA
                            *** *.*********** ***** ** ** ***** *****..**** ***.* *****.

E2_181/25_L37661.3          GCTAAAGCG
E2_IbH35_HM045786.1         ACCAAGGCG
E2_LR2006_KT449801.1        GCTAAAGCG
E2_SL15649_GU189061.1       GCTAAAGCG
E2_S27_NC004162.2           GCTAAAGCG
E2_99659_KJ451624.1         GCTAAAGCG
                            .* **.***
```

Hình 15 (Tiếp)

CLUSTAL 0 (1.2.1) các sắp xếp trình tự khác nhau

```
E2_IbH35_HM045786.1       STKDNFNVYKATRPYLAHCPDCGEGHSCHSPIALERIRNEATDGTLKIQVSLQIGIKTDD
E2_99659_KJ451624.1       SIKDHFNVYKATRPYLAHCPDCGEGHSCHSPVALERIRNEATDGTLKIQVSLQIGIKTDD
E2_181/25_L37661.3        SIKDNFNVYKAIRPYLAHCPDCGEGHSCHSPVALERIRNEATDGTLKIQVSLQIGIKTDD
E2_S27_NC004162.2         STKDNFNVYKATRPYLAHCPDCGEGHSCHSPVALERIRNEATDGTLKIQVSLQIGIGTDD
E2_SL15649_GU189061.1     STKDNFNVYKATRPYLAHCPDCGEGHSCHSPVALERIRNEATDGTLKIQVSLQIGIKTDD
E2_LR2006_KT449801.1      STKDNFNVYKATRPYLAHCPDCGEGHSCHSPVALERIRNEATDGTLKIQVSLQIGIKTDD
                          * **.****** ********************:********************** ***

E2_IbH35_HM045786.1       SHDWTKLRYMDSHTPADAERAGLLVRTSAPCTITGTMGHFILARCPKGETLTVGFTDSRK
E2_99659_KJ451624.1       SHDWTKLRYMDNHMPADAERAGLFVRTSAPCTITGTMGHFILARCPKGETLTAGFTDGRK
E2_181/25_L37661.3        SHDWTKLRYMDNHMPADAERARLFVRTSAPCTITGTMGHFILARCPKGETLTVGFTDGRK
E2_S27_NC004162.2         SHDWTKLRYMDNHIPADAGRAGLFVRTSAPCTITGTMGHFILARCPKGETLTVGFTDSRK
E2_SL15649_GU189061.1     SHDWTKLRYMDNHMPADAERAGLFVRTSAPCTITGTMGHFILARCPKGETLTVGFTDSRK
E2_LR2006_KT449801.1      SHDWTKLRYMDNHMPADAERAGLFVRTSAPCTITGTMGHFILARCPKGETLTVGFTDSRK
                          ***********.* **** ** *:*****************************.****.**

E2_IbH35_HM045786.1       ISHTCTHPFHHEPPVIGRERFHSRPQHGKELPCSTYVQSTAATAEEIEVHMPPDTPDRTL
E2_99659_KJ451624.1       ISHSCTHPFHHDPPVIGREKFHSRPQHGRELPCSTYAQSTAATAEEIEVHMPPDTPDRTL
E2_181/25_L37661.3        ISHSCTHPFHHDPPVIGREKFHSRPQHGRELPCSTYAQSTAATAEEIEVHMPPDTPDRTL
E2_S27_NC004162.2         ISHSCTHPFHHDPPVIGREKFHSRPQHGRELPCSTYVQSNAATAEEIEVHMPPDTPDRTL
E2_SL15649_GU189061.1     ISHSCTHPFHHDPPVIGREKFHSRPQHGRELPCSTYVQSTAATTEEIEVHMPPDTPDRTL
E2_LR2006_KT449801.1      ISHSCTHPFHHDPPVIGREKFHSRPQHGKELPCSTYVQSTAATTEEIEVHMPPDTPDRTL
                          ***:*******:*******:********:*******.**.***:****************

E2_IbH35_HM045786.1       MTQQSGNVKITVNGQTVRYKCNCGGSNEGLTTTDKVINNCKIDQCHAAVTNHKKWQYNSP
E2_99659_KJ451624.1       MSQQSGNVKITVNSQTVRYKCNCGGSSEGLTTTDKVINNCKVDQCHAAVTNHKKWQYNSP
E2_181/25_L37661.3        MSQQSGNVKITVNSQTVRYKCNCGDSNEGLTTTDKVINNCKVDQCHAAVTNHKKWQYNSP
E2_S27_NC004162.2         LSQQSGNVKITVNSQTVRYKCNCGGSNEGLTTTDKVINNCKVDQCHAAVTNHKKWQYNSP
E2_SL15649_GU189061.1     MSQQSGNVKITVNGQTVRYKCNCGGSNEGLTTTDKVINNCKVDQCHAAVTNHKKWQYNSP
E2_LR2006_KT449801.1      MSQQSGNVKITVNGQTVRYKCNCGGSNEGLTTTDKVINNCKVDQCHAAVTNHKKWQYNSP
                          ::***********.********** *.*** **********:******************
```

Hình 15 (Tiếp)

```
E2_IbH35_HM045786.1         LVPRNAELGDRKGKIHIPFPLANVTCRVPKARNPTVTYGKNQVTMLLYPDHPTLLSYRNM
E2_99659_KJ451624.1         LVPRNAEFGDRKGKVHIPFPLANVTCRVPKARNPTVTYGKNQVIMLLYPDHPTLLSYRNM
E2_181/25_L37661.3          LVPRNAELGDRKGKVHIPFPLANVTCRVPKARNPTVTYGKNQVTMLLYPDHPTLLSYRNM
E2_S27_NC004162.2           LVPRNAELGDRKGKIHIPFPLANVTCMVPKARNPTVTYGKNQVTMLLYPDHPTLLSYRSM
E2_SL15649_GU189061.1       LVPRNAELGDRKGKIHIPFPLANVTCRVPKARNPTVTYGKNQVTMLLYPDHPTLLSYRNM
E2_LR2006_KT449801.1        LVPRNAELGDRKGKIHIPFPLANVTCRVPKARNPTVTYGKNQVTMLLYPDHPTLLSYRNM
                            *******:******:********** ********************** ********.*

E2_IbH35_HM045786.1         GQEPNYHEEWVTHKKEVTLTVPTEGLEVTWGNNEPYKYWPQMSTNGTAHGHPHEIILYYY
E2_99659_KJ451624.1         GEEPNYQEEWVTHKKEIRLTVPTEGLEVTWGNNEPYKYWPQLSTNGTAHGHPHEIILYYY
E2_181/25_L37661.3          GEEPNYQEEWVTHKKEIRLTVPTEGLEVTWGNNEPYKYWPQLSTNGTAHGHPHEIILYYY
E2_S27_NC004162.2           GEEPNYQEEWVTHKKEVVLTVPTEGLEVTWGNNEPYKYWPQLSANGTAHGHPHEIILYYY
E2_SL15649_GU189061.1       GEEPNYQEEWVMHKKEVVLTVPTEGLEVTWGNNEPYKYWPQLSTNGTAHGHPHEIILYYY
E2_LR2006_KT449801.1        GEEPNYQEEWVMHKKEVVLTVPTEGLEVTWGNNEPYKYWPQLSTNGTAHGHPHEIILYYY
                            *:****:**** ****: ************************:*:**************

E2_IbH35_HM045786.1         ELYPTMTVIIVSVASFVLLSMVGTAVGMCVCARRRCITPYELTPGATVPFLLSLLCCVRT
E2_99659_KJ451624.1         ELYPTMTAVVLSVASFILLSMVGVAVGMCMCARRRCITPYELTPGATVPFLLSLICCIRT
E2_181/25_L37661.3          ELYPTMTVVVVSVASFVLLSMVGVAVGMCMCARRRCITPYELTPGATVPFLLSLICCIRT
E2_S27_NC004162.2           ELYPTMTVVVVSVASFILLSMVGMAVGMCMCARRRCITPYELTPGATVPFLLSLICCIRT
E2_SL15649_GU189061.1       ELYPTMTVVVVSVATFILLSMVGMAVGMCMCARRRCITPYELTPGATVPFLLSLICCIRT
E2_LR2006_KT449801.1        ELYPTMTVVVVSVATFILLSMVGMAAGMCMCARRRCITPYELTPGATVPFLLSLICCIRT
                            *******.:::***:*:****** *.***:**************************:**:**

E2_IbH35_HM045786.1         TKA
E2_99659_KJ451624.1         AKA
E2_181/25_L37661.3          AKA
E2_S27_NC004162.2           AKA
E2_SL15649_GU189061.1       AKA
E2_LR2006_KT449801.1        AKA
                            :**
```

Hình 15 (Tiếp)