



(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)



1-0023422

(51)⁷ A61K 39/145

(13) B

(21) 1-2012-03594

(22) 09/02/2011

(86) PCT/SG2011/000059 09/02/2011

(87) WO2011/136738 03/11/2011

(30) 61/329,802 30/04/2010 US

(45) 27/04/2020 385

(43) 25/02/2013 299A

(73) TEMASEK LIFE SCIENCES LABORATORY LIMITED (SG)

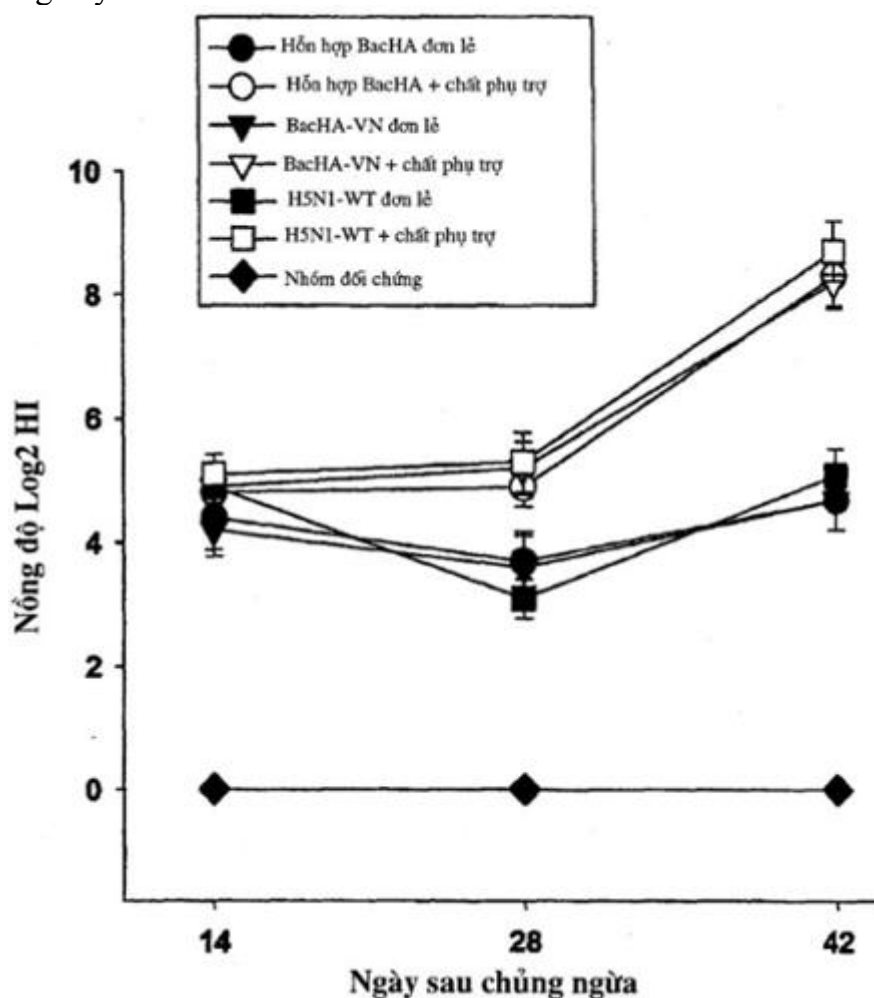
1 Research Link, National University of Singapore, Singapore 117604, Singapore

(72) MOOKKAN, Prabakaran (IN); HE, Fang (CN); KWANG, Hwei-Sing, Jimmy (US)

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

(54) CHẾ PHẨM VACXIN ĐA TRỊ H5N1

(57) Sáng chế đề cập đến vaccin đa trị H5N1. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến phương pháp nhận diện ba chủng H5N1 bao gồm toàn bộ các biến thể trong epitop trung hòa của ngưng kết tổ hồng cầu trong số hầu hết các dòng H5N1. Sáng chế còn đề cập đến vaccin đa trị H5N1 bao gồm ba chủng H5N1 hoặc bao gồm các peptit kháng nguyên của mỗi chủng trong số ba chủng này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến vaccin đa trị H5N1. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến phương pháp nhận diện 3 chủng H5N1 bao gồm toàn bộ các biến thể ở các epitop trung hòa của ngưng kết tổ hồng cầu trong số hầu hết các dòng H5N1. Sáng chế còn đề cập đến vaccin đa trị H5N1 bao gồm 3 chủng H5N1 này hoặc bao gồm các peptit kháng nguyên của mỗi chủng trong số ba chủng này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các công bố đơn và các tài liệu khác sử dụng trong bản mô tả này nhằm giải thích tình trạng kỹ thuật của sáng chế hoặc cung cấp các chi tiết bổ sung để thực hiện sáng chế được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn, và để cho thuận tiện chúng được liệt kê trong phần thư mục.

Virut cúm vượt qua hệ miễn dịch bằng cách biến đổi một cách ngẫu nhiên các yếu tố xác định kháng nguyên, như các epitop trung hòa chính, có mặt trong vùng đầu hình cầu của ngưng kết tổ hồng cầu. Khi bị lây nhiễm, đáp ứng của vật chủ được đặc trưng chủ yếu bởi việc tạo ra các kháng thể kháng lại các epitop trung hòa này, phong bế khả năng gắn kết của ngưng kết tổ hồng cầu trên virut với thụ thể tế bào đích. Tuy nhiên, các biến đổi axit amin đáng kể trong các epitop trung hòa của HA này làm xuất hiện virut cúm H5N1 khác biệt về mặt kháng nguyên. Trên thực tế, đã có báo cáo rằng các virut cúm mùa có khả năng trốn được tác động miễn dịch do vaccin ở quần thể người thông qua cơ chế trôi dạt kháng nguyên (antigen drift). Hơn nữa, đột biến ở một vài axit amin quan trọng trong vùng biến đổi HA1 cũng đủ để virut thoát khỏi đáp ứng kháng thể do vaccin. Các nỗ lực trước đây để xác định các đoạn thể axit amin trong trình tự HA của biến thể đã thoát khỏi quá trình trung hòa bởi kháng thể đơn dòng đã phát hiện ra các vị trí epitop trung hòa của HA (Kaverin et al., 2002; Kaverin et al., 2007).

Bản chất của virut cúm gây đột biến ngẫu nhiên và phát triển thêm nhiều loại mới mang các yếu tố xác định kháng nguyên khác nhau là một thách thức lớn trong việc kiểm soát bệnh lây nhiễm virut cúm (Plotkin et al., 2002). Điều này được minh chứng bởi dịch cúm gia cầm H5N1 và dịch cúm lợn H1N1 (H1N1 swine-origin influenza virut - S-OIV) bùng phát gần đây. Trên thực tế, các tài liệu có được đã chứng minh rằng khả năng gây nhiễm mô người mà H5N1 có được chủ yếu là do sự xuất hiện

của các thể đột biến (Ayora-Talavera et al., 2009). H5N1 cúm gia cầm độc lực cao (Highly pathogenic avian influenza - HPAI) có sự khác biệt về tính kháng nguyên do có sự khác nhau trong trình tự của ngưng kết tố hồng cầu (hemagglutinin - HA), yếu tố xác định chủ yếu của hệ miễn dịch đối với bệnh cúm, từ đó tạo ra các dòng hoặc các nhánh H5N1 khác nhau (Lam et al., 2008; WHO, 2005). Việc kiểm soát lây nhiễm bằng vaccin H5N1 hiện nay không đem lại hiệu quả kháng lại các chủng khác loại hoặc nhánh biến đổi sinh loài của H5N1 một phần là do sự thay đổi trong các trình tự HA này, đặc biệt là trong vùng epitop trung hòa. Do các vaccin hiện nay chỉ tạo ra kháng thể trung hòa kháng lại các epitop này, nên sự khác biệt trong các trình tự này có thể làm cho các vaccin hiện nay không đủ tác dụng để phòng ngừa dịch cúm trên toàn cầu. Trên thực tế, các vaccin H5N1 dự tuyển hiện nay vẫn tiếp tục có tác dụng kháng nguyên hiệu quả ở hầu hết các thể phân lập thuộc các nhánh tương ứng, tuy gần đây nhận thấy rằng một số virus trong các nhánh 1, 2.2 và 2.3 có tính không đồng nhất kháng nguyên.

Để khắc phục các hạn chế nêu trên và khai thác được đầy đủ tiềm năng của các vaccin này trên toàn cầu, gần đây đã có ý tưởng về việc tạo ra các vaccin đa trị dựa trên các protein virus bảo tồn. Protein kênh ion được bảo tồn ở mức cao (M2) hoặc nucleoprotein (NP) của virus cúm đã được đánh giá về khả năng tạo ra tính miễn dịch tế bào bảo vệ chéo và mức độ thanh thải virus (Wu et al., 2007; Chen and Subbarao, 2009). Một cách thức tương tự là dùng peptit dung hợp được bảo tồn của ngưng kết tố hồng cầu để ức chế quá trình dung hợp virus với màng tế bào vật chủ (Gerhard et al., 2006). Các kháng thể được tạo ra để kháng lại các protein bảo tồn này có thể làm giảm tốc độ lan truyền virus và thúc đẩy quá trình phục hồi khỏi bệnh cúm. Tuy nhiên, các kháng thể đặc hiệu với các protein này có tính miễn dịch yếu và dễ lây nhiễm. Do vậy, việc phát triển vaccin dựa trên ngưng kết tố hồng cầu của virus cúm là lựa chọn khả thi để phòng ngừa lây nhiễm HPAI như H5N1. Tuy nhiên, các biến đổi axit amin trong vùng epitop trung hòa kháng nguyên chính thuộc phân nhóm H5 đã hạn chế việc phát triển của các vaccin đa trị kháng lại các dòng H5N1 khác nhau như vậy.

Do đó, mong muốn phát triển được vaccin đa trị có tính miễn dịch bảo vệ kháng lại các dòng H5N1 khác nhau.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất vaccin đa trị H5N1. Cụ thể hơn, sáng chế đề xuất phương pháp nhận diện ba chủng H5N1 bao gồm toàn bộ các biến thể trong epitop trung hòa của ngưng kết tổ hồng cầu trong hầu hết các dòng H5N1. Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất vaccin đa trị H5N1 bao gồm ba chủng H5N1 này hoặc các peptit kháng nguyên của mỗi chủng trong số ba chủng này.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất vaccin đa trị H5N1 để phòng ngừa bệnh ở đối tượng, trong đó bệnh này do phân nhóm virus cúm gia cầm H5N1 gây ra. Theo một phương án, vaccin đa trị H5N1 này chứa lượng hữu hiệu có tác dụng phòng bệnh của chất gây miễn dịch thứ nhất, lượng hữu hiệu có tác dụng phòng bệnh của chất gây miễn dịch thứ hai và lượng hữu hiệu có tác dụng phòng bệnh của chất gây miễn dịch thứ ba. Theo phương án khác, mỗi chất gây miễn dịch bao gồm ngưng kết tổ hồng cầu hoặc phân kháng nguyên của nó hoặc axit nucleic mã hóa ngưng kết tổ hồng cầu này hoặc phân kháng nguyên của nó. Theo phương án bổ sung, phân kháng nguyên bao gồm epitop của ngưng kết tổ hồng cầu. Theo phương án khác, đối tượng có thể là người, động vật nuôi trong nhà (chó, mèo, khỉ, v.v.); vật nuôi (ngựa, bò, cừu, dê, lợn v.v.), các loại gia cầm hoang dã (ngỗng trời, vịt trời, v.v.) và các loại gia cầm nuôi trong nhà (gà, vịt, ngỗng, v.v.). Theo một phương án, chất gây miễn dịch là virus bao gồm ngưng kết tổ hồng cầu. Theo phương án khác, virus này được bất hoạt. Theo phương án bổ sung, virus này là virus đã suy yếu. Theo phương án khác, virus này ở dạng thể virus. Theo phương án khác, virus này có nguồn gốc từ trứng hoặc có nguồn gốc từ môi trường nuôi cấy tế bào. Theo phương án khác, chất gây miễn dịch là virus phân cắt bao gồm ngưng kết tổ hồng cầu hoặc chế phẩm kháng nguyên chứa virus phân cắt. Theo một phương án, chất gây miễn dịch là ngưng kết tổ hồng cầu hoặc phân kháng nguyên của nó. Theo phương án khác, ngưng kết tổ hồng cầu hoặc phân kháng nguyên của nó được phân lập. Theo phương án bổ sung, ngưng kết tổ hồng cầu hoặc phân kháng nguyên của nó được sản xuất bởi hệ biểu hiện. Theo một phương án, hệ biểu hiện này là hệ biểu hiện bất kỳ, như vector biểu hiện virus trong đó ngưng kết tổ hồng cầu hoặc phân kháng nguyên của nó có mặt hoặc biểu hiện trên bề mặt của virus này. Theo một phương án, vector biểu hiện virus là vector biểu hiện virus bất kỳ như vector biểu hiện virus gây bệnh đậu mùa đã cải biến, vector biểu hiện adenovirus, vector biểu hiện virus gây bệnh giang mai, vector biểu hiện baculovirus và các vector tương tự.

Theo một phương án, vector biểu hiện là vector biểu hiện baculovirut và virut này có mặt hoặc biểu hiện ngưng kết tổ hồng cầu hoặc phần kháng nguyên của nó là baculovirut. Theo phương án khác, chất gây miễn dịch là axit nucleic mã hóa ngưng kết tổ hồng cầu hoặc phần kháng nguyên của nó có khả năng biểu hiện trên đối tượng.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế mô tả phương pháp tạo ra tính miễn dịch bảo vệ cho virut cúm gia cầm bao gồm bước cho đối tượng dùng lượng hữu hiệu có tác dụng phòng bệnh của vaccin đa trị H5N1. Vaccin đa trị H5N1 này là như được mô tả trên đây.

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế mô tả phương pháp phòng ngừa hoặc điều trị bệnh do virut cúm gia cầm gây ra bao gồm bước cho đối tượng dùng lượng hữu hiệu có tác dụng phòng bệnh của vaccin đa trị H5N1. Vaccin đa trị H5N1 này là như được mô tả trên đây.

Theo khía cạnh thứ tư, sáng chế mô tả vaccin đa trị H5N1 dùng để kích thích đáp ứng miễn dịch đối với virut cúm gia cầm. Vaccin đa trị H5N1 này là như được mô tả trên đây.

Theo khía cạnh thứ năm, sáng chế mô tả vaccin đa trị H5N1 dùng để phòng ngừa bệnh do virut cúm gia cầm gây ra. Vaccin đa trị H5N1 này là như được mô tả trên đây.

Theo khía cạnh thứ sáu, sáng chế đề xuất vaccin đa trị H5N1 dùng để làm thuốc.

Theo khía cạnh thứ bảy, sáng chế đề xuất vaccin đa trị H5N1 dùng để điều biến đáp ứng miễn dịch ở đối tượng.

Theo khía cạnh thứ tám, sáng chế đề xuất vaccin đa trị H5N1 dùng để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh cúm gia cầm ở đối tượng.

Theo khía cạnh thứ chín, sáng chế mô tả vaccin đa trị H5N1 dùng để sản xuất thuốc điều biến đáp ứng miễn dịch ở đối tượng.

Theo khía cạnh thứ mười, sáng chế mô tả vaccin đa trị H5N1 dùng để sản xuất thuốc điều trị hoặc phòng ngừa bệnh cúm gia cầm ở đối tượng.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện nồng độ ức chế ngưng kết tổ hồng cầu trong huyết thanh. Các nhóm chuột nhắt được gây miễn dịch dưới da hai lần vào ngày 0 và 28 bằng Tri-BacHA (BacHA-mix) hoặc Mono-BacHA (A/Vietnam/1203/2004(H5N1)) của BacHA

(BacHA-VN) hoặc vacxin mang virus đã bất hoạt toàn bộ (WT-H5N1). Mỗi điểm được thể hiện bằng giá trị trung bình cộng ($n=10 \pm SD$).

Các Fig.2A và 2B thể hiện khả năng vi trung hòa huyết thanh nhánh chéo ở chuột nhắt. Các nhóm chuột nhắt được gây miễn dịch dưới da hai lần vào ngày 0 và 28 bằng 3 chủng BacHA (Tri-BacHA) hoặc chủng đơn (A/Vietnam/1203/2004(H5N1)) của BacHA (Mono-BacHA) hoặc vacxin mang virus H5N1 đã bất hoạt toàn bộ (WT-H5N1). Các virus này có nguồn gốc từ nhánh 1.0 (A/Vietnam/1203/2004(H5N1)), nhánh 2.1 (A/Indonesia/CDC1031/2007(H5N1)), nhánh 2.2 A/gà tây/gà tây1/05*(H5N1), nhánh 4.0 (nhánh 4.0 A/ngỗng/Guiyang/337/06(H5N1)), nhánh 7.0 (A/gà/Shanxi/2/06(H5N1)) và nhánh 8.0 (A/gà/Henan/12/04(H5N1)) được dùng để nghiên cứu. Các nhánh 1, 2.1 và 2.2 được thể hiện trong Fig. 2A, và các nhánh 4, 7 và 8 được thể hiện trong Fig. 2B. Huyết thanh lấy từ ngày đáp ứng pic, ngày 14 sau lần cuối gây miễn dịch, được sử dụng để thử nghiệm. Mỗi điểm được thể hiện bằng giá trị trung bình cộng ($n=10 \pm SE$).

Fig.3 thể hiện khả năng bảo vệ của chuột nhắt khỏi sự kích thích gây chết của virus H5N1. Các nhóm chuột nhắt được gây miễn dịch dưới da hai lần vào ngày 0 và 28 bằng 3 chủng BacHA (Tri-BacHA) hoặc chủng đơn (A/Vietnam/1203/2004(H5N1)) of BacHA (Mono-BacHA) hoặc vacxin mang virus H5N1 đã bất hoạt toàn phần (WT-H5N1). 3 tuần sau lần chủng ngừa cuối, chuột nhắt được lây nhiễm 5MLD₅₀ (Liều gây chết 50% chuột nhắt) của nhánh 1.0 (A/Vietnam/1203/2004(H5N1)) của chủng H5N1 HPAI theo đường mũi. Chuột nhắt được theo dõi về khả năng sống sót bằng cách quan sát trong 14 ngày. Các kết quả được biểu hiện bằng tỷ lệ phần trăm sống sót.

Fig.4 thể hiện khả năng bảo vệ của chuột nhắt khỏi sự kích thích gây chết của virus H5N1. Các nhóm chuột nhắt được gây miễn dịch dưới da hai lần vào ngày 0 và 28 bằng 3 chủng BacHA (Tri-BacHA) hoặc chủng đơn (A/Vietnam/1203/2004(H5N1)) BacHA (Mono-BacHA) hoặc vacxin virus H5N1 đã bất hoạt toàn phần (WT-H5N1). 3 tuần sau lần chủng ngừa cuối, chuột nhắt được lây nhiễm 5MLD₅₀ (Liều gây chết 50% chuột nhắt) thuộc nhánh 2.1 (A/Indonesia/TLL013/2006(H5N1)) của chủng H5N1 HPAI theo đường mũi. Chuột nhắt được theo dõi về khả năng sống sót bằng cách quan sát trong 14 ngày. Các kết quả được biểu hiện bằng tỷ lệ phần trăm sống sót.

Fig.5 thể hiện khả năng bảo vệ của chuột nhắt khỏi sự kích thích gây chết của virus H5N1. Các nhóm chuột nhắt được gây miễn dịch dưới da hai lần vào ngày 0 và 28 bằng 3 chủng BacHA (Tri-BacHA) hoặc chủng đơn (A/Vietnam/1203/2004(H5N1)) of BacHA (Mono-BacHA) hoặc vacxin virus H5N1 đã bất hoạt toàn phần (WT-H5N1). 3 tuần sau lần chủng ngừa cuối, chuột nhắt được lây nhiễm 5MLD50 (Liều gây chết 50% chuột nhắt) thuộc nhánh 7.0 (A/gà/Shanxi/2/06(H5N1)) của chủng H5N1 HPAI theo đường mũi. Chuột nhắt được theo dõi về mức giảm trọng lượng bằng cách quan sát trong 14 ngày. Các kết quả được biểu hiện bằng tỷ lệ phần trăm thể trọng (ở giai đoạn đầu của thử nghiệm).

Fig.6 thể hiện khả năng bảo vệ của chuột nhắt khỏi sự kích thích gây chết của virus H5N1. Các nhóm chuột nhắt được gây miễn dịch dưới da hai lần vào ngày 0 và 28 bằng 3 chủng BacHA (Tri-BacHA) hoặc chủng đơn (A/Vietnam/1203/2004(H5N1)) of BacHA (Mono-BacHA) hoặc vacxin virus H5N1 đã bất hoạt toàn phần (WT-H5N1). 3 tuần sau lần chủng ngừa cuối, chuột nhắt được lây nhiễm 5MLD50 (Liều gây chết 50% chuột nhắt) thuộc nhánh 7.0 (A/gà/Shanxi/2/06(H5N1)) của chủng H5N1 HPAI theo đường mũi. Chuột nhắt được theo dõi về khả năng sống sót bằng cách quan sát trong suốt 14 ngày. Các kết quả được biểu hiện bằng tỷ lệ sống sót.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất vacxin đa trị H5N1. Đặc biệt hơn, sáng chế đề xuất phương pháp nhận diện ba chủng H5N1 bao gồm toàn bộ các biến thể trong epitop trung hòa của ngưng kết tố hồng cầu trong hầu hết các dòng H5N1. Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất vacxin đa trị H5N1 bao gồm ba chủng H5N1 này hoặc các peptit kháng nguyên của mỗi chủng trong số ba chủng này.

Nếu không có quy định khác, toàn bộ các thuật ngữ kỹ thuật và thuật ngữ khoa học sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa tương tự nhau do chúng được hiểu theo cách thông thường bởi người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Tất cả các patent, đơn yêu cầu cấp patent, đơn đã bộc lộ và công bố đơn, trình tự Genbank, trang web và các tài liệu đã công bố khác được dùng trong toàn bộ bản mô tả này, trừ khi có quy định khác, được đưa toàn bộ vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn.

Mặc dù vacxin H5N1 dự tuyển hiện nay vẫn có tính kháng nguyên đặc hiệu ở hầu hết các thể phân lập trong các nhánh tương ứng, nhưng gần đây nhận thấy rằng

một số virus thuộc các nhánh 1, 2.2 và 2.3 có tính không đồng nhất kháng nguyên. Do các virus H5N1 được chia thành nhiều dòng hoặc nhánh, nên sáng chế đưa ra cách phân tích và lựa chọn chủng vaccine chứa các biến thể trong số các phân nhóm H5, đặc biệt là trong vùng epitop trung hòa. Việc lựa chọn chủng vaccine như vậy theo sáng chế sẽ tạo ra được phổ bảo vệ rộng kháng lại hầu hết các dòng H5N1.

Trong bản mô tả này, việc phát triển toàn bộ vaccine đa trị dựa trên HA của virus cúm có thể thực hiện được, nếu việc cải biến hoặc bảo tồn các epitop trung hòa thuộc một số nhánh HPAI của H5N1 có thể được nhận diện. Cần hiểu rằng kiểu phân bố của các epitop trung hòa này sẽ giúp cho việc tạo ra vaccine đa trị bằng cách đưa hai hoặc nhiều chủng H5N1 lý tưởng vào chế phẩm vaccine. Các epitop trung hòa của chủng virus đã chọn bao gồm các biến đổi trong số hầu hết các phân nhóm H5, để tạo ra tính miễn dịch bảo vệ phổ rộng kháng lại hầu hết các phân nhóm H5N1. Trước đây đã có nhiều nỗ lực để nhận diện các đoạn thể axit amin trong các trình tự HA của các biến thể thoát khỏi việc trung hòa bởi các kháng thể đơn dòng đã phát hiện ra các vị trí epitop trung hòa của HA (Kaverin et al., 2002; Kaverin et al., 2007). Cùng với các phát hiện trước đây, sáng chế đưa ra phương pháp nhận diện các epitop trung hòa khác của H5N1 bằng cách lập bản đồ các trình tự axit amin của chúng nhờ sử dụng các kháng thể đơn dòng trung hòa. Việc phân tích sự phân bố của tất cả các epitop trung hòa đã nhận diện trong số các phân nhóm H5 đã phát hiện ra các biến đổi trong các yếu tố xác định kháng nguyên của các phân nhóm H5N1 từ cả người lẫn các loài gia cầm. Dựa trên các kết quả này, sáng chế đề xuất 3 chủng vaccine bao gồm các epitop trung hòa chính của HA để chứa toàn bộ các biến thể trong các dòng H5N1. Để chứng minh thử nghiệm về phổ bảo vệ rộng *in vivo*, các protein HA của các chủng vaccine đã chọn được biểu hiện trên bề mặt baculovirus và hiệu quả của chế phẩm vaccine được đánh giá ở mô hình chuột nhắt đã được kích thích bởi các chủng biến thể phát sinh loài H5N1.

Theo sáng chế, chiến lược phát triển vaccine đa trị bao gồm 3 bước: (i) lập bản đồ các epitop trung hòa của ngưng kết tổ hồng cầu của virus H5N1 bằng cách sử dụng các kháng thể đơn dòng trung hòa (neutralizing monoclonal antibody - n-mAb); (ii) phân tích sự phân bố của các epitop trung hòa trong số tất cả các dòng H5N1; và (iii) lựa chọn chủng vaccine lý tưởng chứa các biến đổi nằm trên các epitop trung hòa của toàn bộ virus H5N1. Theo sáng chế, bảng gồm 5 n-mAb (6B8, 4C2, 2D9, 4F8 và

3H11) được sử dụng để lập bản đồ các epitop trung hòa của virus H5N1. Việc lập bản đồ các epitop trung hòa bằng các n-mAb đã phát hiện ra rằng các axit amin ở vị trí 138 hoặc 155 hoặc 189 hoặc 223 có liên quan tới việc tạo ra các epitop trung hòa chính của ngưng kết tổ hồng cầu của virus H5N1. Ngoài ra, các axit amin khác (140, 159, 194 và 218) đã nhận diện là một phần của các epitop trung hòa chính này (Kaverin et al., 2007) cũng tham gia đáng kể vào các phân tích tiếp theo. Trong bản mô tả này, việc so sánh trình tự epitop trung hòa chính của các virus H5N1 với dữ liệu nghiên cứu về bệnh cúm đã phát hiện ra các biến đổi nằm trong vùng epitop của toàn bộ ngưng kết tổ hồng cầu virus H5N1 ở người và gia cầm. Xem Bảng 2 dưới đây.

Dựa trên việc phân tích sự phân bố epitop được nêu trong bản mô tả này, 3 chủng khác nhau A/Indonesia/CDC669/2006(H5N1) (nhánh 2.1), A/Vietnam/1203/2004(H5N1) (nhánh 1.0) và Anhui/1/2005(H5N1) (nhánh 2.3) được chọn để cùng biểu hiện các biến thể trong số tất cả các phân nhóm H5N1. Các chủng vacxin đã chọn được khẳng định về kiểu hoạt động với các mAb trung hòa khác nhau bằng cách trung hòa virus và nồng độ HI. Như được thể hiện trong các Bảng 4A và 4B dưới đây, n-mAb 4C2 và 4F8 chỉ nhận biết chủng A/Indonesia/CDC669/2006(H5N1) và không phản ứng với các chủng A/Vietnam/1203/2004(H5N1) và A/Anhui/1/2005(H5N1). Kiểu hoạt động này có thể xảy ra do thay đổi axit amin ở vị trí 189 vì chủng A/Indonesia/CDC669/2006(H5N1) có “Arg” ở vị trí 189 trong khi “Lys” có mặt ở các chủng A/Vietnam/1203/2004(H5N1) và A/Anhui/1/2005(H5N1) ở cùng một vị trí. Mặt khác, n-mAb 6B8 có thể phản ứng với cả chủng A/Vietnam/1203/2004(H5N1) lẫn A/Anhui/1/2005(H5N1) do có mặt gốc “Lys” thông thường ở vị trí 189. Tương tự, nhận thấy rằng axit amin ở vị trí 155 cũng có ảnh hưởng đáng kể đối với việc nhận biết kháng thể của chủng H5N1. Hơn nữa, như được thể hiện trong bảng 2 dưới đây, vòng 150 có hai biến thể với 63,4% thể phân lập H5N1 của người có axit amin “Ser” và giữ lại 34,4% thể phân lập H5N1 có axit amin “Asn” ở vị trí này. Ngoài ra, axit amin ở vị trí 189, nằm ở vị trí gắn kết thụ thể của HA, chứa 64,26% thể phân lập có axit amin “Arg” của tất cả các chủng H5N1 của người đồng thời giữ được 34,65% thể phân lập có axit amin “Lys” ở vị trí này. Do đó, tin rằng các chủng vacxin được chọn theo sáng chế có các biến đổi nằm trong hầu hết 99% epitop kháng nguyên của tất cả các dòng H5N1 bao gồm cả virus của người lẫn gia cầm.

Các protein HA của các chủng đã chọn được biểu hiện riêng rẽ trên bề mặt baculovirut và chế phẩm vacxin được đánh giá ở mô hình chuột nhắt. Baculovirut tái tổ hợp có gen khởi đầu sớm qua trung gian 1 (immediate early promoter 1 - ie1) của WSSV được tạo ra để biểu hiện ở mức cao dễ dàng ngưng kết tổ hồng cầu cúm H5 ở cả các tế bào côn trùng và động vật có vú. Bản chất của gen khởi đầu sớm qua trung gian ie1 này là hỗ trợ cho việc biểu hiện protein ở pha sớm trong vòng đời của baculovirut, làm tăng mức biểu hiện ngưng kết tổ hồng cầu chức năng trên vỏ baculovirut. Do quá trình oligome hóa đòi hỏi quá trình vận chuyển hữu hiệu của các protein HA tới màng tế bào vật chủ (Copeland *et al.*, 1986), nên nhận thấy rằng điều kiện tiên quyết đối với baculovirut để tạo ra protein đó là HA đã biểu hiện trên bề mặt baculovirut phải có mặt ở dạng oligome của chúng. Do đó, mô hình này giúp tạo ra cấu trúc giống với cấu trúc tự nhiên của protein, từ đó sẽ mô phỏng được virut cúm kiểu hoang. HA đã biểu hiện trên bề mặt baculovirut giữ lại được cấu trúc tự nhiên của nó như được chứng minh bởi hoạt tính ngưng kết tổ hồng cầu và phân cắt HA0 chính xác thành HA1 và HA2 (dữ liệu không được thể hiện). Mặc dù ngưng kết tổ hồng cầu cúm (HA) biểu hiện baculovirut thường không được phân giải trong các tế bào côn trùng, nhưng nhận thấy rằng HA của các virut cúm gia cầm độc lực cao (như H5 và H7) có nhiều axit amin bazơ ở vị trí phân cắt được phân giải thành các tiểu đơn vị HA1 và HA2 khi không có mặt trypsin hoặc proteaza tương tự trypsin (Kuroda *et al.*, 1986). Việc phân cắt một phần HA0 trong nghiên cứu hiện nay có thể xảy ra do sự có mặt của subtilisin tương tự proprotein convertaza (PC) ở các tế bào côn trùng (Cieplik *et al.*, 1998), trong đó tính đặc hiệu cơ chất và đặc tính của chất ức chế là giống với PC của động vật có vú.

Trong bản mô tả này, việc gây miễn dịch dưới da hỗn hợp bổ trợ chứa mỗi baculovirut biểu hiện HA từ A/Indonesia/CDC669/2006(H5N1), A/Viet Nam/1203/2-004(H5N1) hoặc A/Anhui/1/2005(H5N1) (Tri-BacHA) làm tăng đáng kể nồng độ chuẩn HI trong huyết thanh khi được so sánh với hỗn hợp so sánh không được bổ trợ của nó. Hơn nữa, nồng độ chuẩn HI của chuột nhắt được chủng ngừa bằng Tri-BacHA bổ trợ được so sánh với chuột (kháng lại A/Vietnam/1203/2004(H5N1)) đã chủng ngừa bằng toàn bộ virut RG-H5N1 đã bổ trợ hoặc HA biểu hiện baculovirut đã bổ trợ của H5N1-A/Vietnam/1203/2004(H5N1) (Mono-BacHA). Ngoài ra, Tri-BacHA bổ trợ làm tăng nồng độ chuẩn của kháng thể trung hòa, đã trung hoà hữu hiệu 100 TCID₅₀

của các chủng H5N1 đồng nhất từ các nhánh khác nhau (nhánh 1.0, nhánh 2.1, nhánh 2.2, nhánh 4.0, nhánh 7.0 và nhánh 8.0) được so sánh với Tri-BacHA không được bổ trợ. Chế phẩm vaccin chỉ chứa Mono-BacHA bổ trợ hoặc vaccin RG-H5N1 đã bất hoạt có thể trung hòa nhánh 1 (đồng nhất), nhánh 2.1 và nhánh 8.0 nhưng không trung hòa hữu hiệu các virus H5N1 từ các nhánh khác (nhánh 2.2, nhánh 4.0 và nhánh 7.0). Tính miễn dịch chéo nhánh mạnh của chế phẩm vaccin Tri-BacHA đã bổ trợ có thể đạt được do nó chứa các biến đổi nằm trong các epitop trung hòa của các dòng H5N1.

Hiệu quả bảo vệ của vaccin được đánh giá bằng cách kích thích chuột nhắt đã được chủng ngừa H5N1 từ nhánh 1, nhánh 2.1 và nhánh 7. Trong bản mô tả này, tỷ lệ sống sót 1% thu được từ nhóm đã được chủng ngừa bằng Tri-BacHA hoặc Mono-BacHA bổ trợ hoặc vaccin từ virus đã bất hoạt toàn bộ kháng lại nhánh 1.0 và nhánh 2.1. Ngoài ra, Tri-BacHA bổ trợ có khả năng bảo vệ 100% kháng lại nhánh 7.0 của virus H5N1 mà không biểu hiện các triệu chứng nhiễm khuẩn bất kỳ. Tuy nhiên, vaccin từ virus đã bất hoạt toàn bộ và Mono-BacHA bổ trợ lần lượt chỉ có khả năng bảo vệ 66,6 % và 83,3% kháng lại sự lây nhiễm H5N1 từ nhánh 7.0. Ngoài ra, quá trình tiến triển bệnh nhiễm cúm được chỉ ra bằng cách thay đổi xu hướng giảm thể trọng ở các nhóm khác nhau. Chuột nhắt đã được chủng ngừa bằng Mono-BacHA bổ trợ hoặc vaccin từ toàn bộ virus bổ trợ có mức giảm thể trọng mạnh, lên tới 17% vào ngày thứ 6 nhằm kháng lại nhánh 7.0. Mức giảm này cho thấy rằng các vaccin hoá trị một không có khả năng bảo vệ kháng lại nhiều phân nhóm H5N1 khác nhau, có thể là do sự biến đổi các yếu tố xác định kháng nguyên (như các epitop trung hòa) của các phân nhóm virus khác nhau.

Tóm lại, việc gây miễn dịch dưới da chuột nhắt bằng baculovirus biểu hiện ngưng kết tổ hồng cầu từ 3 chủng vaccin đã chọn gây đáp ứng miễn dịch hệ thống và có khả năng bảo vệ chéo kháng lại sự lây nhiễm gây ra bởi virus H5N1 mà không biểu hiện các triệu chứng bất kỳ trên lâm sàng. Ngoài ra, các phát hiện theo sáng chế đã chỉ ra rằng việc chọn lọc các chủng vaccin dựa trên các biến thể trong số các epitop trung hòa trong các phân nhóm sẽ giúp phòng ngừa sự lây nhiễm gây ra bởi các đột biến H5N1 mới xuất hiện. Chế phẩm vaccin được sử dụng trong nghiên cứu này được bào chế một cách nhanh chóng mà không yêu cầu về tính an toàn sinh học bất kỳ. Baculovirus biểu hiện HA sẽ là lựa chọn lý tưởng cho vaccin trong trường hợp dịch

bệnh và trước dịch bệnh và sử dụng kỹ thuật vacxin mà không yêu cầu các điều kiện khắt khe về sinh học hoặc các quy trình tinh chế protein đơn giản.

Khi sử dụng trong bản mô tả, các thuật ngữ "điều trị" và "việc điều trị" dùng để chỉ việc sử dụng bất kỳ và sử dụng toàn bộ các tình trạng bệnh hoặc triệu chứng bệnh, phòng ngừa sự xuất hiện các tình trạng bệnh hoặc bệnh, hoặc theo cách khác phòng ngừa, cản trở, làm chậm, cải thiện hoặc đảo ngược sự tiến triển của tình trạng bệnh hoặc bệnh hoặc các triệu chứng không mong muốn khác theo cách bất kỳ.

Khi sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "lượng hữu hiệu" hoặc "lượng hữu hiệu có tác dụng phòng bệnh" dùng để chỉ lượng không độc và đủ của chất hoặc hợp chất để thu được tác dụng mong muốn. Ví dụ, lượng hữu hiệu có tác dụng phòng bệnh để điều biến đáp ứng miễn dịch là lượng của chất hoặc hợp chất tạo ra tác dụng điều biến đáp ứng miễn dịch mong muốn ở đối tượng. Tương tự, lượng hữu hiệu có tác dụng phòng bệnh để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh do virus cúm gia cầm gây ra là lượng chất hoặc hợp chất tạo ra được tác dụng điều trị hoặc phòng ngừa bệnh mong muốn ở đối tượng. Lượng chính xác sẽ thay đổi theo từng đối tượng khác nhau tùy thuộc vào các yếu tố như loài cần điều trị, độ tuổi và tình trạng chung của đối tượng, mức độ nghiêm trọng của tình trạng bệnh cần điều trị, chất cụ thể cần dùng và đường dùng và v.v.. Do đó, không thể mô tả được "lượng hữu hiệu" chính xác. Tuy nhiên, đối với trường hợp bất kỳ, "lượng hữu hiệu" thích hợp có thể được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này chỉ bằng cách sử dụng thử nghiệm thông thường.

Khi sử dụng trong bản mô tả, các thuật ngữ "polypeptit", "peptit" và "protein" được sử dụng thay cho nhau dùng để chỉ polyme của các gốc axit amin và các đoạn, biến thể, chất tương tự, gen tiền hóa thẳng hoặc chất tương đồng của chúng. Do vậy, các thuật ngữ này dùng để chỉ cả polyme của axit amin trong đó một hoặc nhiều gốc axit amin là axit amin tổng hợp không có trong tự nhiên, như hợp chất hóa học tương tự của các axit amin có trong tự nhiên tương ứng, cũng như polyme của axit amin có trong tự nhiên.

Khi sử dụng trong bản mô tả, các thuật ngữ "polynucleotit" hoặc "axit nucleic" được sử dụng thay cho nhau và dùng để chỉ phân tử bao gồm một hoặc nhiều nucleotit, hoặc oligonucleotit, hoặc đoạn của chúng, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, ARN hoặc ADN nucleotit hoặc dạng kết hợp của chúng.

Khi sử dụng trong bản mô tả, cụm từ "bệnh do virus cúm gia cầm thuộc phân nhóm H5N1 gây ra" có nghĩa là bệnh, tình trạng bệnh hoặc rối loạn bất kỳ gây ra bởi hoặc có mối liên quan với virus cúm gia cầm thuộc phân nhóm H5N1.

Khi sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "điều biến" khi được sử dụng có liên quan đến đáp ứng miễn dịch có nghĩa là làm tăng hoặc làm giảm, một cách trực tiếp hoặc gián tiếp, đáp ứng miễn dịch kháng kháng nguyên. Vacxin thường làm tăng đáp ứng miễn dịch kháng kháng nguyên.

Do đó, theo khía cạnh đầu tiên, sáng chế đề xuất vacxin đa trị H5N1 để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh ở đối tượng, trong đó bệnh này là do phân nhóm H5N1 của virus cúm gia cầm gây ra. Theo một phương án, vacxin đa trị H5N1 chứa lượng hữu hiệu có tác dụng phòng bệnh của chất gây miễn dịch thứ nhất, lượng hữu hiệu có tác dụng phòng bệnh của chất gây miễn dịch thứ hai và lượng hữu hiệu có tác dụng phòng bệnh của chất gây miễn dịch thứ ba. Theo phương án khác, đối tượng có thể là người, động vật nuôi trong nhà (chó, mèo, khỉ, v.v.); vật nuôi (ngựa, bò, cừu, dê, lợn v.v.), các loại gia cầm hoang dã (ngỗng trời, vịt trời, v.v.) và các loại gia cầm nuôi trong nhà (gà, vịt, ngỗng v.v.).

Theo một phương án, mỗi chất gây miễn dịch bao gồm ngưng kết tố hồng cầu hoặc phần kháng nguyên của nó hoặc axit nucleic mã hóa ngưng kết tố hồng cầu hoặc phần kháng nguyên của nó. Khi sử dụng trong bản mô tả, phần kháng nguyên của ngưng kết tố hồng cầu dùng để chỉ phần hemagglutinin bao gồm các epitop trung hòa. Theo phương án bổ sung, phần kháng nguyên bao gồm epitop của ngưng kết tố hồng cầu. Theo phương án khác, chất gây miễn dịch là virus bao gồm ngưng kết tố hồng cầu. Theo phương án khác, virus này được bất hoạt. Theo phương án bổ sung, virus này là virus đã suy yếu. Theo phương án khác, virus này ở dạng thể virus. Theo phương án khác, virus này có nguồn gốc từ trứng hoặc có nguồn gốc từ môi trường nuôi cấy tế bào. Theo phương án khác, chất gây miễn dịch là virus phân cắt bao gồm ngưng kết tố hồng cầu hoặc chế phẩm kháng nguyên chứa virus phân cắt. Theo một phương án, chất gây miễn dịch là ngưng kết tố hồng cầu hoặc phần kháng nguyên của nó. Theo phương án khác, ngưng kết tố hồng cầu hoặc phần kháng nguyên của nó được phân lập. Theo phương án bổ sung, ngưng kết tố hồng cầu hoặc phần kháng nguyên của nó được tạo ra bởi vector biểu hiện virus sao cho nó có mặt hoặc biểu hiện trên bề mặt của virus này. Theo một phương án, vector biểu hiện virus là vector biểu hiện baculovirus và virus này

có mặt hoặc biểu hiện ngưng kết tổ hồng cầu hoặc phản kháng nguyên của nó là baculovirut. Theo phương án khác, vector biểu hiện virus như vector biểu hiện virus gây bệnh đậu mùa đã cải biến, vector biểu hiện adenovirut, vector biểu hiện virus gây bệnh giang mai, và các vector tương tự khác. Theo một phương án, chất gây miễn dịch là axit nucleic mã hóa ngưng kết tổ hồng cầu hoặc phản kháng nguyên của nó có khả năng biểu hiện trên đối tượng.

Theo một phương án, chất gây miễn dịch có thể thuộc cùng một nhóm, ví dụ, chúng có thể được bất hoạt virus hoặc baculovirut thể hiện hoặc biểu hiện ngưng kết tổ hồng cầu hoặc phản kháng nguyên của nó. Theo phương án khác, chất gây miễn dịch có thể thuộc các nhóm khác nhau, ví dụ, chất gây miễn dịch thứ nhất có thể là virus được bất hoạt, chất gây miễn dịch thứ hai có thể là baculovirut thể hiện hoặc biểu hiện ngưng kết tổ hồng cầu hoặc phản kháng nguyên của nó và chất gây miễn dịch thứ ba có thể giống một trong số hai nhóm nêu trên hoặc thuộc nhóm khác nhau.

Theo sáng chế, vaccin đa trị H5N1 được điều chế trong đó chất gây miễn dịch thứ nhất bao gồm ngưng kết tổ hồng cầu hoặc peptit kháng nguyên của chúng của chủng virus A/Indonesia/CDC669/2006 (H5N1), chất gây miễn dịch thứ hai bao gồm ngưng kết tổ hồng cầu hoặc peptit kháng nguyên của chúng của chủng virus A/Vietnam1203/2004 (H5N1) và chất gây miễn dịch thứ ba bao gồm ngưng kết tổ hồng cầu hoặc peptit kháng nguyên của chúng của chủng virus A/Anhui/1/2005 (H5N1). Khi được nêu trong bản mô tả, mỗi chất gây miễn dịch có thể là virus, protein, peptit, axit nucleic hoặc chất tương tự bao gồm hoặc mã hóa ngưng kết tổ hồng cầu hoặc peptit kháng nguyên của virus cụ thể.

Chất gây miễn dịch có thể được tạo ra trong chế phẩm ở dạng trung hòa hoặc muối. Các muối được dụng bao gồm các muối cộng axit (được tạo ra bởi các nhóm amin tự do của peptit) và được tạo ra bởi các axit vô cơ như, ví dụ, axit hydrocloric hoặc axit phosphoric, hoặc các axit hữu cơ như vậy như axit axetic, oxalic, tartaric, maleic, và các axit. Các muối được tạo ra bởi các nhóm carboxyl tự do cũng có thể có nguồn gốc từ các bazơ vô cơ như, ví dụ, natri, kali, amoni, canxi, hoặc sắt hydroxit, và các bazơ hữu cơ như vậy là isopropylamin, trimetylamin, 2-etylamin ethanol, histidin, procain, và các bazơ tương tự.

Nói chung, các chế phẩm thích hợp có thể được điều chế theo các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể bao gồm các

chất pha loãng, chất bổ trợ và/hoặc tá dược được dùng. Các chất pha loãng, chất bổ trợ và các tá dược này "có thể chấp nhận được" về tính tương hợp với các thành phần khác của chế phẩm, và không gây hại cho người nhận chúng.

Ví dụ về các chất pha loãng được dùng là nước khử khoáng hoặc nước cất; dung dịch nước muối; các dầu thực vật như dầu đậu phộng, dầu rum, dầu oliu, dầu hạt bông, dầu ngô, dầu hạt vừng như dầu lạc, dầu rum, dầu oliu, dầu hạt bông, dầu ngô, dầu hạt vừng, dầu lạc hoặc dầu dừa; các dầu silicon, bao gồm polysiloxan, như methyl polysiloxan, phenyl polysiloxan và methylphenyl polysiloxan; silicon bay hơi; dầu khoáng như parafin lỏng, paraffin dẻo hoặc squalan; dẫn xuất xenluloza như methyl xenluloza, etyl xenluloza, carboxymethylxenluloza, natri carboxymethylxenluloza hoặc hydroxypropylmethylxenluloza; alkanol bậc thấp, ví dụ, etanol hoặc iso-propanol; aralkanol bậc thấp; polyalkylen glycol bậc thấp hoặc alkylen glycol bậc thấp, ví dụ, polyetylen glycol, polypropylen glycol, etylen glycol, propylen glycol, 1,3-butylen glycol hoặc glyxerin; các este của axit béo như isopropyl palmitat, isopropyl myristat hoặc etyl oleat; polyvinylpyridon; aga; caragenan; gôm tragacan hoặc gôm acaxia, và vazolin. Thông thường, các chất mang hoặc chất mang chiếm với lượng nằm trong khoảng từ 1% đến 99,9% khối lượng chế phẩm. Tốt nhất, nếu chất pha loãng là nước muối.

Để dùng làm dung dịch hoặc huyền phù dùng để tiêm, các chất pha loãng hoặc chất mang không độc dùng được ngoài đường tiêu hóa có thể bao gồm, dung dịch Ringer, triglyxerit mạch trung bình (medium chain triglyceride - MCT), nước muối đẳng trương, nước muối đệm phosphat, etanol và 1,2 propylen glycol. Một số ví dụ về các chất mang, chất pha loãng, tá dược và chất bổ trợ thích hợp để dùng qua đường miệng bao gồm dầu lạc, parafin lỏng, natri carboxymethylxenluloza, methylxenluloza, natri alginat, gôm acaxia, gôm tragacan, đextroza, sucroza, sorbitol, manitol, gelatin và lexitin. Ngoài ra, các chế phẩm dùng qua đường miệng này có thể chứa các chất điều vị và chất màu thích hợp. Khi được sử dụng ở dạng viên nang, các viên nang này có thể được bao bằng các hợp chất như glyxeryl monostearat hoặc glyxeryl distearat làm chậm sự phân rã.

Các chất bổ trợ thông thường bao gồm chất làm mềm, chất tạo nhũ tương, chất làm đặc, chất bảo quản, chất kháng khuẩn và chất đệm. Các chất bổ trợ hoặc các thành phần kích thích miễn dịch sử dụng trong việc điều chế các chế phẩm bao gồm, và

không chỉ giới hạn ở, các muối nhôm, dầu khoáng, sản phẩm Mycobacterial (ví dụ, chất bổ trợ hoàn toàn hoặc không hoàn toàn Freund) hoặc các tá dược lỏng như hỗn hợp của saponin glycosit từ thực vật, cholesterol và phosphatidylcholin tạo ra tá dược lỏng để đưa ra một số loại protein giống nhau về cấu trúc tương tự dạng khung. Nhằm mục đích mô tả, chất bổ trợ là hợp chất làm gia tăng, làm tăng, làm dịu hoặc tăng cường đáp ứng miễn dịch với chất kháng nguyên hoặc kháng nguyên. Các chất bổ trợ thông thường tăng cường cả đáp ứng miễn dịch thể dịch và tế bào và đáp ứng đã gia tăng đối với các 2 loại này khi không có mặt các chất khác nhằm xác định chất bổ trợ. Hơn nữa, các chất bổ trợ và việc sử dụng chúng là đã biết đối với các nhà nghiên cứu miễn dịch và thường được sử dụng để tăng cường đáp ứng miễn dịch khi liều của chất kháng nguyên bị hạn chế, khi chất kháng nguyên nghèo tính kháng nguyên, hoặc khi đường dùng thuốc chưa đạt tối ưu. Do đó, thuật ngữ “lượng bổ trợ” là lượng của chất bổ trợ có khả năng làm tăng cường đáp ứng miễn dịch với chất kháng nguyên hoặc kháng nguyên đã định. Lượng bằng với “lượng bổ trợ” có thể thay đổi và phụ thuộc vào nhiều yếu tố bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, đặc tính của chất kháng nguyên, lượng chất kháng nguyên được dùng, các loài vật chủ, đường dùng, và tiến trình/quy trình dùng chất kháng nguyên. “Lượng bổ trợ” có thể được xác định một cách dễ dàng bằng cách thử nghiệm thông thường trong các trường hợp đã định. Lượng này là đã biết đối với người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và thường sử dụng việc xác định đáp ứng liều thông thường xác định để thay đổi lượng chất kháng nguyên và chất bổ trợ đã dùng. Các đáp ứng được đo bằng cách xác định nồng độ chuẩn kháng thể trong huyết thanh hoặc các đáp ứng qua trung gian tế bào đối với chất kháng nguyên bằng cách sử dụng thử nghiệm hấp phụ miễn dịch liên kết enzym, thử nghiệm miễn dịch phóng xạ, thử nghiệm gắn kết hemagglutinin và các thử nghiệm tương tự.

Dạng rắn để dùng qua đường miệng có thể chứa chất kết dính được dùng dùng trong dược phẩm dùng cho người và động vật, chất làm ngọt, chất phân rã, các chất pha loãng, hương liệu, chất bao, chất bảo quản, chất bôi trơn và/hoặc chất làm chậm thời gian. Các chất kết dính thích hợp bao gồm gồm acacia, gelatin, tinh bột ngô, gồm tragacanth, natri alginat, carboxymethylxenluloza hoặc polyetylen glycol. Chất làm ngọt thích hợp bao gồm sucroza, lactoza, glucoza, aspartam hoặc sacarin. Chất phân rã thích hợp bao gồm tinh bột ngô, methylxenluloza, polyvinylpyrrolidon, gồm guar, gồm

xanthan, bentonit, axit alginic hoặc aga. Các chất pha loãng thích hợp bao gồm lactoza, sorbitol, manitol, đextroza, kaolan, xenluloza, canxi cacbonat, canxi silicat hoặc đicacxi phosphat. Các chất tạo hương thích hợp bao gồm chất tạo mùi tinh dầu bạc hà, dầu của cây thương xanh, anh đào, cam hoặc mâm xôi. Các chất bao thích hợp bao gồm polyme hoặc copolyme của axit acrylic và/hoặc axit methacrylic và/hoặc các este của chúng, sáp ong, các rượu béo, zein, senlắc hoặc gluten. Các chất bảo quản thích hợp bao gồm natri benzoat, vitamin E5 alpha-tocopherol, axit ascorbic, metyl paraben, propyl paraben hoặc natri bisulphit. Các chất bôi trơn thích hợp bao gồm magie stearat, axit stearic, natri oleat, natri clorua hoặc bột talc.

Dạng lỏng để dùng qua đường miệng có thể chứa chất mang lỏng ngoài các chất nêu trên. Các chất mang lỏng thích hợp bao gồm nước, các dầu như dầu oliu, dầu lạc, dầu hạt vừng, dầu hướng dương, dầu rum, dầu đậu phộng, dầu dừa, parafin lỏng, etylen glycol, propylen glycol, polyetylen glycol, etanol, propanol, isopropanol, glyxerol, các rượu béo, triglyxerit hoặc hỗn hợp của chúng.

Huyền phù để dùng qua đường miệng có thể còn bao gồm các chất phân tán và/hoặc chất lơ lửng. Các chất lơ lửng thích hợp bao gồm natri carboxymetylxenluloza, metyloxenluloza, hydroxypropylmetyl-xenluloza, poly-vinyl-pyrolidon, natri alginat hoặc axetyl rượu. Các chất phân tán thích hợp bao gồm lexitin, polyoxyetylen este của axit béo như axit stearic, polyoxyetylen sorbitol mono- hoặc di-oleat, -stearat hoặc -laurat, polyoxyetylen sorbitan mono- hoặc di-oleat, -stearat hoặc -laurat và các chất tương tự. Nhũ tương để dùng qua đường miệng có thể còn bao gồm một hoặc nhiều chất tạo nhũ tương. Các chất tạo nhũ tương thích hợp bao gồm các chất phân tán như được lấy làm ví dụ nêu trên hoặc gồm tự nhiên như gồm guar, gồm acacia hoặc gồm tragacan.

Các phương pháp bào chế chế phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa là hiển nhiên đối với người có hiểu biết trong lĩnh vực này, và được mô tả chi tiết trong, ví dụ, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Ed., Ed. D.B. Troy, Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, 2006, được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn.

Chế phẩm có thể được kết hợp với chất hoạt động bề mặt thích hợp như chất hoạt động bề mặt anion, cation hoặc không ion như các sorbitan este hoặc dẫn xuất polyoxyetylen của chúng. Chất lơ lửng như gồm tự nhiên, dẫn xuất xenluloza hoặc vật

liệu vô cơ như silic đioxit, và các thành phần khác như mỡ lông cừu, cũng có thể bao gồm trong sáng chế này.

Quy trình bào chế chế phẩm có sử dụng các phương pháp thông thường đã biết bởi người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Thông thường, các chế phẩm như vậy được bào chế dưới dạng chế phẩm dùng để tiêm, cũng như các dung dịch hoặc huyền phù lỏng; các dạng rắn thích hợp để hòa tan, hoặc tạo huyền phù, tạo dạng lỏng trước khi tiêm cũng có thể được bào chế. Quy trình bào chế cũng có thể được tạo nhũ tương. Hoạt chất miễn dịch thường được trộn với các tá dược là dược dụng và tương hợp với hoạt chất.

Theo phương án thứ hai, sáng chế mô tả phương pháp điều biến đáp ứng miễn dịch đối với virus cúm gia cầm bao gồm bước cho đối tượng dùng lượng hữu hiệu có tác dụng phòng bệnh của vaccin đa trị H5N1. Vaccin đa trị H5N1 là như được mô tả trên đây. Mặc dù tốt hơn nếu vaccin đa trị H5N1 được dùng dưới dạng chế phẩm đơn lẻ, nhưng gợi ý rằng các hợp phần riêng rẽ của vaccin có thể được dùng riêng rẽ hoặc đồng thời cho đối tượng.

Theo phương pháp của sáng chế, vaccin và chế phẩm có thể được dùng theo đường thích hợp bất kỳ, kể cả dùng nội hấp, dùng khu trú hoặc tại chỗ. Đường dùng cụ thể cần sử dụng trong trường hợp bất kỳ sẽ phụ thuộc vào nhiều yếu tố, bao gồm bản chất của bệnh cần được điều trị, mức độ trầm trọng và quy mô của bệnh, liều của hợp chất cụ thể cần phân phối và các tác dụng phụ có thể xuất hiện của các vaccin hoặc chế phẩm mong muốn.

Ví dụ, trong các trường hợp yêu cầu rằng nồng độ thích hợp của các vaccin hoặc chế phẩm mong muốn được phân phối trực tiếp tới vị trí cần được điều trị, khu vực dùng có thể là theo khu vực chứ không phải là dùng toàn thân. Việc dùng theo khu vực có thể phân phối các vaccin hoặc chế phẩm mong muốn tới vị trí cần thiết với nồng độ tại chỗ rất cao và do đó là thích hợp để thu được hiệu quả điều trị hoặc phòng ngừa mong muốn đồng thời tránh được sự phơi nhiễm của các cơ quan khác với vaccin hoặc chế phẩm và từ đó có thể làm giảm được các tác dụng phụ. Ví dụ, theo phương án về đường dùng của sáng chế, đường dùng có thể là các đường dùng thông thường bất kỳ, bao gồm trong hốc, trong bàng quang, trong cơ, trong động mạch, tĩnh mạch, dưới da, khu trú hoặc dùng qua đường miệng. Đường dùng trong hốc có thể là dùng trong màng bụng (IP) hoặc trong màng phổi.

Nếu muốn, thiết bị hoặc chế phẩm chứa chất gây miễn dịch thích hợp để giải phóng kéo dài hoặc không liên tục có thể được cấy hữu hiệu vào cơ thể hoặc dùng khu trú để giải phóng tương đối chậm các chất như vậy vào cơ thể.

Việc dùng vector biểu hiện hoặc tế bào vật chủ có thể bao gồm việc phân phối bằng cách uống trực tiếp, tiêm vào hệ thống, hoặc phân phối vào các mô hoặc tế bào đã chọn hoặc bằng cách gián tiếp thông qua việc phân phối tới các tế bào được phân lập từ đối tượng hoặc vật cho tương thích. Liên quan tới chế phẩm có nguồn gốc từ axit nucleic, tất cả các đường phân phối các chế phẩm như vậy được bao hàm trong sáng chế.

Các chế phẩm cũng có thể được dùng dưới dạng liposom. Nói chung, liposom có nguồn gốc từ phospholipit hoặc các chất lỏng khác, và được tạo ra bởi các tinh thể lỏng gồm một hoặc nhiều lớp đã hydrat hóa được phân tán vào môi trường nước. Chất lỏng chấp nhận được về mặt sinh lý và chuyển hóa được không độc, có khả năng tạo ra liposom có thể được sử dụng. Các chế phẩm ở dạng liposom có thể chứa chất ổn định, chất bảo quản, tá dược và các chất tương tự. Tốt hơn nếu các chất lỏng là phospholipit và phosphatidyl cholin (lexitin), có nguồn gốc từ tự nhiên lẫn tổng hợp. Các phương pháp điều chế liposom là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Nồng độ liều hữu hiệu của hợp chất đã dùng cho đối tượng cụ thể bất kỳ sẽ phụ thuộc vào nhiều yếu tố bao gồm: loại bệnh cần điều trị và tình trạng bệnh; hoạt tính của hợp chất được sử dụng; chế phẩm được sử dụng; tuổi tác, thể trọng, tình trạng sức khỏe tổng thể, giới tính và chế độ ăn uống của đối tượng; thời điểm dùng thuốc; đường dùng thuốc; tốc độ riêng rẽ của các hợp chất; quá trình điều trị; thuốc được sử dụng để kết hợp hoặc dùng đồng thời với việc điều trị, cùng với các yếu tố liên quan khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế mô tả phương pháp phòng ngừa hoặc điều trị bệnh do virus cúm gia cầm gây ra bao gồm bước cho đối tượng dùng lượng hữu hiệu có tác dụng phòng bệnh của vaccin đa trị H5N1. Vaccin đa trị H5N1 là như được mô tả trên đây. Các chế phẩm, đường dùng và liều lượng thích hợp là như được mô tả trên đây.

Theo khía cạnh thứ tư, sáng chế mô tả vaccin đa trị H5N1 dùng để điều biến đáp ứng miễn dịch đối với virus cúm gia cầm. Vaccin đa trị H5N1 là như được mô tả trên đây.

Theo khía cạnh thứ năm, sáng chế mô tả vacxin đa trị H5N1 được dùng để điều trị bệnh do virus cúm gia cầm gây ra. Vacxin đa trị H5N1 là như được mô tả trên đây.

Các phương pháp bào chế và dùng các vacxin là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và được mô tả trong các patent Mỹ số 7,510,719, 7,537,768, 7,666,439 và 7,691,368; các Công bố cấp patent số 2008/0187557, 2009/0136532, 2009/0263422, 2009/0304730, 2010/0047271, 2010/0074916 và 2010/0086485; và các Công bố quốc tế số WO 2007/129984, WO 2008/048984, WO 2008/115314, WO 2009/069447, WO 2009/115917, WO 2010/021289 và WO 2010/036948, nội dung của mỗi tài liệu được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn.

Trên thực tế, trừ khi có quy định khác, sáng chế sử dụng các kỹ thuật hóa học thông thường, sinh học phân tử, vi trùng học, tái tổ hợp ADN, di truyền, miễn dịch, sinh tế bào, môi trường nuôi cấy tế bào và sinh học chuyển gen, là hiển nhiên đối với người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Xem, ví dụ, Maniatis *et al.*, 1982, *Molecular Cloning* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York); Sambrook *et al.*, 1989, *Molecular Cloning*, 2nd Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York); Sambrook and Russell, 2001, *Molecular Cloning*, 3rd Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York); Ausubel *et al.*, 1992), *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, including periodic updates); Glover, 1985, *DNA Cloning* (IRL Press, Oxford); Russell, 1984, *Molecular Biology of plants: a laboratory course manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.); Anand, *Techniques for the Analysis of Complex Genomes*, (Academic Press, New York, 1992); Guthrie and Fink, *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology* (Academic Press, New York, 1991); Harlow và Lane, 1988, *Antibodies*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York); *Nucleic acid Hybridization* (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); *Transcription And Translation* (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); *Culture Of Animal Cells* (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press, 1986); B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); the treatise, *Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); *Methods In Enzymology*, Vols. 154 và 155 (Wu et al. eds.), *Immunochemical Methods In Cell and Molecular Biology* (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); *Handbook Of Experimental Immunology*, Volumes I-

IV (D. M. Weir và C. C. Blackwell, eds., 1986); Riott, *Essential Immunology*, 6th Edition, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1988; Fire et al., *RNA Interference Technology: From Basic Science to Drug Development*, Cambridge University Press, Cambridge, 2005; Schepers, *RNA Interference in Practice*, Wiley-VCH, 2005; Engelke, *RNA Interference (RNAi): The Nuts & Bolts of siRNA Technology*, DNA Press, 2003; Gott, *RNA Interference, Editing, and Modification: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology)*, Human Press, Totowa, NJ, 2004; Sohail, *Gene Silencing by RNA Interference: Technology and Application*, CRC, 2004.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế được mô tả bởi các ví dụ dưới đây, được đưa ra bằng cách minh họa và không nhằm giới hạn sáng chế theo cách bất kỳ. Các kỹ thuật tiêu chuẩn đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này hoặc các kỹ thuật cụ thể nêu dưới đây được sử dụng.

Ví dụ 1

Vật liệu và phương pháp

Virut: Các virut cúm H5N1 người từ nhánh 2.1 A/Indonesia/CDC669/2006, A/Indonesia/TLL013/2006 và một chủng A/Indonesia/TLL014/2006 của gia cầm thu được từ Bộ Y tế (the Ministry of Health - MOH), Indonesia. Phân nhóm H5N2 của gia cầm thu được từ nhà chức trách nông phẩm và thú y (the Agri-Food and Veterinary Authority -AVA) của Singapore. Các virut H5N1 từ các nhánh/phân nhánh phát sinh loài khác nhau (Bảng 1) được tách ra bằng kỹ thuật di truyền ngược [WHO, 2004]. Tóm lại, các gen ngưng kết tổ hồng cầu (HA) và neuraminidaza (NA) của virut H5N1 thuộc các nhánh 1, 2.1, 2.2, 2.3, 4, 7 và 8 được tổng hợp (GenScript, USA) dựa trên trình tự thu được từ dữ liệu cúm NCBI. Các gen HA và NA tổng hợp được tạo dòng vào plasmit khởi đầu kép để di truyền ngược bệnh cúm A (Prabakaran et al., 2009). Các plasmit khởi đầu kép này thu được từ Trung tâm kiểm soát và phòng ngừa bệnh (Center for Disease Control and Prevention), Atlanta, GA, USA. Các virut tái tổ hợp được tách ra bằng cách chuyển nhiễm các plasmit chứa HA và NA cùng với sáu gen cúm còn lại có nguồn gốc từ chủng phát triển ở mức cao A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) vào các tế bào 293T và MDCK được nuôi cấy đồng thời bằng cách sử dụng Lipofectamine 2000 (Invitrogen Corp.). Sau 72 giờ chuyển nhiễm, môi trường nuôi cấy được cấy chủng vào trứng chứa phôi hoặc các tế bào MDCK. Các gen HA và NA của các virut tái tổ hợp từ đoạn thứ hai được tạo trình tự để khẳng định sự có mặt của

các gen HA và NA đã đưa vào và khẳng định sự không có mặt của các thể đột biến. Các virus lưu trữ được nhân giống trứng chứa phôi 11 ngày tuổi vào túi niệu, virus chứa dịch niệu được thu gom và cất giữ thành các phần ở -80°C. Hàm lượng virus được xác định bằng thử nghiệm ngưng kết hồng cầu (HA) tiêu chuẩn. Tất cả các thử nghiệm với các virus độc lực cao được tiến hành ở mức an toàn sinh học 3 (biosafety level 3 - BSL-3) tiến hành dễ dàng theo chỉ dẫn của CDC/NIH và WHO.

Bảng 1

Virus cúm A tái tổ hợp tạo ra từ kỹ thuật di truyền ngược.

Dãy số	Tên virus (phân loại)	Nhánh	Vật chủ
1	A/Vietnam1203/04 (H5N1)	1	Người
2	A/Indonesia/CDC1031/07 (H5N1)	2.1	Người
3	A/gà tây/Gà tây1/05* (H5N1)	2.2	Gia cầm
4	A/Anhui/1/05* (H5N1)	2.3	Người
5	A/gà/Shanxi/2/06 (H5N1)	7	Gia cầm
6	A/ngỗng/Guiyang/337/06 (H5N1)	4	Gia cầm
7	A/gà/Henan/12/04 (H5N1)	8	Gia cầm

Các kháng thể đơn dòng trung hòa (n-mAb): Bảng gồm 5 mAb trung hòa khác nhau kháng HA của virus H5N1 được chọn để biểu hiện đặc điểm của thể đột biến lẫn trốn. Tóm lại, chuột nhắt BALB/c được gây nhiễm hai lần/2 tuần bằng cách tiêm dưới da formalin tinh chế đã bất hoạt kháng nguyên H5N2 của A/Indonesia/CDC669/2006 hoặc A/Indonesia/TLL014/2006 hoặc A/Gà/Singapore/98 được trộn với chất bổ trợ (SEPPIC, France). Chuột nhắt nhận cùng kháng nguyên virus bằng cách tiêm tĩnh mạch bổ sung, 3 ngày trước khi dung hợp tế bào lá lách với các tế bào SP2/0 (Yokoyama, 2004).

Lập bản đồ epitop trung hòa H5HA bằng cách sử dụng n-mAb: Các epitop trung hòa chính của H5 được lập bản đồ bằng cách biểu hiện đặc điểm của các thể đột biến lẫn trốn (Kaverin et al., 2007) với 5 kháng thể đơn dòng trung hòa khác nhau (6B8, 4C2, 2D9, 4F8 và 3H11). Tóm lại, virus H5N1 được ủ với lượng dư n-mAb trong 1 giờ và hỗn hợp được cấy chủng trứng gà già chứa phôi 11 ngày tuổi. Trứng được ủ ở 37°C trong 48 giờ. Virus được thu gom và được dùng để tách dòng để giới hạn mức độ pha loãng ở trứng gà chứa phôi và các thể đột biến lẫn trốn được tinh chế ở dạng tấm. Các thể đột biến trong gen HA sau đó được xác định bằng cách tạo trình tự và được so sánh với trình tự của virus bố mẹ.

Phân tích sự phân bố của epitop: Các epitop trung hòa của H5HA đã xác định bởi Kaverin et al. (2007), cùng với các epitop chính đã xác định trong nghiên cứu này, được dùng để phân tích trình tự. Để phân tích mức độ phân bố của epitop trung hòa trong số các virus H5N1, các trình tự HA có chiều dài đầy đủ được so sánh với virus H5N1 của gia cầm và người từ dữ liệu cúm NCBI. Hiện tượng đa hình protein của H5N1 được phân tích bằng dữ liệu nghiên cứu về dịch cúm (Fludb.org) và lên tới 317 chủng của người và 2028 chủng gia cầm được sắp hàng trong nghiên cứu này. Để đánh giá các biến thể trong epitop, bảng tần số vị trí được tạo ra từ nhiều lần sắp hàng trình tự đối với mỗi virus H5N1.

Chọn lọc chủng vaccin: 3 chủng H5N1 khác nhau được chọn để chứa các biến thể trong các epitop trung hòa của HA trong hầu hết các dòng H5N1. Ngoài ra, hoạt tính của các chủng vaccin đã chọn được xác định bằng thử nghiệm ức chế ngưng kết hồng cầu và thử nghiệm vi trung hòa nhờ sử dụng kháng thể đơn dòng trung hòa thích hợp.

Tạo baculovirus tái tổ hợp: Để tạo vector baculovirus tái tổ hợp, như được mô tả trên đây, gen khởi đầu WSSV ie1 kiểm soát cắt-xét biểu hiện HA được chèn vào vector dạng con thoi pFastBac1 và được hợp nhất thành bộ gen baculovirus nằm trong DH10BAC™ theo quy trình của hệ Bac-To-Bac (Invitrogen). Tóm lại, gen HA có chiều dài đầy đủ được khuếch đại từ 3 chủng cúm khác nhau theo phương pháp PCR tiêu chuẩn (94°C trong 20 giây, 55°C trong 30 giây và 72°C trong 2 phút trong 30 chu kỳ). Các trình tự H5HA được khuếch đại bằng các đoạn mồi H5FSal 5' ACGCGTCG-ACATGGAGAAAATAGTGC TTCT 3' (SEQ ID NO:1) và H5RNot 5' ATAAGGC-GGCCGCTTAAATGCAAATTCTGCA TTG 3' (SEQ ID NO:2) từ các virus H5N1 - A/Indonesia/CDC669/2006(H5N1) (Số truy cập ngân hàng gen CY014481 và ABI36428; SEQ ID NO:3 (trình tự nucleotit) và SEQ ID NO:4 (trình tự axit amin); A/Viet Nam/1203/2004(H5N1) (Số truy cập ngân hàng gen EU122404 và ABW90135; SEQ ID NO:5 (trình tự nucleotit) và SEQ ID NO:6 (trình tự axit amin); và A/Anhui/1/2005(H5N1) (Số truy cập ngân hàng gen DQ371928 và ABD28180; SEQ ID NO:7 (trình tự nucleotit) và SEQ ID NO:8 (trình tự axit amin). Gen khởi đầu WSSV ie1 được chèn vào vector ở các vị trí SnaBI và SalI và các gen HA được chèn vào vector pFastBac1 ở vị trí NotI-SalI. Sau khi biến nạp vector chuyển vào DH10BAC, các bacmit tái tổ hợp được chuyển nhiễm vào các tế bào Sf9, và các hạt baculovirus

sinh trưởng đã được giải phóng vào môi trường được thu gom sau 4 ngày chuyển nhiễm.

Thử nghiệm vaccin: Chuột nhắt cái BALB/c không mang mầm bệnh (6 tuần tuổi) thu được từ Trung tâm Nghiên cứu động vật, trường Đại học Singapore, và được nuôi ở Đơn vị nuôi giữ động vật của Viện Nghiên cứu khoa học cuộc sống (the Temasek Life Sciences Laboratory). 24 chuột nhắt trong mỗi nhóm thử nghiệm ($n=24/\text{nhóm}$) được chủng ngừa dưới da hai lần trong khoảng thời gian như nhau là 28 ngày bằng 100 μ l baculovirut biểu hiện HA của H5N1-A/Vietnam/1203/2004 (Mono-BacHA) hoặc hỗn hợp chứa mỗi baculovirut biểu hiện HA từ A/Indonesia/CDC669/2006-H5N1, A/Viet Nam/1203/2004-H5N1 A/Anhui/1/2005-H5N1 (Tri-BacHA) có hoặc không có chất bổ trợ, Montanide ISA563 (nước trong nhũ tương dầu) (SEPPIC, France). Ngoài ra, virut RG-H5N1 đã bất hoạt (A/Vietnam/1203/2004-H5N1) được sử dụng làm nhóm vaccin so sánh. Huyết thanh được thu gom từ 10 con chuột nhắt/nhóm thử nghiệm vào các ngày 14, 28 và ngày 42. Thử nghiệm ức chế ngưng kết hồng cầu và ELISA gián tiếp được tiến hành để đánh giá đáp ứng kháng thể đặc hiệu HA. Ngoài ra, khả năng trung hòa nhánh chéo huyết thanh được xác định bằng thử nghiệm vi trung hòa. Hiệu quả của vaccin được đánh giá bằng cách kích thích vật chủ kháng lại chủng cúm HPAI H5N1 từ các nhánh khác nhau. Toàn bộ thử nghiệm trên động vật được tiến hành theo Hướng dẫn thử nghiệm động vật của Viện quốc gia về các bệnh truyền nhiễm (the National Institute of Infectious Diseases - NIID), và quy trình thử nghiệm được quan sát và phê chuẩn bởi Ủy ban sử dụng và chăm sóc động vật của Viện Nghiên cứu khoa học cuộc sống, Đại học quốc gia Singapore, Singapore.

Thử nghiệm ức chế ngưng kết hồng cầu: Thử nghiệm ức chế ngưng kết hồng cầu được tiến hành như đã nêu (Webster et al., 1991). Huyết tương đã xử lý bằng enzym phá hủy thụ thể (receptor-destroying enzyme - RDE) được pha loãng theo chuỗi (gấp 2 lần) trong các đĩa 96 lỗ có đáy hình chữ V. Khoảng 4 đơn vị HA của virut kháng nguyên được ủ với huyết thanh trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng, sau đó bổ sung 1% hồng cầu gà (RBC) và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 40 phút.

Thử nghiệm vi trung hòa: Thử nghiệm vi trung hòa được tiến hành theo quy trình đã nêu (Suguitan et al., 2006). Tóm lại, các tế bào MDCK được nhân giống trong đĩa nuôi cấy 96 lỗ và được nuôi cấy ở 37°C để tạo ra lớp đơn. Serial 2-fold dilutions of

các mẫu huyết thanh đã bất hoạt bởi nhiệt (56°C trong 45 phút) đã pha loãng theo chuỗi 2 lần được trộn riêng rẽ với 100 liều lây nhiễm môi trường nuôi cấy mô 50% (TCID₅₀) của virus H5N1 từ các nhánh khác nhau và được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ, và các hỗn hợp được bổ sung vào lớp đơn chứa các tế bào MDCK vào 3 lỗ giống nhau. Hiệu chuẩn trung hòa hiệu giá của kháng huyết thanh của chuột nhắt ngừa ngừa hoàn toàn hiệu quả chữa bệnh tế bào bất kỳ ở các dịch pha loãng thuận nghịch được tính toán.

Thử nghiệm kích thích bệnh chống nhiễm virus H5N1: 3 tuần sau lần chủng ngừa cuối, chuột nhắt được chuyển vào buồng nuôi động vật BSL3. 6 con chuột nhắt/nhóm được gây kích thích theo đường mũi bằng 5MLD₅₀ (Liều gây chết chuột nhắt 50%) của chủng H5N1 HPAI đồng nhất (A/Vietnam/1203/2004(H5N1) nhánh 1.0) và nhánh 2.1 khác loại (A/Indonesia/TLL13/2006(H5N1)) và nhánh 7.0 (A/gà/Shanxi/2/06). 50% liều gây chết chuột nhắt (MLD₅₀) của virus cúm này cần được thử nghiệm kích thích theo đường mũi được xác định. Chuột nhắt được quan sát hằng ngày để theo dõi thể trọng và tỷ lệ tử vong. Quá trình theo dõi tiếp tục cho tới khi các động vật chết hoặc ngày 14 sau khi kích thích. Đối với tiền bệnh học, chuột nhắt được mổ và phổi được cất giữ trong 10% (khối lượng/thể tích) formalin tạo đệm trung tính và được ngâm trong parafin và được phân đoạn. Các phần được nhuộm bằng hematoxylin và eosin (H/E) trước khi soi bằng kính hiển vi quang học và được đánh giá bệnh phổi. Toàn bộ thử nghiệm kích thích được tiến hành trong buồng nuôi giữ động vật an toàn ở mức độ 3.

Ví dụ 2

Nhận biết và mô tả đặc điểm của các epitop trung hòa của H5HA bằng cách sử dụng n-mAb

Bảng gồm 5 mAb trung hòa khác nhau (6B8, 4C2, 2D9, 4F8 và 3H11) kháng ngưng kết tổ hồng cầu cúm (HA) được tạo ra trước đó trong nghiên cứu. Toàn bộ các n-mAb nhận biết các epitop cấu dạng của H5 và có khả năng trung hòa việc nhiễm virus cúm *in vitro*. Ngoài ra, nhận thấy các n-mAb có hoạt tính ức chế quá trình tạo hemagglutinin (dữ liệu không thể hiện). Axit amin có liên quan tới quá trình tạo thành các epitop của n-mAb được phân tích bằng cách sử dụng thể đột biến lần trốn virus. Quá trình tạo trình tự gen HA đầy đủ được tách ra từ nhiều biến thể lần trốn (a) đến n-mAb 6B8 mang thể đột biến đơn điểm ở các vị trí axit amin 189 (từ Lys đến Asn) hoặc

155 (từ Asn đến Asp), (b) đến n-mAb 4F8 mang thể đột biến đơn điểm ở vị trí axit amin 155 (từ Asn đến Asp) và (c) đến n-mAb 2D9 mang thể đột biến đơn điểm ở các vị trí axit amin 189 (từ Arg đến Trp) hoặc 223 (từ Ser đến Arg). Phân tích tương tự đối với n-mAb 4C2 cũng chỉ ra rằng có mối liên quan giữa axit amin 155 (Ser to Ile) hoặc 189 (Arg to Lys) trong việc tạo ra epitop trong khi đó n-mAb 3H11 mang thể đột biến đơn điểm ở vị trí axit amin 138 “Leu”, 139 “Gly” và 140 “Ser”. Toàn bộ các vị trí axit amin được nêu trong bản mô tả này là không tính tới peptit tín hiệu của HA. Xem SEQ ID NO:9-11 đối với trình tự axit amin của các protein HA trưởng thành lần lượt đối với A/Indonesia/CDC669/2006(H5N1), A/Vietnam/1203/2004(H5N1) và A/Anhui/1-/2005(H5N1).

Ví dụ 3

Phân tích mức phân bố epitop

Các trình tự HA có chiều dài đầy đủ của virus H5N1 gia cầm và người thu được từ dữ liệu virus cúm được duy trì bởi Trung tâm quốc gia thông tin sinh học. Các trình tự HA của các thể phân lập H5N1 người và gia cầm được so sánh với trình tự epitop trung hòa chính (vị trí axit amin 138, 140, 155, 189, 159, 194 và 218 của vùng HA1). Các kết quả cho thấy rằng hầu hết các vùng epitop kháng nguyên chính chứa các biến thể đáng kể trong số các dòng H5N1 của người cũng như của gia cầm (Bảng 2). Phân tích về vòng biến đổi 140 ở mức độ cao (140 aa) cho thấy rằng sự có mặt ưu thế của axit amin “Lys” (22,5%) và “Ser” (28,5%) ở vị trí này trong toàn bộ các thể phân lập H5N1 của người, chỉ với sự có mặt không đáng kể của “Thr” ở vị trí 140 (6 %) (Bảng 2). Hơn nữa, 155 aa của vòng 150 chỉ có hai biến thể (63,4% thể phân lập H5N1 của người có axit amin “Ser” và 34,4% còn lại có axit amin “Asn” ở vị trí này). Ngoài ra, axit amin ở vị trí 189 trên ngưng kết tổ hồng cầu của virus cúm, nằm trên vị trí gắn kết thụ thể, chứa axit amin “Arg” với tỷ lệ 64,26% của toàn bộ các chủng H5N1 của người trong khi đó giữ lại 34,65% có axit amin “Lys” ở vị trí này (Bảng 2).

Bảng 2

Tần số epitop trong chủng H5N1

	H5N1 của người			H5N1 của gia cầm		
Axit amin thứ 138	Gln 58,9%	Leu 41,1%		Gln 80,4%	Leu 13,6%	
Axit amin	Lys 22,5%	Ser	Thr	Lys	Ser 6%	Thr

thứ 140		28,5%	6%	34,8%		16,6%
Axit amin thứ 155	Asn 34,4%	Ser 63,4%	Asn 50,6%	Ser 43,2%		
Axit amin thứ 189	Arg 64,3%	Lys 34,7%	Arg 43,3%	Lys 55,1%		
Axit amin thứ 159	Thr 99,7%		Thr 98,4%			
Axit amin thứ 194	Pro 100%		Pro 98%			
Axit amin thứ 218	Lys 99,7%		Lys 99,2%			

Ví dụ 4

Chọn lọc chủng vacxin

Dựa vào việc phân tích trình tự axit amin trong các epitop trung hòa, bảng gồm virus H5N1 (317 chủng của người và 2028 chủng của gia cầm) được phân tích về tần số biến đổi axit amin trong các epitop trung hòa chính của HA. Các tác giả sáng chế chọn 3 chủng H5N1 khác nhau (A/Indonesia/CDC669/2006(H5N1) (nhánh 2.1), A/Viet Nam/1203/2004(H5N1) (nhánh 1.0) và A/Anhui/1/2005(H5N1) (nhánh 2.3)), sao cho sự kết hợp của các chủng này có thể bao gồm toàn bộ các biến đổi axit amin chính của các epitop trung hòa của H5HA (Bảng 3). Ví dụ, chủng A/Viet Nam/1203/2004(H5N1) và A/Indonesia/CDC669/2006(H5N1) chứa “Ser” ở vị trí 155 trong đó chủng A/Anhui/1/2005(H5N1) có “Asn” ở cùng một vị trí. Hơn nữa, chủng A/Viet Nam/1203/2004(H5N1) và A/Anhui/1/2005(H5N1) chứa “Lys” ở vị trí 189 trong khi đó chủng A/Indonesia/CDC669/2006(H5N1) có axit amin “Arg” ở cùng một vị trí (Bảng 3).

Bảng 3

Epitop kháng nguyên trong 3 chủng

Tên	Nhánh	138	140	155	189	194	159	218	Vật chủ
A/Vietnam/1203/2004 (H5N1)	1	Gln	Lys	Ser	Lys	Pro	Thr	Lys	Người
A/Indonesia/CDC669/2006 (H5N1)	2.1	Leu	Ser	Ser	Arg	Pro	Thr	Lys	Người
A/Anhui/1/2005(H5N1)	2.3	Gln	Thr	Asn	Lys	Pro	Thr	Lys	Người

Ví dụ 5

Nhận biết sự khác biệt của các chủng vacxin đã chọn bởi n-mAbs

Các biến thể trong các chủng vacxin đã chọn (A/Vietnam/1203/2004(H5N1) (nhánh 1.0), A/Indonesia/CDC669/2006(H5N1) (nhánh 2.1) và A/Anhui/1/2005(H5N1) (nhánh 2.3)) được xác nhận dựa vào kết quả trung hòa virus và ức chế tạo hemagglutinin (HI) với các n-mAb khác nhau. Sự phơi nhiễm của chủng vacxin với các n-mAb là do các kiểu phản ứng khác nhau với các n-mAb. Như được thể hiện trong các bảng 4A và 4B, n-mAb 6B8 có thể gắn kết ưu tiên với chủng A/Vietnam/1203/2004(H5N1) và A/Anhui/1/2005(H5N1) trong khi đó không xảy ra quá trình trung hòa của A/Indonesia/CDC669/2006(H5N1) bởi cùng n-mAb như được chỉ ra bởi thử nghiệm ức chế khả năng tạo hemagglutinin và thử nghiệm vi trung hòa. Tuy nhiên, n-mAb 4C2 chỉ trung hòa chủng A/Indonesia/CDC669/2006(H5N1). Sự khác nhau tương tự về kiểu nhận biết được quan sát với các n-mAb khác. Các phát hiện này cũng được chỉ ra sự tồn tại của mức thay đổi tính kháng nguyên mạnh giữa chủng A/Indonesia/CDC669/2006(H5N1) và A/Vietnam/1203/2004(H5N1) (Bảng 4A và Bảng 4B). Ngoài ra, kể cả việc A/Anhui/1/2005(H5N1) trong chế phẩm vacxin bao gồm các biến thể của axit amin ở vị trí 155 (Asn) của chủng vacxin, bao gồm 34% thể phân lập H5N1 người.

Bảng 4A

Ức chế ngưng kết tổ hồng cầu kháng lại 3 chủng H5N1 bằng các n-mAb (1mg/ml)

n-mAb	A/Vietnam/1203/2004 (H5N1)	A/Indonesia/CDC669/2006 (H5N1)	A/Anhui/1/2005 (H5N1)
6B8	512	<8	256
4C2	<8	512	<8
4F8	64	512	32
3H11	<8	512	<8
2D9	128	512	128

Bảng 4B

Vi trung hòa virus kháng lại 3 chủng H5N1 bằng n-mAb (1mg/ml)

n-mAb	A/Vietnam/1203/2004 (H5N1)	A/Indonesia/CDC669/2006 (H5N1)	A/Anhui/1/2005 (H5N1)
6B8	320	<10	160
4C2	<10	320	<10
4F8	40	320	20
3H11	<10	320	<10
2D9	80	320	160

Ví dụ 6

Thử nghiệm ức chế ngưng kết hồng cầu (HI) trong huyết thanh

Nồng độ ức chế ngưng kết hồng cầu xác định hiệu quả của đáp ứng kháng thể để ức chế chức năng của HA (A/Vietnam/1203/2004(H5N1)), cũng thu được. Các kết quả về nồng độ HI cho thấy rằng chuột nhắt đã gây miễn dịch bằng Tri-BacHA bổ trợ làm gia tăng đáng kể nồng độ HI trong huyết thanh khi so sánh với Tri-BacHA không được bổ trợ vào ngày thứ 28 và 42 (Fig.1).

Hơn nữa, nồng độ HI của chuột nhắt đã chủng ngừa Tri-BacHA bổ trợ được so sánh với nồng độ HI của chuột nhắt đã chủng ngừa virus RG - H5N1 bổ trợ hoặc được bổ trợ bằng Mono-BacHA (Fig.1).

Ví dụ 7

Nồng độ kháng thể trung hòa nhánh chéo trong huyết thanh

Nồng độ kháng thể trung hòa của huyết thanh kháng 100 TCID₅₀ của các nhánh khác nhau của chủng H5N1 vào ngày 42 cho thấy rằng việc chủng ngừa bằng Tri-BacHA bổ trợ làm trung hòa đáng kể các virus từ các nhánh khác nhau (nhánh 1.0, nhánh 2.1, nhánh 2.2, nhánh 4.0, nhánh 7.0 và nhánh 8.0) được so sánh với chuột nhắt đã chủng ngừa Tri-BacHA không được bổ trợ (Các Fig. 2A và 2B).

Hơn nữa, chuột nhắt được gây miễn dịch bằng Tri-BacHA bổ trợ làm tăng cường đáng kể nồng độ trung hòa đối với các nhánh 2.2, nhánh 4 và nhánh 7 khi được so sánh với chuột nhắt đã chủng ngừa các vaccine bổ trợ: vaccine RG – H5N1 hoặc Mono-BacHA (Các Fig. 2A và 2B). Ngoài ra, chế phẩm vaccine chứa Mono-BacHA hoặc RG-H5N1, đều được bổ trợ bằng Seppic, có khả năng trung hòa nhánh 1 (đồng

nhất), nhánh 2.1 và nhánh 8.0 nhưng không đủ để trung hòa các nhánh khác (nhánh 2.2, nhánh 4.0 và nhánh 7.0 của chủng H5N1).

Ví dụ 8

Nghiên cứu khả năng kích thích sau chủng ngừa

3 tuần sau lần gây miễn dịch cuối, toàn bộ các nhóm động vật được kích thích 5 MLD₅₀ của chủng H5N1 HPAI từ các nhánh 1.0 hoặc nhánh 2.1 hoặc nhánh 7.0 theo đường mũi. Các nhóm động vật đã được gây miễn dịch bằng Tri-BacHA hoặc Mono-BacHA hoặc RG-H5N1 bổ trợ có khả năng bảo vệ 100% kháng lại các nhánh 1.0 và nhánh 2.1 (Fig. 3 và Fig. 4). Hơn nữa, Tri-BacHA bổ trợ có khả năng bảo vệ 100% kháng lại các nhánh 7.0 của virus cúm H5N1. Tuy nhiên, chuột nhắt được gây miễn dịch bằng vaccin RG-H5N1 và Mono-BacHA bổ trợ chỉ có khả năng bảo vệ lần lượt là 66,6 % và 83,3% kháng lại nhánh 7.0 của bệnh cúm H5N1 (Fig. 6).

Tiến triển của bệnh cúm này được chỉ ra là do thay đổi xu hướng làm giảm thể trọng ở các nhóm khác nhau. Ở các nhóm chuột nhắt được kích thích chủng H5N1 thuộc nhánh 7.0 (A/gà/Shanxi/2/06(H5N1)), quan sát thấy không có sự giảm thể trọng đáng kể ở chuột nhắt đã được chủng ngừa bằng Tri-BacHA bổ trợ sau khi kích thích (Fig.5). Tuy nhiên, nhận thấy ở chuột nhắt đã được chủng ngừa bằng Mono-BacHA với chất bổ trợ, thì có tới 12% số chuột có sự giảm thể trọng đều đặn sau 6 ngày kích thích. Các nhóm được chủng ngừa bằng vaccin RG-H5N1 bổ trợ có sự giảm sút thể trọng lớn hơn, lên tới 17% vào ngày thứ 6, sau đó giảm từ từ vào ngày thứ 14 sau khi kích thích (Fig.5).

Việc sử dụng thuật ngữ “một” và các thuật ngữ tương tự trong bản mô tả (đặc biệt trong phần yêu cầu bảo hộ) nên hiểu là bao hàm cả số ít và số nhiều, trừ khi có quy định khác hoặc có nội dung đối lập rõ ràng. Các thuật ngữ “bao gồm,” “có”, “gồm” và “chứa” nên hiểu là các thuật ngữ có kết thúc mở (tức là, có nghĩa “bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở,”) trừ khi có quy định khác. Việc đề cập đến các khoảng giá trị trong bản mô tả này chỉ nhằm mục đích đưa ra cách viện dẫn riêng rẽ ngắn gọn để chỉ mỗi giá trị riêng rẽ nằm trong khoảng đó, trừ khi có quy định khác, và mỗi giá trị riêng rẽ này được đưa vào bản mô tả nếu nó được đề cập riêng rẽ. Ví dụ, nếu đề cập đến khoảng 10-15, thì các giá trị 11, 12, 13, và 14 cũng được đưa ra. Tất cả các phương pháp được nêu trong bản mô tả có thể được thực hiện theo trình tự thích hợp bất kỳ trừ khi có quy định khác hoặc theo cách khác có nội dung đối lập rõ ràng. Việc

sử dụng các Ví dụ bất kỳ và tất cả các Ví dụ, hoặc cách diễn đạt được lấy làm ví dụ (ví dụ, “như”) như nêu trong bản mô tả, chỉ nhằm mục đích minh họa chi tiết hơn sáng chế và không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế trừ khi có quy định khác. Cách diễn đạt trong bản mô tả này không nên hiểu là chỉ đưa ra yếu tố không bắt buộc như một yếu tố cần thiết để thực hiện sáng chế.

Cần hiểu rằng các phương pháp và chế phẩm theo sáng chế có thể được kết hợp dưới dạng nhiều phương án, và chỉ có một vài phương án trong số chúng được bộc lộ trong bản mô tả này. Các phương án theo sáng chế được nêu trong bản mô tả, bao gồm cách thức tốt nhất để các tác giả sáng chế thực hiện sáng chế. Dạng cải biến của các phương án này có thể là hiển nhiên đối với người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật này khi đọc bản mô tả. Các tác giả sáng chế mong muốn người có hiểu biết trong lĩnh vực ứng dụng các cải biến này một cách thích hợp, và các tác giả sáng chế dự định sáng chế cần được thực hiện theo cách khác so với cách đã nêu trong mô tả này. Do đó, sáng chế bao gồm toàn bộ các cải biến và các dạng tương đương của đối tượng đề cập trong phần yêu cầu bảo hộ dưới đây như được cho phép bởi luật thích hợp. Hơn nữa, dạng kết hợp bất kỳ của các yếu tố nêu trên ở tất cả các dạng cải biến của chúng cũng được bao hàm trong sáng chế này sáng chế trừ khi có quy định khác hoặc theo cách khác có nội dung trái ngược rõ ràng.

THƯ MỤC

Ayora-Talavera G, Shelton H, Scull MA, Ren J, Jones IM, et al. (2009). Mutations in H5N1 Influenza Virus Hemagglutinin that Confer Binding to Human Tracheal Airway Epithelium. PLoS ONE 4(11): e7836.

Chen GL, Subbarao K. Attacking the flu: Neutralizing antibodies may lead to universal' vaccine. Nat Med 15: 1251-1252.

Copeland, CS, Doms, RW, Bolzau, EM, Webster, RG, and Helenius, A. 1986. Assembly of influenza hemagglutinin trimers and its role in intracellular transport. J. Cell Biol. 103: 1179–1191.

Gerhard W, Mozdzanowska K, Zharikova D. (2006). Prospects for universal influenza virus vaccine. Emerg Infect Dis 12:569-574.

Kaverin NV, Rudneva IA, Ilyushina NA, Varich NL, Lipatov AS, et al. (2002). Structure of antigenic sites on the hemagglutinin molecule of H5 influenza virus and phenotypic variation of escape mutants. J Gen Virol 83: 2497–2505.

Kaverin NV, Rudneva IA, Govorkova EA, Timofeeva TA, Shilov AA, Kochergin-Nikitsky KS, Krylov PS, Webster RG. (2007). Epitope mapping of the hemagglutinin molecule of a highly pathogenic H5N1 influenza virus by using monoclonal antibodies. J. Virol. 81, 12911–12917.

Lam TT, Hon CC, Pybus OG, Kosakovsky Pond SL, Wong RT, Yip CW, Zeng F, Leung FC. 2008. Evolutionary and transmission dynamics of reassortant H5N1 influenza virus in Indonesia. *PLoS Pathog.* 4, e1000130.

Manzoli L, Schioppa F, Boccia A, Villari P. (2007). The efficacy of influenza vaccine for healthy children: a meta-analysis evaluating potential sources of variation in efficacy estimates including study quality. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 26: 97-106.

Plotkin JB, Dushoff J, Levin SA. 2002. Hemagglutinin sequence clusters and the antigenic evolution of influenza A virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99(9):6263-6268.

Prabakaran M, Ho HT, Prabhu N, Velumani S, Szyport M, et al. (2009). Development of epitope-blocking ELISA for universal detection of antibodies to human H5N1 influenza viruses. *PLoS ONE* 4: e4566.

Suguitan AL, Jr McAuliffe J, Milis KL, Jin H, Duke G, Lu B, Luke CJ, Murphy B, Swayne DE, Kemble G, Subbarao K. 2006. Live, attenuated influenza A H5N1 candidate vaccines provide broad cross protection in mice and ferrets. *PLoS Med.* 3:e360.

Webster RG, Kawaoka Y, Taylor J, Weinberg R, Paoletti E. (1991). Efficacy of nucleoprotein and hemagglutinin antigens expressed in fowlpox virus as vaccine for influenza in chickens. *Vaccine* 9:303-308.

WHO (2005). Evolution of H5N1 Avian Influenza Viruses in Asia. *Emerg Infect Dis* 11:1515-1521.

Wu F, Huang JH, Yuan XY, Huang WS, Chen YH. (2007). Characterization of immunity induced by M2e of influenza virus. *Vaccine* 25: 8868-73.

Yokoyama WM (2004). Production of monoclonal antibody. *Current Protocols in Immunology*. Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM, Strober W, eds. Newcastle, United Kingdom: John Wiley & Sons. Inc. pp 2.5.1-2.5.17.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm vacxin đa trị H5N1 chứa lượng hữu hiệu có tác dụng phòng bệnh của chất gây miễn dịch thứ nhất hoặc axit nucleic mã hóa chất gây miễn dịch thứ nhất này, lượng hữu hiệu có tác dụng phòng bệnh của chất gây miễn dịch thứ hai hoặc axit nucleic mã hóa chất gây miễn dịch thứ hai này, lượng hữu hiệu có tác dụng phòng bệnh của chất gây miễn dịch thứ ba hoặc axit nucleic mã hóa chất gây miễn dịch thứ ba này và chất mang được dụng, trong đó chất gây miễn dịch thứ nhất bao gồm ngưng kết tổ hồng cầu hoặc peptit kháng nguyên của chúng của chủng virus A/Indonesia/CDC669/2006 (H5N1), trong đó chất gây miễn dịch thứ hai bao gồm ngưng kết tổ hồng cầu hoặc peptit kháng nguyên của chúng của chủng virus A/Vietnam1203/2004 (H5N1) và trong đó chất gây miễn dịch thứ ba bao gồm ngưng kết tổ hồng cầu hoặc peptit kháng nguyên của chúng của chủng virus A/Anhui/1/2005 (H5N1).
2. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó mỗi chất gây miễn dịch trong số các chất gây miễn dịch thứ nhất, chất gây miễn dịch thứ hai và chất gây miễn dịch thứ ba bao gồm ngưng kết tổ hồng cầu.
3. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó mỗi chất gây miễn dịch trong số các chất gây miễn dịch thứ nhất, chất gây miễn dịch thứ hai và chất gây miễn dịch thứ ba bao gồm peptit kháng nguyên của ngưng kết tổ hồng cầu.
4. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó mỗi chất gây miễn dịch trong số các chất gây miễn dịch thứ nhất, chất gây miễn dịch thứ hai và chất gây miễn dịch thứ ba bao gồm axit nucleic mã hóa ngưng kết tổ hồng cầu.
5. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó mỗi chất gây miễn dịch trong số các chất gây miễn dịch thứ nhất, chất gây miễn dịch thứ hai và chất gây miễn dịch thứ ba bao gồm axit nucleic mã hóa peptit kháng nguyên của ngưng kết tổ hồng cầu.
6. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó mỗi chất gây miễn dịch trong số các chất gây miễn dịch thứ nhất, chất gây miễn dịch thứ hai và chất gây miễn dịch thứ ba bao gồm virus thể hiện hoặc biểu hiện ngưng kết tổ hồng cầu.
7. Chế phẩm theo điểm 6, trong đó mỗi virus là baculovirus.
8. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó mỗi chất gây miễn dịch trong số các chất gây miễn dịch thứ nhất, chất gây miễn dịch thứ hai và chất gây miễn dịch thứ ba bao gồm virus thể hiện hoặc biểu hiện peptit kháng nguyên của ngưng kết tổ hồng cầu.

9. Chế phẩm theo điểm 8, trong đó mỗi virus là baculovirus.
10. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1-9, trong đó chế phẩm này còn chứa chất bổ trợ.

1/6

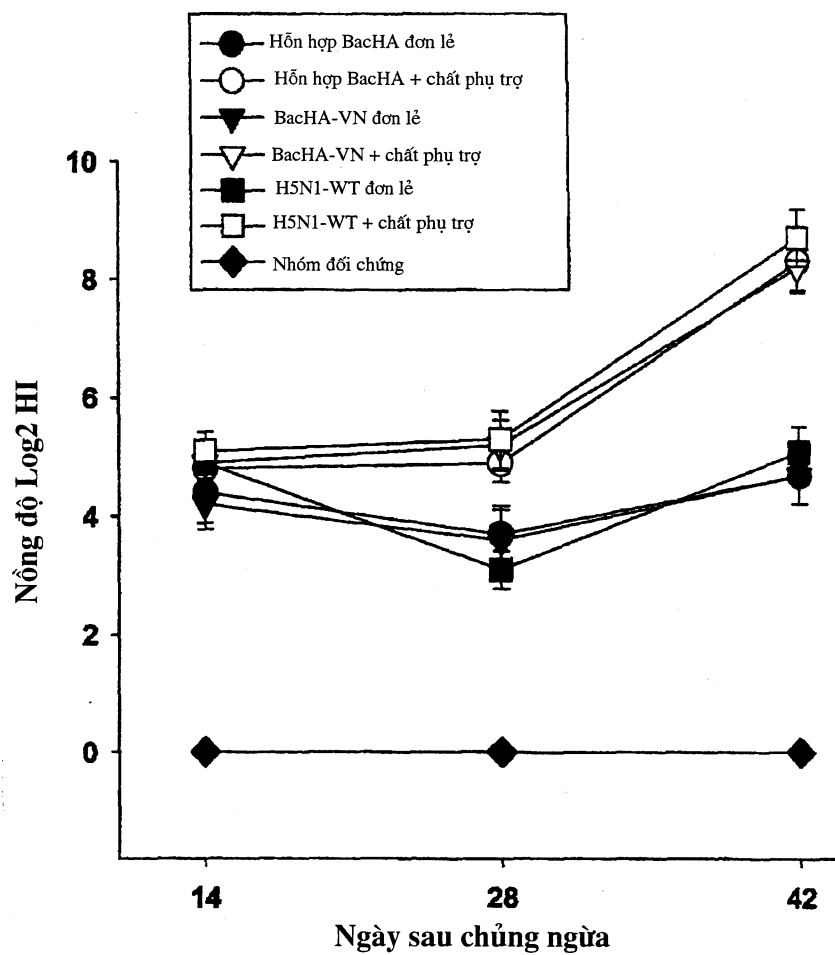


Fig.1

2/6

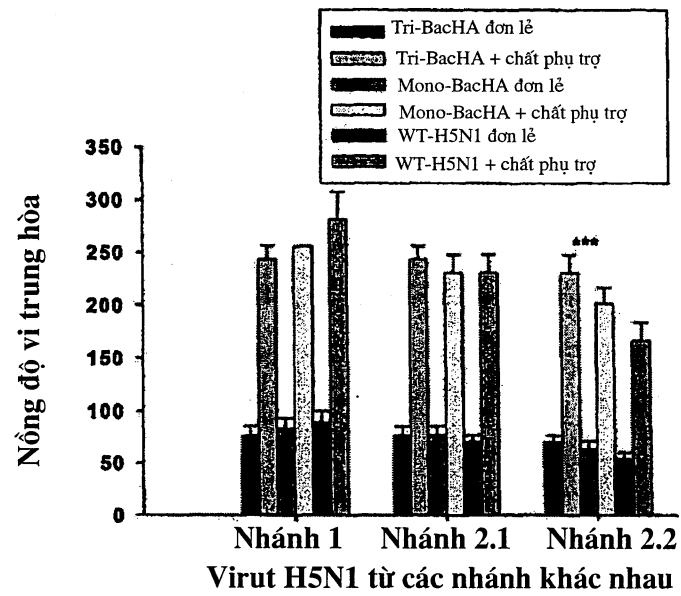


Fig.2A

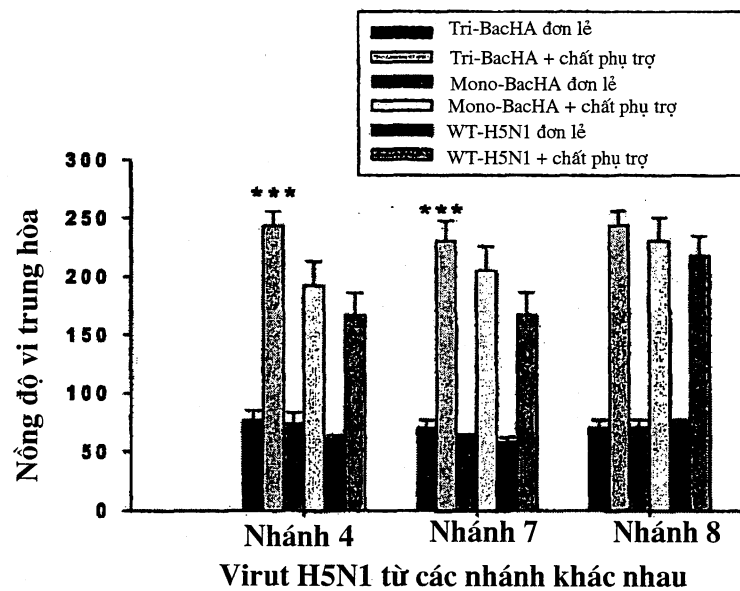


Fig.2B

3/6

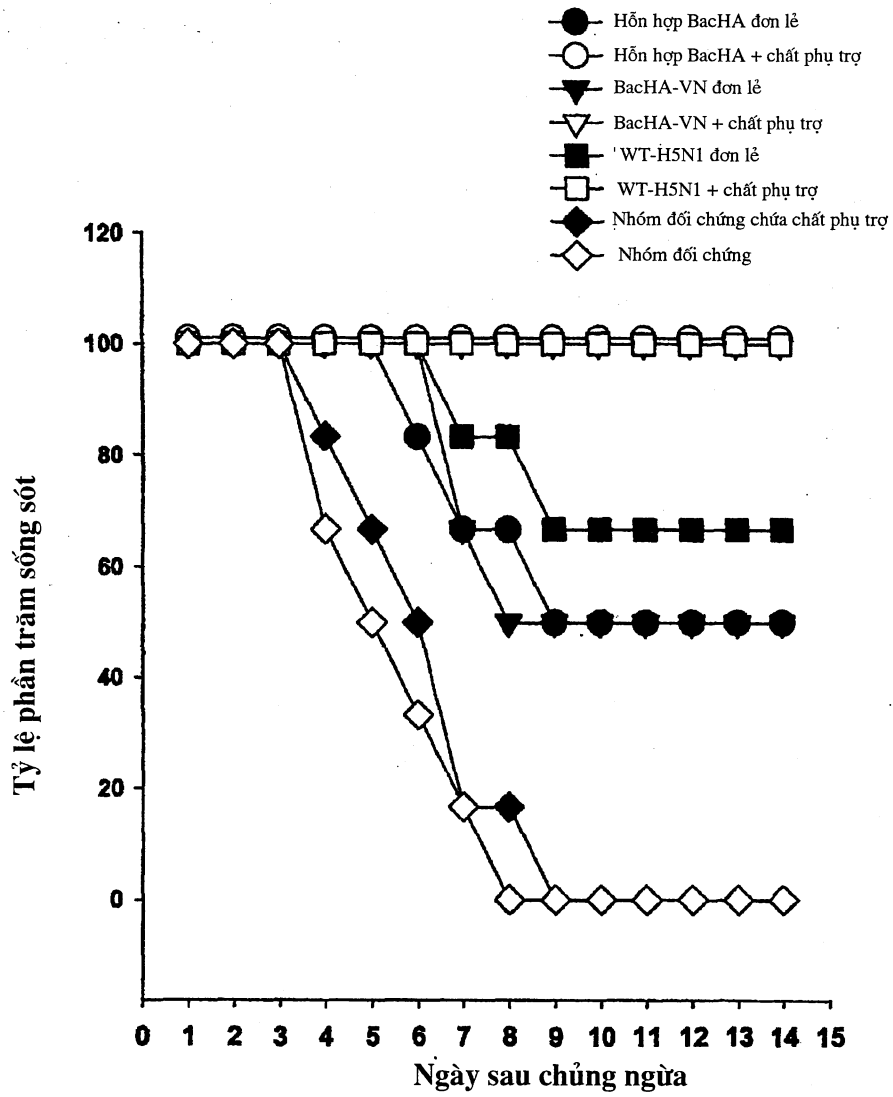


Fig.3

4/6

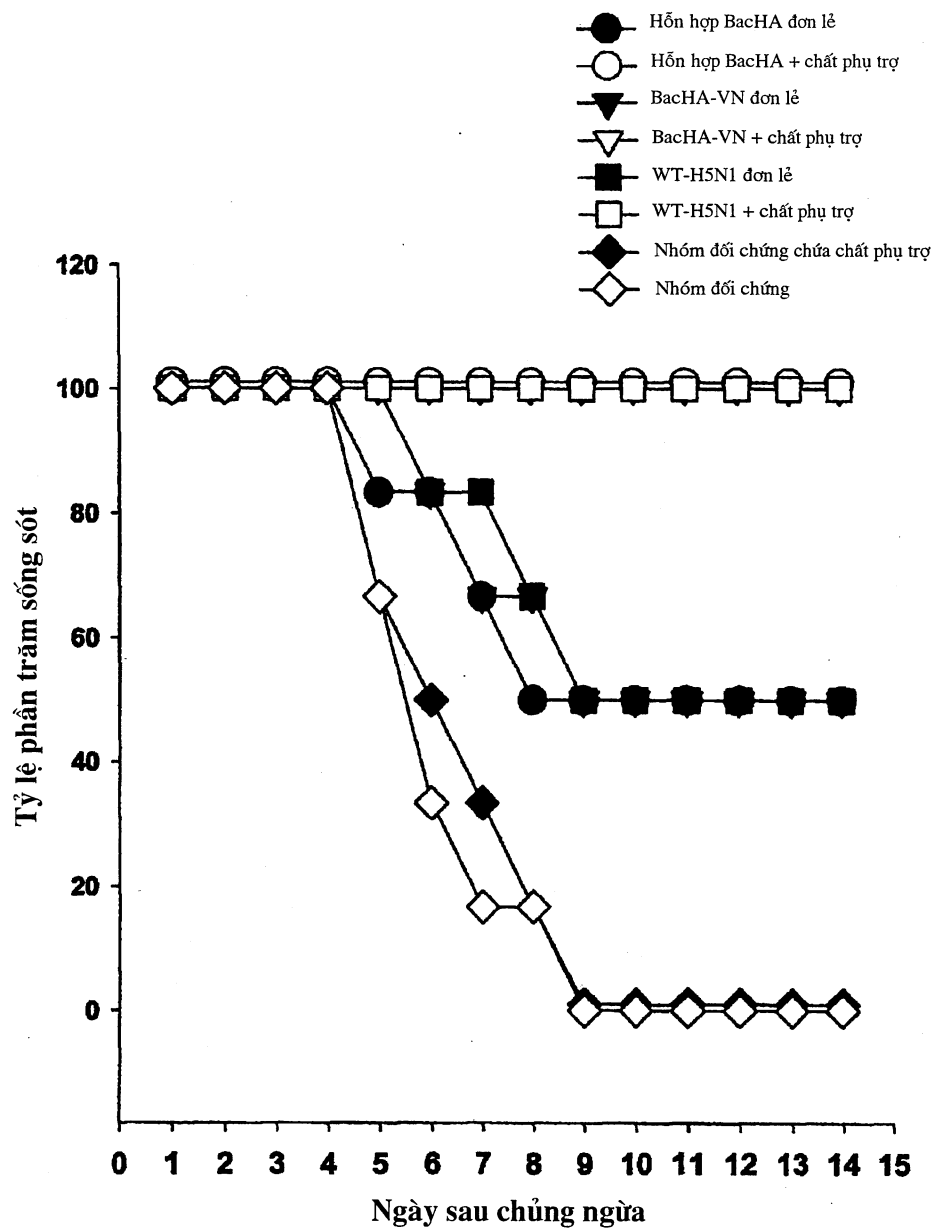


Fig.4

5/6

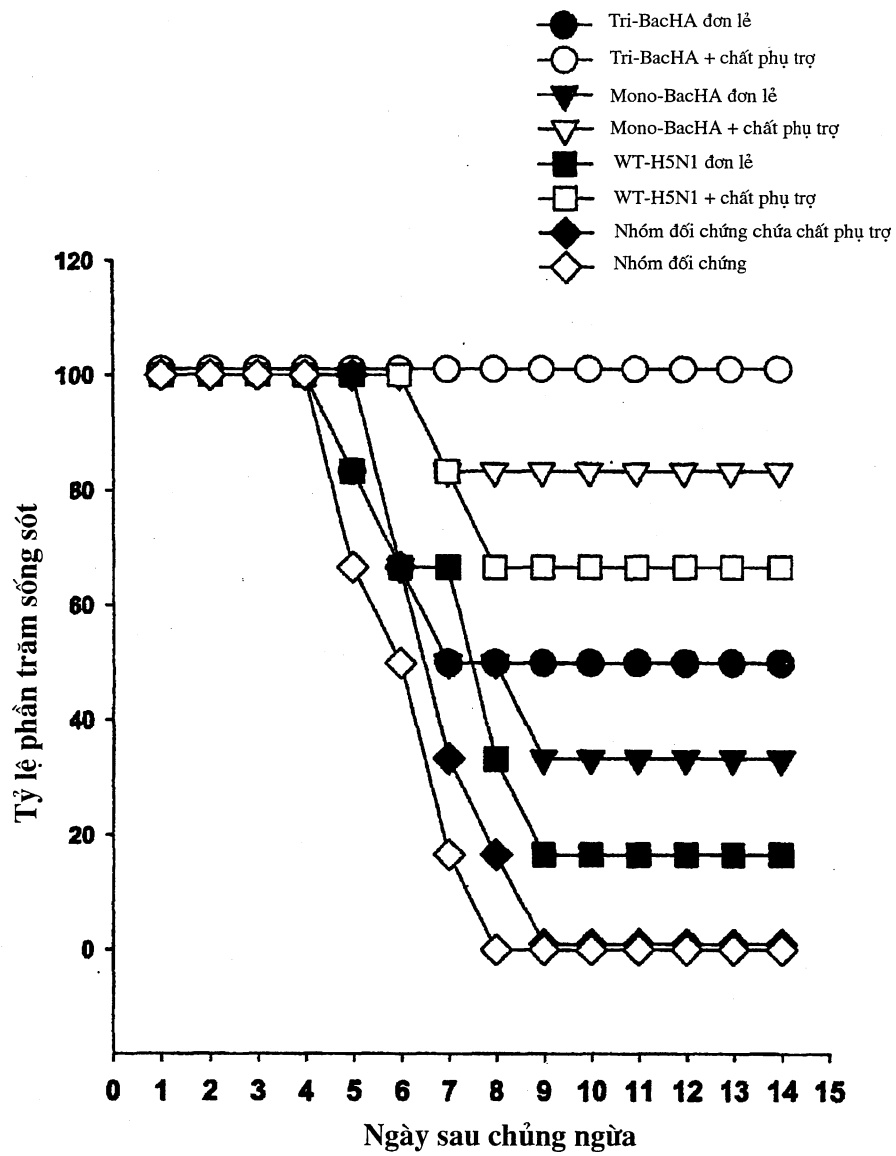
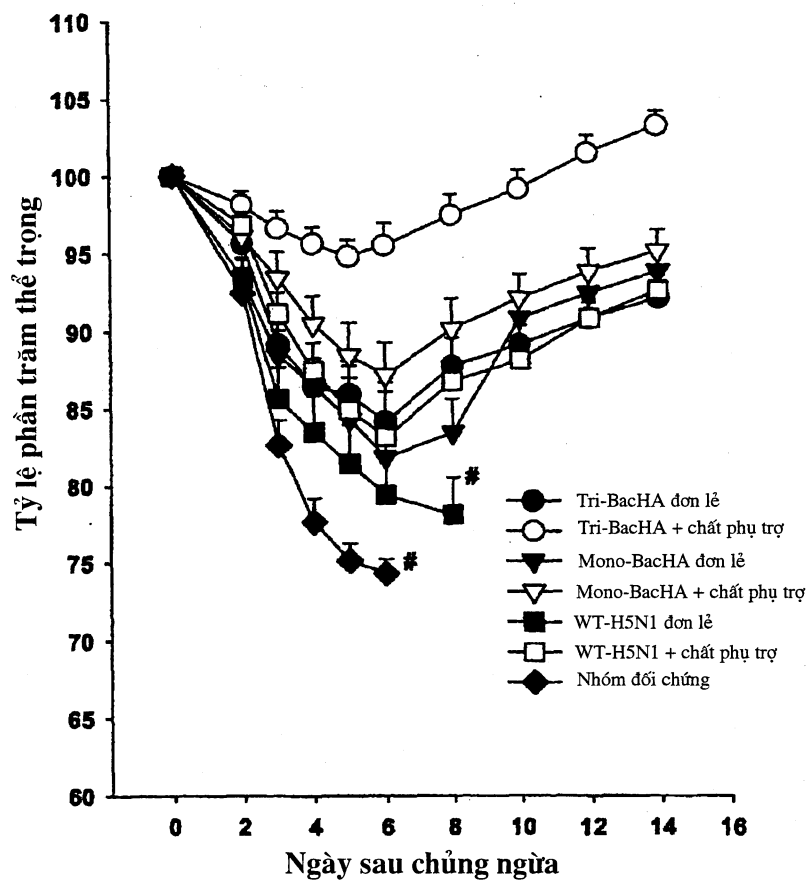


Fig.5

6/6



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110>	Temasek Life Science Laboratory Limited Mookkan, Prabakaran He, Fang Kwang, Hwei-Sing Jimmy	
<120>	CHẾ PHẨM VACXIN ĐA TRỊ H5N1	
<130>	2577-201.PCT	
<150>	US 61/329,802	
<151>	2010-04-30	
<160>	11	
<170>	PatentIn phiên bản 3.5	
<210>	1	
<211>	30	
<212>	ADN	
<213>	Virut cúm A	
<400>	1 acgcgtcgac atggagaaaa tagtgcttct	30
<210>	2	
<211>	34	
<212>	ADN	
<213>	Virut cúm A	
<400>	2 ataagcgccg cgcttaaatg caaattctgc attg	34
<210>	3	
<211>	1707	
<212>	ADN	
<213>	Virut cúm A	
<220>		
<221>	CDS	
<222>	(1)..(1707)	
<400>	3 atg gag aaa ata gtr ctt ctt ctt gca ata gtc agt ctt gtt aaa agt Met Glu Lys Ile Xaa Leu Leu Leu Ala Ile Val Ser Leu Val Lys Ser 1 5 10 15 gat cag att tgc att ggt tac cat gca aac aat tca aca gag cag gtt Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Glu Gln Val 20 25 30 gac aca atc atg gaa aag aac gtt act gtt aca cat gcc caa gac ata Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile 35 40 45 ctg gaa aag aca cac aac ggg aag ctc tgc gat cta gat gga gtg aag Ileu Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys 50 55 60 cct cta att tta aga gat tgt agt gta gct gga tgg ctc ctc ggg aac Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn 65 70 75 80 cca atg tgt gac gaa ttc atc aat gta ccg gaa tgg tct tac ata gtg	48 96 144 192 240 288

Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val	
85 90 95	
gag aag gcc aat cca acc aat gac ctc tgt tac cca ggg agt ttg aac	336
Glu Lys Ala Asn Pro Thr Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Ser Phe Asn	
100 105 110	
gac tat gaa gaa ctg aaa cat cta ttg agc aga ata aac cat ttt gag	384
Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu	
115 120 125	
aaa att caa atc atc ccc aaa agt tct tgg tcc gat cat gaa gcc tca	432
Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys Ser Ser Trp Ser Asp His Glu Ala Ser	
130 135 140	
tca gga gtg agc tca gca tgt cca tac ctg gga agt ccc tcc ttt ttt	480
Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Leu Gly Ser Pro Ser Phe Phe	
145 150 155 160	
aga aat gtg gta tgg ctt atc aaa aag aac agt aca tac cca aca ata	528
Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Ser Thr Tyr Pro Thr Ile	
165 170 175	
aag aaa agc tac aat aat acc aac caa gaa gat ctt ttg gta ctg tgg	576
Lys Lys Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Gln Glu Asp Leu Leu Val Leu Trp	
180 185 190	
gga att cac cat cct aat gat gcg gca gag cag aca agg cta tat caa	624
Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Arg Leu Tyr Gln	
195 200 205	
aac cca acc acc tat att tcc att ggg aca tca aca cta aac cag aga	672
Asn Pro Thr Thr Tyr Ile Ser Ile Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg	
210 215 220	
ttg gta cca aaa ata gct act aga tcc aaa gta aac ggg caa agt gga	720
Leu Val Pro Lys Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly	
225 230 235 240	
agg atg gag ttc ttc tgg gca att tta aaa cct aat gat gca atc aac	768
Arg Met Glu Phe Phe Trp Ala Ile Leu Lys Pro Asn Asp Ala Ile Asn	
245 250 255	
ttc gag agt aat gga aat ttc att gct cca gaa tat gca tac aaa att	816
Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile	
260 265 270	
gtc aag aaa ggg gac tca gca att atg aaa agt gaa ttg gaa tat ggt	864
Val Lys Lys Gly Asp Ser Ala Ile Met Lys Ser Glu Leu Glu Tyr Gly	
275 280 285	
aac tgc aac acc aag tgt caa act cca atg ggg gcg ata aac tct agt	912
Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Met Gly Ala Ile Asn Ser Ser	
290 295 300	
atg cca ttc cac aac ata cac cct ctc acc atc ggg gaa tgc ccc aaa	960
Met Pro Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys	
305 310 315 320	
tat gtg aaa tca aac aga tta gtc ctt gca aca ggg ctc aga aat agc	1008
Tyr Val Lys Ser Asn Arg Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Ser	
325 330 335	
cct caa aga gag agc aga aga aaa aag aga gga cta ttt gga gct ata	1056
Pro Gln Arg Glu Ser Arg Arg Lys Lys Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile	
340 345 350	
gca ggt ttt ata gag gga gga tgg cag gga atg gta gat ggc tgg tat	1104
Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr	
355 360 365	

ggg tac cac cat agc aat gag cag ggg agt ggg tac gct gca gac aaa 1152
 Gly Tyr His His Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys
 370 375 380
 gaa tcc act caa aag gca ata gat gga gtc acc aat aag gtc aac tca 1200
 Glu Ser Thr Gln Lys Ala Ile Asp Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser
 385 390 395 400
 att att gac aaa atg aac act cag ttt gag gct gtt gga agg gaa ttt 1248
 Ile Ile Asp Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe
 405 410 415
 aat aac tta gaa agg aga ata gag aat tta aac aag aag atg gaa gac 1296
 Asn Asn Leu Glu Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp
 420 425 430
 ggg ttt cta gat gtt tgg act tat aat gcc gaa ctt ctg gtt ctc atg 1344
 Gly Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met
 435 440 445
 gaa aat gag aga act cta gac ttt cat gac tca aat gtt aag aac ctc 1392
 Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu
 450 455 460
 tac gac aag gtc cga cta cag ctt agg gat aat gca aaa gag ctg ggt 1440
 Tyr Asp Lys Val Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly
 465 470 475 480
 aac ggt tgt ttc gag ttc tat cac aaa tgt gat aat gaa tgt atg gaa 1488
 Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu
 485 490 495
 agt ata aga aac gga acg tac aac tat ccg cag tat tca gaa gaa gca 1536
 Ser Ile Arg Asn Gly Thr Tyr Asn Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala
 500 505 510
 aga tta aaa aga gag gaa ata agt ggg gta aaa ttg gaa tca ata gga 1584
 Arg Leu Lys Arg Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly
 515 520 525
 act tac caa ata ctg tca att tat tca aca gta gcg agt tcc cta gca 1632
 Thr Tyr Gln Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala
 530 535 540
 ctg gca atc atg ata gct ggt cta tct tta tgg atg tgc tcc aat gga 1680
 Leu Ala Ile Met Ile Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met Cys Ser Asn Gly
 545 550 555 560
 tcg tta caa tgc aga att tgc att taa 1707
 Ser Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile
 565

<210> 4
 <211> 568
 <212> PRT
 <213> Virut cúm A

<220>
 <221> đặc điểm hỗn tạp
 <222> (5)..(5)
 <223> 'Xaa' nằm ở vị trí 5 đối với Val.

<400> 4.

Met Glu Lys Ile Xaa Leu Leu Leu Ala Ile Val Ser Leu Val Lys Ser
 1 5 10 15

Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Glu Gln Val
 20 25 30

Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile
 35 40 45
 Leu Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys
 50 55 60
 Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn
 65 70 75 80
 Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val
 85 90 95
 Glu Lys Ala Asn Pro Thr Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Ser Phe Asn
 100 105 110
 Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu
 115 120 125
 Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys Ser Ser Trp Ser Asp His Glu Ala Ser
 130 135 140
 Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Leu Gly Ser Pro Ser Phe Phe
 145 150 155 160
 Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Ser Thr Tyr Pro Thr Ile
 165 170 175
 Lys Lys Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Gln Glu Asp Leu Leu Val Leu Trp
 180 185 190
 Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Arg Leu Tyr Gln
 195 200 205
 Asn Pro Thr Thr Tyr Ile Ser Ile Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg
 210 215 220
 Leu Val Pro Lys Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly
 225 230 235 240
 Arg Met Glu Phe Phe Trp Ala Ile Leu Lys Pro Asn Asp Ala Ile Asn
 245 250 255
 Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile
 260 265 270
 Val Lys Lys Gly Asp Ser Ala Ile Met Lys Ser Glu Leu Glu Tyr Gly
 275 280 285
 Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Met Gly Ala Ile Asn Ser Ser
 290 295 300
 Met Pro Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys

305 310 315 320
 Tyr Val Lys Ser Asn Arg Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Ser
 325 330 335
 Pro Gln Arg Glu Ser Arg Arg Lys Lys Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile
 340 345 350
 Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr
 355 360 365
 Gly Tyr His His Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys
 370 375 380
 Glu Ser Thr Gln Lys Ala Ile Asp Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser
 385 390 395 400
 Ile Ile Asp Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe
 405 410 415
 Asn Asn Leu Glu Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp
 420 425 430
 Gly Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met
 435 440 445
 Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu
 450 455 460
 Tyr Asp Lys Val Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly
 465 470 475 480
 Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu
 485 490 495
 Ser Ile Arg Asn Gly Thr Tyr Asn Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala
 500 505 510
 Arg Leu Lys Arg Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly
 515 520 525
 Thr Tyr Gln Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala
 530 535 540
 Leu Ala Ile Met Ile Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met Cys Ser Asn Gly
 545 550 555 560
 Ser Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile
 565

<210> 5
 <211> 1695
 <212> ADN
 <213> Virut cúm A

```

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1695)

<400> 5
atg gag aaa ata gtg ctt ctt ttt gca ata gtc agt ctt gtt aaa agt      48
Met Glu Lys Ile Val Leu Leu Phe Ala Ile Val Ser Leu Val Lys Ser
1          5          10          15

gat cag att tgc att ggt tac cat gca aac aac tcg aca gag cag gtt      96
Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Glu Gln Val
          20          25          30

gac aca ata atg gaa aag aac gtt act gtt aca cat gcc caa gac ata      144
Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile
          35          40          45

ctg gaa aag aaa cac aac ggg aag ctc tgc gat cta gat gga gtg aag      192
Leu Glu Lys Lys His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys
          50          55          60

cct cta att ttg aga gat tgt agc gta gct gga tgg ctc ctc gga aac      240
Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn
65          70          75          80

cca atg tgt gac gaa ttc atc aat gtg ccg gaa tgg tct tac ata gtg      288
Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val
          85          90          95

gag aag gcc aat cca gtc aat gac ctc tgt tac cca ggg gat ttc aat      336
Glu Lys Ala Asn Pro Val Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asp Phe Asn
          100          105          110

gac tat gaa gaa ttg aaa cac cta ttg agc aga ata aac cat ttt gag      384
Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu
          115          120          125

aaa att cag atc atc ccc aaa agt tct tgg tcc agt cat gaa gcc tca      432
Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys Ser Ser Trp Ser Ser His Glu Ala Ser
          130          135          140

tta ggg gtg agc tca gca tgc cca tac cag gga aag tcc tcc ttt ttc      480
Leu Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Gln Gly Lys Ser Ser Phe Phe
145          150          155          160

aga aat gtg gta tgg ctt atc aac aag aac agt aca tac cca aca ata      528
Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Asn Lys Asn Ser Thr Tyr Pro Thr Ile
          165          170          175

aag agg agc tac aat aat acc aac caa gaa gat ctt ttg gta ctg tgg      576
Lys Arg Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Gln Glu Asp Leu Leu Val Leu Trp
          180          185          190

ggg att cac cat cct aat gat gcg gca gag cag aca aag ctc tat caa      624
Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Lys Leu Tyr Gln
          195          200          205

aac cca acc acc tat att tcc gtt ggg aca tca aca cta aac cag aga      672
Asn Pro Thr Thr Tyr Ile Ser Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg
          210          215          220

ttg gta cca aga ata gct act aga tcc aaa gta aac ggg caa agt gga      720
Leu Val Pro Arg Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly
225          230          235          240

agg atg gag ttc ttc tgg aca att tta aag ccg aat gat gca atc aac      768
Arg Met Glu Phe Phe Trp Thr Ile Leu Lys Pro Asn Asp Ala Ile Asn
          245          250          255

```

ttc gag agt aat gga aat ttc att gct cca gaa tat gca tac aaa att Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile 260 265 270	816
gtc aag aaa ggg gac tca aca att atg aaa agt gaa ttg gaa tat ggt Val Lys Lys Gly Asp Ser Thr Ile Met Lys Ser Glu Leu Glu Tyr Gly 275 280 285	864
aac tgc aac acc aag tgt caa act cca atg ggg gcg ata aac tct agc Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Met Gly Ala Ile Asn Ser Ser 290 295 300	912
atg cca ttc cac aat ata cac cct ctc acc att ggg gaa tgc ccc aaa Met Pro Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys 305 310 315 320	960
tat gtg aaa tca aac aga tta gtc ctt gcg act ggg ctc aga aat agc Tyr Val Lys Ser Asn Arg Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Ser 325 330 335	1008
cct caa cga gag acg cga gga tta ttt gga gct ata gca ggt ttt ata Pro Gln Arg Glu Thr Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile 340 345 350	1056
gag gga gga tgg cag gga atg gta gat ggt tgg tat ggg tac cac cat Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His 355 360 365	1104
agc aat gag cag ggg agt ggg tac gct gca gac aaa gaa tcc act caa Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys Glu Ser Thr Gln 370 375 380	1152
aag gca ata gat gga gtc acc aat aag gtc aac tcg atc att gac aaa Lys Ala Ile Asp Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser Ile Ile Asp Lys 385 390 395 400	1200
atg aac act cag ttt gag gcc gtt gga agg gaa ttt aac aac tta gaa Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe Asn Asn Leu Glu 405 410 415	1248
agg aga ata gag aat tta aac aag aag atg gaa gac ggg ttc cta gat Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp Gly Phe Leu Asp 420 425 430	1296
gtc tgg act tat aat gct gaa ctt ctg gtt ctc atg gaa aat gag aga Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met Glu Asn Glu Arg 435 440 445	1344
act cta gac ttt cat gac tca aat gtc aag aac ctt tac gac aag gtc Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Asp Lys Val 450 455 460	1392
cga cta cag ctt agg gat aat gca aag gag ctg ggt aac ggt tgt ttc Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly Asn Gly Cys Phe 465 470 475 480	1440
gag ttc tat cat aaa tgt gat aat gaa tgt atg gaa agt gta aga aat Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu Ser Val Arg Asn 485 490 495	1488
gga acg tat gac tac ccg cag tat tca gaa gaa gcg aga cta aaa aga Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala Arg Leu Lys Arg 500 505 510	1536
gag gaa ata agt gga gta aaa ttg gaa tca ata gga att tac caa ata Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly Ile Tyr Gln Ile 515 520 525	1584
ctg tca att tat tct aca gtg gcg agt tcc cta gca ctg gca atc atg Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala Leu Ala Ile Met 530 535 540	1632

gta gct ggt cta tcc tta tgg atg tgc tcc aat gga tcg tta caa tgc 1680
 Val Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln Cys
 545 550 555 560

aga att tgc att taa 1695
 Arg Ile Cys Ile

<210> 6.
 <211> 564
 <212> PRT
 <213> Virut cúm A

<400> 6

Met Glu Lys Ile Val Leu Leu Phe Ala Ile Val Ser Leu Val Lys Ser
 1 5 10 15

Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Glu Gln Val
 20 25 30

Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile
 35 40 45

Leu Glu Lys Lys His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys
 50 55 60

Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn
 65 70 75 80

Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val
 85 90 95

Glu Lys Ala Asn Pro Val Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asp Phe Asn
 100 105 110

Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu
 115 120 125

Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys Ser Ser Trp Ser Ser His Glu Ala Ser
 130 135 140

Leu Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Gln Gly Lys Ser Ser Phe Phe
 145 150 155 160

Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Asn Lys Asn Ser Thr Tyr Pro Thr Ile
 165 170 175

Lys Arg Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Gln Glu Asp Leu Leu Val Leu Trp
 180 185 190

Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Lys Leu Tyr Gln
 195 200 205

Asn Pro Thr Thr Tyr Ile Ser Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg
 210 215 220

Leu Val Pro Arg Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly
225 230 235 240

Arg Met Glu Phe Phe Trp Thr Ile Leu Lys Pro Asn Asp Ala Ile Asn
245 250 255

Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile
260 265 270

Val Lys Lys Gly Asp Ser Thr Ile Met Lys Ser Glu Leu Glu Tyr Gly
275 280 285

Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Met Gly Ala Ile Asn Ser Ser
290 295 300

Met Pro Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys
305 310 315 320

Tyr Val Lys Ser Asn Arg Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Ser
325 330 335

Pro Gln Arg Glu Thr Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile
340 345 350

Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His
355 360 365

Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys Glu Ser Thr Gln
370 375 380

Lys Ala Ile Asp Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser Ile Ile Asp Lys
385 390 395 400

Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe Asn Asn Leu Glu
405 410 415

Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp Gly Phe Leu Asp
420 425 430

Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met Glu Asn Glu Arg
435 440 445

Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Asp Lys Val
450 455 460

Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly Asn Gly Cys Phe
465 470 475 480

Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu Ser Val Arg Asn
485 490 495

Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala Arg Leu Lys Arg

500	505	510	
Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys	Leu Glu Ser Ile Gly Ile Tyr Gln Ile		
515	520	525	
Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala Leu Ala Ile Met			
530	535	540	
Val Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln Cys			
545	550	555	560
Arg Ile Cys Ile			
<210>	7		
<211>	1704		
<212>	ADN		
<213>	Virut cúm A		
<220>			
<221>	CDS		
<222>	(1)..(1704)		
<400>	7		
atg gag aaa ata gtg ctt ctt ctt gca ata gtc agc ctt gtt aaa agt			48
Met Glu Lys Ile Val Leu Leu Leu Ala Ile Val Ser Leu Val Lys Ser			
1 5 10 15			
gat cag att tgc att ggt tac cat gca aac aac tcg aca gag cag gtt			96
Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Glu Gln Val			
20 25 30			
gac aca ata atg gaa aag aac gtt act gtt aca cat gcc caa gac ata			144
Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile			
35 40 45			
ctg gaa aag aca cac aac ggg aag ctc tgc gat cta gat gga gtg aag			192
Leu Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys			
50 55 60			
cct ctg att tta aga gat tgt agt gta gct gga tgg ctc ctc gga aac			240
Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn			
65 70 75 80			
cca atg tgt gac gaa ttc atc aat gtg ccg gaa tgg tct tac ata gtg			288
Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val			
85 90 95			
gag aag gcc aac cca gcc aat gac ctc tgt tac cca ggg aat ttc aac			336
Glu Lys Ala Asn Pro Ala Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asn Phe Asn			
100 105 110			
gac tat gaa gaa ctg aaa cac cta ttg agc aga ata aac cat ttt gag			384
Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu			
115 120 125			
aaa att cag atc atc ccc aaa agt tct tgg tcc gat cat gaa gcc tca			432
Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys Ser Ser Trp Ser Asp His Glu Ala Ser			
130 135 140			
tca ggg gtg agc tca gca tgt cca tac cag gga acg ccc tcc ttt ttc			480
Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Gln Gly Thr Pro Ser Phe			
145 150 155 160			
aga aat gtg gta tgg ctt atc aaa aag aac aat aca tac cca aca ata			528

Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Asn Thr Tyr Pro Thr Ile	
165 170 175	
aag aga agc tac aat aat acc aac cag gaa gat ctt ttg ata ctg tgg	576
Lys Arg Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Gln Glu Asp Leu Leu Ile Leu Trp	
180 185 190	
ggg att cat cat tct aat gat gcg gca gag cag aca aag ctc tat caa	624
Gly Ile His His Ser Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Lys Leu Tyr Gln	
195 200 205	
aac cca acc acc tat att tcc gtt ggg aca tca aca cta aac cag aga	672
Asn Pro Thr Thr Tyr Ile Ser Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg	
210 215 220	
ttg gta cca aaa ata gct act aga tcc aaa gta aac ggg caa agt gga	720
Leu Val Pro Lys Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly	
225 230 235 240	
agg atg gat ttc ttc tgg aca att tta aaa ccg aat gat gca atc aac	768
Arg Met Asp Phe Phe Trp Thr Ile Leu Lys Pro Asn Asp Ala Ile Asn	
245 250 255	
ttc gag agt aat gga aat ttc att gct cca gaa tat gca tac aaa att	816
Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile	
260 265 270	
gtc aag aaa ggg gac tca gca att gtt aaa agt gaa gtg gaa tat ggt	864
Val Lys Lys Gly Asp Ser Ala Ile Val Lys Ser Glu Val Glu Tyr Gly	
275 280 285	
aac tgc aac aca aag tgt caa act cca ata ggg gcg ata aac tct agt	912
Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Ile Gly Ala Ile Asn Ser Ser	
290 295 300	
atg cca ttc cac aac ata cac cct ctc acc atc ggg gaa tgc ccc aaa	960
Met Pro Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys	
305 310 315 320	
tat gtg aaa tca aac aaa tta gtc ctt gcg act ggg ctc aga aat agt	1008
Tyr Val Lys Ser Asn Lys Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Ser	
325 330 335	
cct cta aga gaa aga aga aga aaa aga gga cta ttt gga gct ata gca	1056
Pro Leu Arg Glu Arg Arg Arg Lys Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala	
340 345 350	
ggg ttt ata gag gga gga tgg cag gga atg gta gat ggt tgg tat ggg	1104
Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly	
355 360 365	
tac cac cat agc aat gag cag ggg agt ggg tac gct gca gac aaa gaa	1152
Tyr His His Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys Glu	
370 375 380	
tcc act caa aag gca ata gat gga gtc acc aat aag gtc aac tcg atc	1200
Ser Thr Gln Lys Ala Ile Asp Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser Ile	
385 390 395 400	
att gac aaa atg aac act cag ttt gag gcc gtt gga agg gaa ttt aat	1248
Ile Asp Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe Asn	
405 410 415	
aac tta gaa agg aga ata gag aat tta aac aag aaa atg gaa gac gga	1296
Asn Leu Glu Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp Gly	
420 425 430	
ttc cta gat gtc tgg act tat aat gct gaa ctt ctg gtt ctc atg gaa	1344
Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met Glu	
435 440 445	

aat gag aga act cta gac ttc cat gat tca aat gtc aag aac ctt tac 1392
 Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr
 450 455 460

gac aag gtc cga cta cag ctt agg gat aat gca aag gag ctg ggt aac 1440
 Asp Lys Val Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly Asn
 465 470 475 480

ggt tgt ttc gag ttc tat cac aaa tgt gat aat gaa tgt atg gaa agt 1488
 Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu Ser
 485 490 495

gta aga aac gga acg tat gac tac ccg cag tat tca gaa gaa gca aga 1536
 Val Arg Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala Arg
 500 505 510

tta aaa aga gag gaa ata agt gga gta aaa ttg gaa tca ata gga act 1584
 Leu Lys Arg Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly Thr
 515 520 525

tac caa ata ctg tca att tat tca aca gtt gcg agt tct cta gca ctg 1632
 Tyr Gln Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala Leu
 530 535 540

gca atc atg gtg gct ggt cta tct ttg tgg atg tgc tcc aat ggg tcg 1680
 Ala Ile Met Val Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser
 545 550 555 560

tta caa tgc aga att tgc att taa 1704
 Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile
 565

<210> 8
 <211> 567
 <212> PRT
 <213> Virut cúm A

<400> 8

Met Glu Lys Ile Val Leu Leu Leu Ala Ile Val Ser Leu Val Lys Ser
 1 5 10 15

Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Glu Gln Val
 20 25 30

Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile
 35 40 45

Leu Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys
 50 55 60

Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn
 65 70 75 80

Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val
 85 90 95

Glu Lys Ala Asn Pro Ala Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asn Phe Asn
 100 105 110

Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu
 115 120 125

Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys Ser Ser Trp Ser Asp His Glu Ala Ser
130 135 140

Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Gln Gly Thr Pro Ser Phe Phe
145 150 155 160

Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Asn Thr Tyr Pro Thr Ile
165 170 175

Lys Arg Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Gln Glu Asp Leu Leu Ile Leu Trp
180 185 190

Gly Ile His His Ser Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Lys Leu Tyr Gln
195 200 205

Asn Pro Thr Thr Tyr Ile Ser Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg
210 215 220

Leu Val Pro Lys Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly
225 230 235 240

Arg Met Asp Phe Phe Trp Thr Ile Leu Lys Pro Asn Asp Ala Ile Asn
245 250 255

Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile
260 265 270

Val Lys Lys Gly Asp Ser Ala Ile Val Lys Ser Glu Val Glu Tyr Gly
275 280 285

Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Ile Gly Ala Ile Asn Ser Ser
290 295 300

Met Pro Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys
305 310 315 320

Tyr Val Lys Ser Asn Lys Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Ser
325 330 335

Pro Leu Arg Glu Arg Arg Arg Lys Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala
340 345 350

Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly
355 360 365

Tyr His His Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys Glu
370 375 380

Ser Thr Gln Lys Ala Ile Asp Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser Ile
385 390 395 400

Ile Asp Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe Asn
405 410 415

Asn Leu Glu Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp Gly
420 425 430

Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met Glu
435 440 445

Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr
450 455 460

Asp Lys Val Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly Asn
465 470 475 480

Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu Ser
485 490 495

Val Arg Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala Arg
500 505 510

Leu Lys Arg Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly Thr
515 520 525

Tyr Gln Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala Leu
530 535 540

Ala Ile Met Val Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser
545 550 555 560

Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile
565

<210> 9
<211> 552
<212> PRT
<213> Virut cúm A

<400> 9

Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Glu Gln Val
1 5 10 15

Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile
20 25 30

Leu Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys
35 40 45

Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn
50 55 60

Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val
65 70 75 80

Glu Lys Ala Asn Pro Thr Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Ser Phe Asn
85 90 95

Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu
100 105 110

Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys Ser Ser Trp Ser Asp His Glu Ala Ser
115 120 125

Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Leu Gly Ser Pro Ser Phe Phe
130 135 140

Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Ser Thr Tyr Pro Thr Ile
145 150 155 160

Lys Lys Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Gln Glu Asp Leu Leu Val Leu Trp
165 170 175

Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Arg Leu Tyr Gln
180 185 190

Asn Pro Thr Thr Tyr Ile Ser Ile Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg
195 200 205

Leu Val Pro Lys Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly
210 215 220

Arg Met Glu Phe Phe Trp Ala Ile Leu Lys Pro Asn Asp Ala Ile Asn
225 230 235 240

Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile
245 250 255

Val Lys Lys Gly Asp Ser Ala Ile Met Lys Ser Glu Leu Glu Tyr Gly
260 265 270

Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Met Gly Ala Ile Asn Ser Ser
275 280 285

Met Pro Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys
290 295 300

Tyr Val Lys Ser Asn Arg Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Ser
305 310 315 320

Pro Gln Arg Glu Ser Arg Arg Lys Lys Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile
325 330 335

Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr
340 345 350

Gly Tyr His His Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys
355 360 365

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

370

375

380

Ile Ile Asp Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe
385 390 395 400

Asn Asn Leu Glu Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp
405 410 415

Gly Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met
420 425 430

Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu
435 440 445

Tyr Asp Lys Val Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly
450 455 460

Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu
465 470 475 480

Ser Ile Arg Asn Gly Thr Tyr Asn Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala
485 490 495

Arg Leu Lys Arg Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly
500 505 510

Thr Tyr Gln Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala
515 520 525

Leu Ala Ile Met Ile Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met Cys Ser Asn Gly
530 535 540

Ser Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile
545 550

<210> 10
<211> 548
<212> PRT
<213> Virut cúm A

<400> 10

Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Glu Gln Val
1 5 10 15

Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile
20 25 30

Leu Glu Lys Lys His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys
35 40 45

Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn
50 55 60

Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val

65					70					75				80	
Glu	Lys	Ala	Asn	Pro	Val	Asn	Asp	Leu	Cys	Tyr	Pro	Gly	Asp	Phe	Asn
				85					90					95	
Asp	Tyr	Glu	Glu	Leu	Lys	His	Leu	Leu	Ser	Arg	Ile	Asn	His	Phe	Glu
		100						105					110		
Lys	Ile	Gln	Ile	Ile	Pro	Lys	Ser	Ser	Trp	Ser	Ser	His	Glu	Ala	Ser
		115					120					125			
Leu	Gly	Val	Ser	Ser	Ala	Cys	Pro	Tyr	Gln	Gly	Lys	Ser	Ser	Phe	Phe
	130					135					140				
Arg	Asn	Val	Val	Trp	Leu	Ile	Asn	Lys	Asn	Ser	Thr	Tyr	Pro	Thr	Ile
145					150					155					160
Lys	Arg	Ser	Tyr	Asn	Asn	Thr	Asn	Gln	Glu	Asp	Leu	Leu	Val	Leu	Trp
				165					170						175
Gly	Ile	His	His	Pro	Asn	Asp	Ala	Ala	Glu	Gln	Thr	Lys	Leu	Tyr	Gln
			180					185						190	
Asn	Pro	Thr	Thr	Tyr	Ile	Ser	Val	Gly	Thr	Ser	Thr	Leu	Asn	Gln	Arg
		195					200					205			
Leu	Val	Pro	Arg	Ile	Ala	Thr	Arg	Ser	Lys	Val	Asn	Gly	Gln	Ser	Gly
	210					215					220				
Arg	Met	Glu	Phe	Phe	Trp	Thr	Ile	Leu	Lys	Pro	Asn	Asp	Ala	Ile	Asn
225					230					235					240
Phe	Glu	Ser	Asn	Gly	Asn	Phe	Ile	Ala	Pro	Glu	Tyr	Ala	Tyr	Lys	Ile
				245					250					255	
Val	Lys	Lys	Gly	Asp	Ser	Thr	Ile	Met	Lys	Ser	Glu	Leu	Glu	Tyr	Gly
			260					265					270		
Asn	Cys	Asn	Thr	Lys	Cys	Gln	Thr	Pro	Met	Gly	Ala	Ile	Asn	Ser	Ser
		275					280					285			
Met	Pro	Phe	His	Asn	Ile	His	Pro	Leu	Thr	Ile	Gly	Glu	Cys	Pro	Lys
	290					295					300				
Tyr	Val	Lys	Ser	Asn	Arg	Leu	Val	Leu	Ala	Thr	Gly	Leu	Arg	Asn	Ser
305					310					315					320
Pro	Gln	Arg	Glu	Thr	Arg	Gly	Leu	Phe	Gly	Ala	Ile	Ala	Gly	Phe	Ile
					325				330					335	
Glu	Gly	Gly	Trp	Gln	Gly	Met	Val	Asp	Gly	Trp	Tyr	Gly	Tyr	His	His
			340					345					350		

Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys Glu Ser Thr Gln
355 360 365

Lys Ala Ile Asp Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser Ile Ile Asp Lys
370 375 380

Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe Asn Asn Leu Glu
385 390 395 400

Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp Gly Phe Leu Asp
405 410 415

Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met Glu Asn Glu Arg
420 425 430

Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Asp Lys Val
435 440 445

Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly Asn Gly Cys Phe
450 455 460

Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu Ser Val Arg Asn
465 470 475 480

Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala Arg Leu Lys Arg
485 490 495

Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly Ile Tyr Gln Ile
500 505 510

Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala Leu Ala Ile Met
515 520 525

Val Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln Cys
530 535 540

Arg Ile Cys Ile
545

<210> 11
<211> 551
<212> PRT
<213> Virut cúm A

<400> 11

Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Glu Gln Val
1 5 10 15

Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile
20 25 30

Leu Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys
35 40 45

Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn
 50 55 60

Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val
 65 70 75 80

Glu Lys Ala Asn Pro Ala Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asn Phe Asn
 85 90 95

Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu
 100 105 110

Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys Ser Ser Trp Ser Asp His Glu Ala Ser
 115 120 125

Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Gln Gly Thr Pro Ser Phe Phe
 130 135 140

Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Asn Thr Tyr Pro Thr Ile
 145 150 155 160

Lys Arg Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Gln Glu Asp Leu Leu Ile Leu Trp
 165 170 175

Gly Ile His His Ser Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Lys Leu Tyr Gln
 180 185 190

Asn Pro Thr Thr Tyr Ile Ser Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg
 195 200 205

Leu Val Pro Lys Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly
 210 215 220

Arg Met Asp Phe Phe Trp Thr Ile Leu Lys Pro Asn Asp Ala Ile Asn
 225 230 235 240

Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile
 245 250 255

Val Lys Lys Gly Asp Ser Ala Ile Val Lys Ser Glu Val Glu Tyr Gly
 260 265 270

Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Ile Gly Ala Ile Asn Ser Ser
 275 280 285

Met Pro Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys
 290 295 300

Tyr Val Lys Ser Asn Lys Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Ser
 305 310 315 320

Pro Leu Arg Glu Arg Arg Arg Lys Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala
 325 330 335

Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly
 340 345 350

Tyr His His Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys Glu
 355 360 365

Ser Thr Gln Lys Ala Ile Asp Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser Ile
 370 375 380

Ile Asp Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe Asn
 385 390 395 400

Asn Leu Glu Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp Gly
 405 410 415

Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met Glu
 420 425 430

Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr
 435 440 445

Asp Lys Val Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly Asn
 450 455 460

Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu Ser
 465 470 475 480

Val Arg Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala Arg
 485 490 495

Leu Lys Arg Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly Thr
 500 505 510

Tyr Gln Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala Leu
 515 520 525

Ala Ile Met Val Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser
 530 535 540

Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile
 545 550